

Über das Verhalten von Pflanzenzellen gegenüber Anilinfarbstoffen.

Von
Reinhold Schaede.

Mit 1 Textfigur.

Die Wirkung von Anilinfarbstoffen auf Pflanzenzellen ist schon wiederholt untersucht worden, und doch sind auf diesem Gebiete noch mancherlei Unklarheiten vorhanden. So steht z. B. immer noch nicht fest, ob das lebende Plasma färbbar ist oder nicht; dies wird von der einen Seite behauptet (Ruhland, 1912, S. 381 und 425), von der anderen aber energisch bestritten (A. Meyer, 1920, S. 477 u. 478). Die Mehrzahl der Autoren beschränkt ihre Untersuchungen überhaupt darauf, ob der Farbstoff in die Zelle aufgenommen wird oder nicht, und zieht dann daraus im Zusammenhang mit den chemischen und physikalischen Eigenschaften der Farbstoffe Schlüsse auf die Permeabilität des Plasmas und auf seinen Bau mit dem Erfolge, daß eigentlich jeder der Autoren zu einer anderen Theorie gelangt. So besorgen, um nur das Wichtigste zu erwähnen, nach Overton (1900) die Lipoide die Aufnahme der Farbstoffe; Ruhland (1908, 1912) hingegen behauptet, das Plasma verhalte sich ihnen gegenüber wie ein Ultrafilter; nach Czapek (1915) kommen nur die hydroiden Medien für die Adsorption in Betracht, während Collander (1921) wiederum der Overtonschen Hypothese mit einigen Abänderungen zuneigt. Was dagegen in der Zelle beim Eindringen des Farbstoffes vorgeht, wird nur gelegentlich nebenbei kurz erwähnt; allein Pfeffer (1886) macht darüber nähere Angaben, die indessen auch nicht recht befriedigen und infolge der angewandten, allgemein üblichen Methode auch zu keinem anderen Ergebnis führen konnten.

Demgegenüber stellte ich mir die Aufgabe, zu prüfen, wie eine Zelle sich gegenüber Anilinfarbstoffen verhält, wobei weniger Wert darauf gelegt wurde, viele Pflanzen und viele Farbstoffe heranzuziehen, als vielmehr die Wurzelhaare einer Pflanze, *Hydrocharis Morsus ranae*, und wenige Farbstoffe genau und eingehend zu untersuchen. Warum gerade die genannte Pflanze gewählt wurde, wird später erörtert werden.

Bei den Vorversuchen, die hauptsächlich mit Methylenblau, Methylviolett und Säurefuchsin ausgeführt wurden, zeigte sich sehr bald, daß die übliche Methode, bei der man ganze Pflanzen oder Teile in Farblösungen schwimmen läßt, nicht anwendbar war; denn sie gestattet, abgesehen von anderen Eigenschaften, die, wie gezeigt werden wird, zu Fehlern führen können, durch Kontrollen in bestimmten Zeitabschnitten nur die Beobachtung jeweiliger Zustände, nicht aber die von Vorgängen, besonders an den Haaren ein und derselben Wurzel. Nur eine Dauerbeobachtung konnte hier Erfolg versprechen.

Die alte Methode hat noch das Mißliche, daß die nicht selten tagelang in den Farblösungen liegenden Pflanzen oder deren Teile durch den Aufenthalt bei unnatürlichen Verhältnissen in den Glashäfen im Laboratorium sicherlich ungünstig beeinflußt werden, worauf Pfeffer (1886, S. 185) schon hinweist. So könnte man auf diese Weise Wirkungen in der Zelle zu Gesicht bekommen, die in erster Linie gar nicht auf den Farbstoff zurückzuführen sind, sondern auf die veränderten Lebensbedingungen. Diese können die Aufnahmefähigkeit und die Reaktion der Zelle gegenüber dem normalen Zustand verändern, so daß sie gegen den Farbstoff ein Verhalten zeigt, das unter normalen Umständen nicht eintreten oder anders ausfallen würde.

Diese Erwägungen sind keineswegs rein theoretischer Natur. Ich hatte wiederholt Gelegenheit zu sehen, daß z. B. eine *Spirogyra*, die im Freien kurze, trommelförmige Zellen besaß, diese im Laboratorium, an einem Südfenster gehalten, zu längeren Zylindern streckte. Ferner wurde versucht, *Hydrocharis Morsus ranae* im Gewächshaus in einem großen Bottich zu halten. Ihre Wurzeln wuchsen hier schnell zu bedeutender Länge an, die Wurzelhaare blieben kurz und die lebenden überzogen eine längere Strecke der Wurzel als bei den Exemplaren aus dem Teich des botanischen Gartens. Die morphologischen Veränderungen sind aber doch

letzten Endes nichts anderes als Auswirkungen von irgendwelchen Umstellungen im Protoplasten selbst, hervorgerufen durch die geänderten Lebensbedingungen; und ebensogut wie sich jene auf die sichtbare Form erstrecken, können sie auch den der Beobachtung nicht unmittelbar zugänglichen Chemismus der Zelle beeinflussen. In der Tat zeigten denn auch die Wurzelhaare der Pflanzen aus dem Bottich bei den Vorversuchen anderes Verhalten gegenüber den Farbstoffen als die von Pflanzen aus dem Teich, ja es waren schon Unterschiede bemerkbar, wenn die Pflanzen in einem Glashafen 24 Stunden im Laboratorium stehen geblieben waren. Aus diesem Grunde wurde das Material stets frisch dem Teich entnommen.

Ferner stellte sich bei den Voruntersuchungen heraus, daß es nicht möglich war, die Dauerbeobachtung in großen flachen Schalen vorzunehmen; kleine Gefäße scheiden ja von vornherein aus, weil bei den starken Verdünnungen Flüssigkeitsmengen von mindestens $\frac{1}{2}$ l angewendet werden müssen. Teils entstanden so große technische Schwierigkeiten, daß die Beobachtung sehr darunter litt, teils war zu bemerken, daß bei Säurefuchsin um die Wurzelspitze sich eine hellere Zone infolge Absorption des Farbstoffes aus der Lösung bildete, deren Konzentrationsgefälle sich also nach dem Objekt hin nicht schnell genug ausglich. Da nun die Säurefuchsinlösung verhältnismäßig stark war, etwa 0,1 %, ist mit Sicherheit anzunehmen, daß in dünneren Lösungen sich erst recht um das Objekt eine Zone niedriger Konzentration bildet; denn es stehen viel weniger Molekel zum Ausgleich bereit, und ihre Wege sind verhältnismäßig viel weiter als in einer starken Lösung. Optisch wahrnehmbar, wie in dem besonderen Falle bei Säurefuchsin, braucht die Zone entsprechend einem langsameren Gefälle nicht zu werden. Daraus folgt, daß zur Unterstützung der Diffusion in den Lösungen leichte Erschütterungen, die auf Tischen aufgestellte Gefäße mit Untersuchungsobjekten erleiden, sowie Temperaturschwankungen nicht ohne weiteres genügen, wie Pfeffer (1886, S. 184) annahm, sondern die Flüssigkeit müßte dauernd durch ein Rührwerk in Bewegung gehalten werden. Die folgenden Untersuchungen werden zeigen, daß bei der angewandten neuen Methode weit schwächere Lösungen benutzt werden mußten und daß diese sich viel giftiger erwiesen, als es bei den gleichen oder höheren Konzentrationen Pfeffers der Fall war, der Pflanzen tagelang in diesen beließ, ohne daß sie abstarben. Offenbar befanden sich seine Objekte in einer

selbstgebildeten Zone schwacher Konzentration, und es ist darum nicht zu verwundern, wenn sie so lange Zeit darin aushielten. Schwimmen noch dazu ganze Pflanzen oder größere Stücke in schwachen Lösungen, so verteilt sich der Farbstoff auf eine so große Fläche, daß sich unmöglich angeben läßt, welche Konzentration eigentlich auf die einzelne Zelle gewirkt hat.

Nachdem sich also das bisherige Verfahren für eine Dauerbeobachtung untauglich erwiesen hatte, führte Überlegung zu dem Schluß, daß sichere Beseitigung der Schwierigkeiten nur zu erwarten war, wenn das Objekt eine gewisse, ihm angemessene Zeit lang in einem Flüssigkeitsstrom untersucht würde, der ja stets neue Lösung an die Zellen heranbringt.

Zu diesem Zwecke wurde ein besonderer Objektträger gebaut. Auf einen dünnen Glasstreifen von 18 cm Länge und 3,5 cm Breite wurden mit Canadabalsam längs zwei schmale 12 cm lange Glasstreifen mit der Fläche so aufge kittet, daß zwischen ihnen ein Deckglas von 18 mm Kantenlänge gerade Platz hat. An den beiden

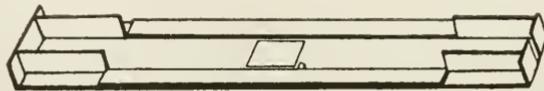


Fig. 1.

Enden der schmalen Streifen wurden 3 cm lange Streifen längs mit der Kante aufgeklebt, und die Schmalseiten des ganzen Objektträgers mit je einem Glasstreifen verschlossen, so daß an seinen Enden zwei flache Kästchen entstehen, die jeweils nach der Mitte zu keine Wand besitzen. Die eine der Schmalwände des Objektträgers ist von einem Schlitz durchbrochen, in den beim Betrieb ein Flöckchen Glaswolle eingehängt wird. Die Textfigur zeigt ein Bild des Apparates in $\frac{1}{3}$ der natürlichen Größe. Diesen kann man sich bei einiger Geschicklichkeit aus dem Glas photographischer Platten leicht selbst herstellen. Er wird sicherlich auch für andere Zwecke gut zu verwenden sein, wo es sich um Untersuchungen in Flüssigkeitsströmen handelt.

Dieser Objektträger wird nun gehandhabt wie ein gewöhnlicher. Das Objekt kommt möglichst in die Mitte in einen Tropfen Wasser und wird mit einem Deckglas bedeckt, dessen Kanten mit einem feinen Rand von Maskenlack umzogen sind, um ein Übertreten von Flüssigkeit auf dieses zu verhindern. Damit das Deckglas nicht

etwa vom Flüssigkeitsstrom gerückt wird, ist auf den Objektträger ein ganz kleiner Glaskeil aufge kittet (s. Figur). Es empfiehlt sich ferner, die Leisten des Objektträgers mit einem Hauch von Talg oder einem anderen festen Fett zu überstreichen, damit die Flüssigkeit nicht auf sie übertreten kann. Die Farblösung wurde in einen Tropftrichter gegeben und in einem entsprechend gebogenen Rohr mit einer Träufelspitze in das obere Ende des Objektträgers geleitet, während die Glaswolle am unteren Ende für das Abfließen in eine Glasschale sorgt. Selbstverständlich muß die Bahn des Objektträgers frei von Fett und tadellos benetzbar sein. Wenn nötig, hilft man im Anfang des Versuches mit einem kleinen Pinsel dem Farbstoffstrom zu gleichmäßiger Verbreitung nach. Durch geeignete Stellung des Hahnes am Tropftrichter und richtiges Anbringen des Glaswollendochtes zu Ableitung kann man unschwer einen gleichmäßigen, raschen Strom über das Objekt unter dem Deckglas erzielen; gutes Arbeiten gibt sich dadurch zu erkennen, daß durch das mikroskopische Gesichtsfeld winzige Körperchen mit großer Schnelligkeit getragen werden. Der Tropfenfall wurde so eingestellt, daß in einer Stunde etwa $\frac{1}{2}$ Liter den Apparat passierte. Bei Lösungen von 0,0001 % und weniger zirkulierte während der Beobachtungszeit 1 Liter, bei stärkeren 500 ccm.

Die Farbstoffe wurden für eine Reihe von Versuchen in Aqua dest. gelöst, das in Gefäßen von Jenenser Glas selbst bereitet wurde und einige Tage an der Luft stehen blieb zur Aufnahme von Sauerstoff und Kohlensäure. Ein Versuch erwies dessen Unschädlichkeit, während gekauftes destilliertes Wasser im Verlauf von 6 Stunden erhebliche Schädigungen verursachte. Für eine andere Reihe wurde Leitungswasser verwendet, das in einem großen Bottich im Gewächshaus abgestanden war und vor Gebrauch filtriert wurde, weil reichlicher Algenwuchs darin zu finden war. Auch dieses Wasser wurde als unschädlich festgestellt. Die beiden Versuchsreihen gaben bei einigen Farbstoffen beträchtliche Unterschiede, wie gezeigt werden wird. Das Breslauer Leitungswasser reagiert alkalisch infolge seines Gehaltes an Kalzium-Bikarbonat. Regenwasser stand mir leider nicht zur Verfügung; Teichwasser, das für die dem Teich entnommenen Pflanzen vielleicht das beste gewesen wäre, habe ich wegen seines hohen Gehaltes an Bakterien und gelösten mineralischen wie organischen Stoffen absichtlich vermieden.

Sehr beachtenswert ist, daß Lösungen einiger Farbstoffe nicht beständig sind. So blaßte Bismarckbraun und Säurefuchsin in Aqua dest. gelöst beim Stehen an der Luft und im Licht binnen 24 Stunden merklich ab. Lösungen von Anilinblau und Säurefuchsin in abgestandenem Leitungswasser wurden binnen wenigen Stunden erheblich heller, und Neutralrot änderte seine Farbe in Orange. Darum wurden für die Beobachtungen stets frisch bereitete Lösungen benützt. Für die Veränderungen der Lösungen in Leitungswasser ist ohne Zweifel dessen basische Reaktion verantwortlich zu machen; denn nach Zusatz von Salzsäure kehrt z. B. bei Säurefuchsin die rote Farbe wieder, während Basen wie Ammoniak, Natron- und Kalilauge bei schwachem Zusatz eine Änderung der Farbe in Orange und bei stärkerem völliges Verblässen herbeiführen.

Vorsicht ist auch mit den Farbstoffen selbst geboten, da sie mitunter nicht rein sind. So enthielt beispielsweise ein Methylgrün, das benutzt werden sollte, offenbar noch einen violetten Farbstoff und mußte darum gestrichen werden.

Bei allen Versuchen dieser und ähnlicher Art kommt es darauf an, eine Lösung von geeigneter Konzentration anzuwenden. Ganz allgemein gesagt, sind zwei Konzentrationen immer möglich, die eine so schwach, daß sie unwirksam ist, die andere so stark, daß sie in kürzester Zeit tödlich wirkt. Diese Möglichkeiten sind indessen nicht allein bei Farbstoffen geboten, sondern überhaupt bei allen Stoffen, die Eingang in die Zelle finden, auch bei den Nährsalzen. Derartige Konzentrationen scheiden natürlich von vornherein aus. Die Dosis des Farbstoffes ist zu finden, die einerseits Wirkungen an dem jeweiligen Objekt hervorruft, andererseits aber auch längere Zeit oder dauernd ohne Schaden vom Protoplasten ertragen wird. Einen ähnlichen Gedanken äußert auch A. Meyer (1920, S. 477). Hier ergeben sich wiederum zwei Extreme, bedingt durch zwei Komponenten, nämlich Aufnahmefähigkeit der zu untersuchenden Zellen für den Farbstoff und dessen Giftigkeit. Auf der einen Seite stehen Farbstoffe, die sehr giftig sind, aber auch sehr stark gespeichert werden. Bei diesen ist eine erträgliche Konzentration kaum festzustellen, weil bei richtiger Versuchsanstellung selbst ganz geringe Spuren dem Wasser entzogen und in der Zelle gespeichert werden und darum über kurz oder lang tödlich wirken. Auf der anderen Seite finden sich Farbstoffe, die mäßige Aufnahme finden und wenig giftig sind. Hier läßt sich

unschwer eine Lösung finden, die in der Zelle ohne Schädigung Färbungen und andere Reaktionen veranlaßt.

Für die verwendeten Farbstoffe vermag ich leider die Fabriken nicht anzugeben; es kommt indessen insofern weniger darauf an, als ja auch die Erzeugnisse der gleichen Fabrik verschieden ausfallen. Jedenfalls waren es einwandfreie Farbstoffe aus der Vorkriegszeit, die sich in den Beständen des Pflanzenphysiologischen Institutes vorfanden.

Bei der Auswahl des Objektes wurde mit großer Sorgfalt vorgegangen. Ich glaube, daß man zu Untersuchungen von lebenden Objekten in Lösungen nur Pflanzen oder Teile von ihnen benutzen darf, die es gewöhnt sind, ihren gesamten Stoffaustausch, auch den Gaswechsel, aus dem Wasser zu besorgen. Es kämen also nur Wasserpflanzen oder die Wurzeln von Landpflanzen in Frage. Bringt man nämlich oberirdische Teile oder Gewebestücke von Landpflanzen in die Lösungen, wie das so vielfach geschehen ist, so versetzt man sie ohne Zweifel in abnorme Verhältnisse, unter denen eine normale Reaktion nicht zu erwarten ist. Denn diese Pflanzenteile sind — ganz abgesehen von der für Wasser schwer durchlässigen Kutikula — gewöhnt, ihren Gasbedarf aus der Luft zu decken und ihre Nährstoffe den umgebenden Zellschichten zu entnehmen; sie werden also im Wasser vor allem mit ihrem Gasaustausch in Schwierigkeiten geraten und wohl noch eine Zeitlang ihr Leben fristen können, aber unter ungünstigen Umständen oder, wenn man will, in krankhaftem Zustande, der indessen optisch nicht wahrnehmbar zu sein braucht. Wäre dem nicht so, dann müßte man Landpflanzen ohne weiteres unter Wasser züchten können. Die Erfahrung lehrt hingegen, daß Keimlinge unter Wasser sich nur schwach entwickeln und bald zugrunde gehen.

Unter diesen Voraussetzungen wurden die Wurzelhaare von *Hydrocharis Morsus ranae* als sehr günstig befunden; sie sind nicht zu zart, aber doch gut durchsichtig und haben vor grünen Pflanzenteilen den Vorzug, daß die Beobachtung und Beurteilung der Färbungen nicht durch Chlorophyllkörner gestört wird. Als Indikator für das Wohlbefinden der Zellen wurde die Rotation des Plasmas benutzt, wie das andere Autoren ebenfalls getan haben; sie ist zwar kein absolut untrügliches Mittel, wird aber im allgemeinen doch richtige Aufschlüsse geben, wenn die Objekte nur immer lebhaft Rotation zeigen, sich also in einigermaßen gleichem Zustand befinden.

Der Bau der Wurzelhaare mag kurz beschrieben werden. Die zylindrische Membran schließt einen schlauchförmigen Protoplasten ein, der seinerseits einen großen Safttraum umgibt. Die Spitze des Haares ist abgerundet, die Basis verbreitert sich in dem Teil, der zwischen die Epidermiszellen eingefügt ist. Hier liegt in einer Plasmahülle der Kern, der durch die Membranen hindurch gewöhnlich nur undeutlich zu erkennen ist. Der Plasmaschlauch ist im allgemeinen sehr dünn und ungleichmäßig stark, nur in jungen Haaren ist naturgemäß die Menge des Plasmas im Verhältnis zum Volumen der Zelle erheblich größer. Den Protoplasten erwachsener Haare durchziehen Bänder von verschiedener Breite und Stärke, die sich verzweigen, so daß das Bild eines unregelmäßigen Netzwerkes entsteht. Dieses ändert seine Gestalt infolge der Rotation unaufhörlich. An der Spitze der Haare pflügt sich das Plasma zu einem kleinen Ballen aufzustauen, in dem die Mikrosomen deutlich hervortreten, die auch in dickeren Bändern des Plasmaschlauhes zu erkennen sind, während ganz dünne homogen erscheinen. Im Zellsaft schwimmt, von der Rotation in Bewegung gesetzt, eine Menge sehr kleiner, sternförmiger Kristallaggregate; es sind lockere Sphärite zusammengesetzt aus feinen Nadeln. Ähnliche Gebilde hat Pfeffer (1886, S. 208) in den Wurzelhaaren von *Trianea bogotensis* beobachtet, ihre Natur indessen nicht näher bestimmt.

Da sich nun bei den Vorversuchen herausstellte, daß diese Kristallgebilde mit gewissen Farbstoffen Reaktionen zeigen, wurden sie einer eingehenden Untersuchung unterworfen. Sie verwandeln sich in absterbenden oder geschädigten Haaren ziemlich rasch in glänzende Körnchen oder Kügelchen, so daß in toten Zellen nur noch diese zu sehen sind. Durch Töten der Haare vermittels Wärme wird dieser Zustand leicht herbeigeführt. Die Kristalle lassen sich nur durch Sublimat-Alkohol und Jodjodkalium (Lugolsche Lösung) im natürlichen Zustand fixieren. Bei frischem und fixiertem Material, das in Jod-Alkohol und Alkohol ausgewaschen war, färbten sich die Kristalle mit Jodjodkalium kräftig gelb; in konzentrierter Salpetersäure nahmen sie hellgelbe Farbe an; die nach Zusatz von Natronlauge in Orange überging, Pikrinsäure verursachte Gelbfärbung. Ferner färbten sie sich nach Fixage durch mehrtägiges Verbleiben in dünner Eosinlösung rot und in Säurefuchsin nach der Zimmermannschen Methode ebenfalls rot. Die Biuretreaktion war nicht deutlich genug, da sie zu diffus ausfiel. Trotzdem wird man nach diesem Verhalten gegenüber den Reagentien und Farb-

stoffen kaum fehlgehen, wenn man die Substanz der Kristallaggregate als eine Eiweißverbindung anspricht.

Ganz vereinzelt finden sich im Zellsaft sehr kleine Kristalle von der Gestalt einer Doppelpyramide, die wohl sicherlich aus Kalziumoxalat bestehen. Da sie sehr selten sind und mit den Farbstoffen nicht reagieren, wurden sie nicht näher untersucht.

Das Verhalten der Wurzelhaare gegenüber Methylenblau bei den Vorversuchen erweckte den Verdacht auf Gerbsäureeinschlüsse, die ja recht häufig sind. Pfeffer (1886) hat mehrfach Fällungen von Methylenblau mit Gerbsäure und deren Verbindungen gefunden. Indessen ließ sich diese in den Wurzelhaaren mit keiner Methode nachweisen. *Spirogyra*-Fäden dagegen, die zur Kontrolle in die Reagenzien eingetragen wurden, ergaben ein deutliches Resultat.

Es wurde auch der Versuch gemacht, die Epidermis von *Tradescantia virginica* zu den Beobachtungen heranzuziehen, die sich leicht abziehen läßt und in deren Zellen das Plasma zirkuliert wie in den Staubfadenhaaren der Pflanze. Indessen stellten sich, wie vorauszusehen war, solche Schwierigkeiten ein, daß das Objekt bereits nach Behandlung mit zwei Farbstoffen wieder aufgegeben wurde, weil ein sicheres Ergebnis ausgeschlossen war. Dennoch sollen die Versuche mitgeteilt werden.

Hinsichtlich der speziellen Methodik sind für *Hydrocharis Morsus ranae* noch einige Angaben zu machen. Abgeschnittene, nicht zu dicke Wurzelspitzen mit reichlichen kräftigen Haaren wurden benutzt; denn es hatte sich gezeigt, daß es gleichgültig war, ob jene im Zusammenhang mit der Pflanze oder abgetrennt untersucht wurden, zumal die Versuchsanstellung mit den letzteren sich bedeutend vereinfacht. Die Wurzelspitzen wurden so in einen Tropfen Teichwasser unter Deckglas gebracht, daß die kürzesten Haare dem nunmehr folgenden Farbstoffstrom entgegengewandt waren, die längeren also keinen Farbstoff abfangen konnten. Eine gleichmäßige Bespülung sämtlicher Wurzelhaare ist nicht zu erreichen, weil der Strom gerade in der Mitte zwischen Objektträger und Deckglas sich schneller bewegt als in deren Nähe. Doch hat das sogar einen kleinen Vorteil insofern, als man während des Versuches Vergleiche anstellen kann.

Die Beobachtungszeit wurde auf 6 Stunden festgesetzt. Während dieser waren, wie Versuche bewiesen, die ja recht kurzlebigen Wurzelhaare in Aqua dest. wie im abgestandenen Leitungswasser

sicher noch bei voller Gesundheit, und das ist, wie gesagt, bei allen derartigen Untersuchungen ein unbedingtes Erfordernis, es sei denn, daß auf das Verhalten der normalen Zelle kein besonderer Wert gelegt wird. 6 Stunden bedeuten auch für eine Dauerbeobachtung schon eine nicht unbedeutliche Anstrengung, zumal man sich keinen Augenblick vom Mikroskop fortzürhren darf; denn jeder kann neue Ereignisse in der dauernd beweglichen Zelle bringen, über deren Zustandekommen man nichts aussagen kann, wenn man nicht beobachtet hat.

Im allgemeinen wurde mit Trockensystemen gearbeitet, für besondere Fälle bewährte sich sehr gut eine Wasser-Immersion von Zeiß, Apochromat 2,5 mm, Apert. 1,25. Beste Beleuchtung ist für die Beurteilung der Farben unerläßlich, sie wurde an hellen Tagen leicht erzielt durch Einstellen des Spiegels auf blauen Himmel oder noch besser auf weiße Wolken. Auch eine Gas-Invertlampe leistete gute Dienste, ein geeignetes Blaufilter im Strahlengang macht ihr Licht rein weiß.

Bevor die speziellen Untersuchungen mitgeteilt werden, sei noch bemerkt, daß man keineswegs zu erstaunen braucht, wenn bei einer Nachprüfung abweichende Ergebnisse gefunden werden. Meine Untersuchungen haben mich gelehrt, daß sowohl die allgemeinen Bedingungen der Versuchsanstellung wie die Art der Farbstoffe, ihres Lösungsmittels, ferner die Individualität des Objektes, der ganzen Pflanze wie der einzelnen Zellen, Unterschiede verursachen können, was ja auch Pfeffer (1886) bemerkt und wiederholt erwähnt hat. Bei derartigen subtilen Untersuchungen an der lebenden Zelle ist ohne Zweifel zur Beeinflussung des Ergebnisses eine ganze Reihe von Umständen imstande, wie Ernährungs- und Entwicklungszustände der ganzen Pflanze und der einzelnen Zellen und nach meiner Meinung gewiß auch noch Faktoren unbekannter Art. So beziehen sich denn die folgenden Angaben nicht auf einen speziellen Fall, sondern es sind Mittelwerte, gefunden aus einer langen Reihe von Beobachtungen während des Sommers der Jahre 1921 und 1922.

Abschnitt I.

Basische Farbstoffe.

Chrysoidin. 0,0002% (1 : 500 000) in Aqua dest. und abgestandenem Leitungswasser.

Nach reichlich 10 Minuten färbt sich das Plasma gelb. Die Färbung wird mit der Zeit stärker, so daß eine ausgezeichnete Beobachtung des rotierenden Plasmas möglich ist. Die plasma-reichen Haaranlagen in der Epidermis werden intensiv gelb. Auch in den Epidermiszellen selbst wird das sonst schlecht sichtbare Plasma durch Färbung deutlich, es zirkuliert. Andere Wirkungen konnten nicht festgestellt werden, nach 6 Stunden war noch keinerlei Schädigung zu bemerken.

Verschiedenerlei Mittel wurden angewendet, um festzustellen, ob die Färbung das Plasma selbst betrifft oder etwa nur Mikrosomen. Mit der Immersion sieht man in weißem Licht nach Intensivfärbung mit einer stärkeren Lösung die Mikrosomen ohne eine bestimmte Farbe, je nach der Einstellung bald hell, bald dunkel, sie sind demnach nicht gefärbt. Das Plasma dagegen ist gelb auch noch in sehr feinen Schichten. Nach Einschaltung eines Blaufilters erscheint das Plasma im hellblauen Licht gelbgrün, die Mikrosomen dagegen bläulich, also das gleiche Resultat; auch die Kristalle im Zellsaft schimmern grünlich, sind also wie das Plasma gefärbt. Eine Speicherung im Zellsaft findet hingegen nicht statt. Die Plasmolyse zeigte, daß die Plasmafärbung nicht etwa durch eine Färbung der Membran vorgetäuscht wird. Dann wurde nach starker Gelbfärbung Methylviolett (0,0001%) gegeben, das nur die Mikrosomen färbt, wie die Untersuchung gezeigt hatte. Das Chrysoidin wird zwar binnen etwa 10 Minuten ausgewaschen, indessen kann man unschwer ein Stadium erkennen, in dem das Plasma gelbgrün erscheint infolge der violetten Färbung der Membran, die Mikrosomen aber deutlich blauviolett sind. Eine Färbung des Zellkernes konnte nicht festgestellt werden.

Demnach ist es wohl nicht mehr zweifelhaft, daß hier eine Färbung des lebenden Plasmas vorliegt, die Ruhland (1912, S. 381) ja bereits für Chrysoidin kurz angegeben hat, A. Meyer (1920, S. 477, 478) hingegen energisch bestreitet.

Nun wurde versucht, die höchste Konzentration zu ermitteln, welche die Wurzelhaare vertragen, wobei es gleichgültig war, ob Aqua dest. oder abgestandenes Leitungswasser als Lösungsmittel benutzt wurde. 0,00033% (1:300 000) verursachte keine Schädigung, dagegen wirkte 0,0005% (1:200 000) in einigen Versuchen schon störend, indem sich die Rotation dauernd verlangsamte. Bei allen diesen stärkeren Lösungen ballt sich während der ersten Stunde das Plasma an der Spitze des Haares und gelegentlich auch im

Innern zu Klumpen, und die Rotation wird etwas langsamer. Die Ballen verteilen sich indessen bald, und die Bewegung gewinnt wieder ihre ursprüngliche Schnelligkeit. Somit müssen anfangs irgendwelche Störungen im Plasma auftreten, die später beseitigt werden; eine Art von Gewöhnung an den Farbstoff läßt sich vermuten. Auch eine Lösung von 0,00067% (1:150 000) wurde in einzelnen Versuchen noch ertragen, doch wurde die Rotation bald sehr langsam und blieb es bis zum Ablauf der Versuchszeit. 0,001% (1:100 000) wirkte dagegen immer in kurzer Zeit schädlich, die Rotation ließ sehr rasch nach und stand im allgemeinen nach 2 Stunden still. Die Färbung trat in dieser Lösung fast momentan ein. Optisch wahrnehmbare Desorganisation des Plasmas infolge von Tod trat auch hier noch nicht in Erscheinung. Bemerkenswert ist noch, daß die Speicherung in jeder Konzentration nur bis zu einem bestimmten Grade geht und nicht bis zu einem für alle Konzentrationen gleichen Maximum getrieben wird.

Nach diesen Versuchen ist 0,00033% die Dosis, die in den Wurzelhaaren des Objektes eine Färbung des sicher noch gesunden Plasmas bewirkt. Sollten sich nach 6 Stunden noch Schädigungen einstellen, so ist nicht mehr zu entscheiden, ob diese vom Farbstoff oder von den veränderten Lebensbedingungen verursacht werden.

Diese Beobachtungen wurden mit großer Skepsis ausgeführt; denn ich war nach Ergebnissen mit anderen Farbstoffen zunächst mit A. Meyer der Ansicht, daß das Plasma selbst sich nicht färbe, doch wurde ich hier eines besseren belehrt. Ich vermag freilich nicht zu sagen, in welcher Weise Chrysoidin im Plasma gespeichert wird. Es könnte dies in so kleinen Mikrosomen geschehen, daß sie sich der mikroskopischen Beobachtung entziehen, doch kann ich das nicht für wahrscheinlich halten, zumal solche Mikrosomen sich schon der Größe der Plasmamolekeln nähern würden. Ob weiter die Farbstoffmolekeln in die Lipoid- oder Eiweißmolekeln aufgenommen oder ob sie zwischen diese gelagert werden, läßt sich mit den heutigen optischen Hilfsmitteln kaum sicher entscheiden, insbesondere an der lebenden Zelle. Die bestehenden Theorien über Plasmastruktur und Stoffaufnahme helfen hier auch nicht weiter, jeder Autor würde die seinige bestätigt glauben. Jedenfalls erscheint das Plasma ganz homogen gefärbt.

Bismarckbraun. 0,0001% (1 : 100000) in Aqua dest., gelbe Lösung.

Während der ersten Stunde geht folgendes vor sich. Die Membran färbt sich schwach gelblich, auch der Zellsaft speichert etwas Farbstoff. Es treten darin Körnchen auf, die zunächst orangefarben sind, um mit der Zeit gelbbraun und endlich braun zu werden. Sie ballen sich zu Klumpen, die vom Plasma mitgeschleppt werden. Einzelne Körnchen oder kleine Ballen können vom Plasma umflossen und später wieder ausgestoßen werden, wodurch der Anschein erweckt werden kann, als stammten sie überhaupt aus jenem. Dies ist jedoch nicht der Fall, sondern die Körnchen sind Verwandlungsprodukte der beschriebenen Kristallaggregate. Man kann deren Zerfallen in kleine amorphe Körperchen beobachten, die lebhaftere Brownsche Molekularbewegung zeigen, die den Kristallen nicht eigen ist. Die Körperchen färben sich allmählich und ballen sich zusammen wie oben beschrieben. Sobald eine gewisse Größe überschritten ist, hört die Molekularbewegung auf. Mit der Vermehrung der Körnchen und der aus ihnen bestehenden Ballen nehmen die Kristallaggregate ab, so daß solche endlich kaum noch zu finden sind, auch ein Beweis, daß die Körnchen nicht aus dem Plasma ausgestoßen werden. Mit Ablauf der ersten Stunde bekommt das Plasma in manchen Haaren, besonders in älteren, einen gelblichen Schimmer. Die Rotation ist noch sehr lebhaft, obwohl in einer ganzen Anzahl von Haaren die Kristalle bereits in braune Massen verwandelt und Zellsaft und Plasma gelegentlich deutlich gelb sind; nur in einigen alten Haaren ist sie langsam geworden. Im Anfang der zweiten Stunde tritt in stark gefärbten Haaren ein Umschwung ein. Die Rotation nimmt sehr schnell ab, steht still, und die Haare sterben ab. Die Ballen und der Zellsaft sind tief braun geworden. Es zeigen sich jetzt bedeutende Unterschiede zwischen den Haaren. Manche Haare sind durch und durch braun gefärbt, die meisten davon schon tot; in anderen dagegen, besonders in jungen, haben sich die Kristalle zwar schon in braune Klumpen verwandelt, das Plasma dagegen ist bei lebhafter Rotation noch ungefärbt oder hat höchstens einen feinen gelblichen Schimmer. Man kann beobachten, daß Stillstand der Rotation und Tod bald nach deutlicher Färbung des Plasmas eintreten. Der Farbstoff ist also tödlich, sobald er im Plasma gespeichert wird, und übt seine Wirkung wie beschrieben in älteren, weniger widerstandsfähigen Zellen naturgemäß zuerst aus. Nach

dem Tode erfolgt schnelle Desorganisation des Plasmas unter gleichmäßiger Braunfärbung. Der Tod kann in den Zellen partiell eintreten; namentlich in langen Haaren ist nicht selten ein Teil des Plasmas schon deutlich desorganisiert, während der andere noch langsam rotiert. Nach 2 Stunden ist wohl die Hälfte der Wurzelhaare schon tot. In einigen Haaren stockt die Rotation ohne vorhergehende Färbung des Plasmas, nachdem alle Kristalle zu braunen Klumpen geworden sind. In diesen tritt dann rasch hintereinander Gelbfärbung des Plasmas und Tod ein. Übrigens färbt sich nach dem Tode die Membran kräftiger und zwar dunkelorange, ein Farbenton, der überhaupt für abgestorbene Haare charakteristisch ist. Den Grund für diese beachtenswerte Erscheinung zu ermitteln, liegt nicht im Rahmen dieser Arbeit. Nach 3 Stunden findet sich in nur wenigen Haaren noch Rotation, nach 4 Stunden sind so gut wie alle tot.

Bismarckbraun wirkt demnach über kurz oder lang tödlich, eine Färbung des Plasmas tritt nur in krankem Zustande ein und zeigt den bevorstehenden Tod an. Da die Speicherung sehr stark ist, wird kaum eine erträgliche Konzentration zu finden sein. Lösungen in abgestandenem Leitungswasser wirken genau so, können aber etwas stärker gewählt werden.

Methylviolett. 0,00001% (1 : 10000000) in Aqua dest., ganz schwach violette Lösung. Bei Verwendung von abgestandenem Leitungswasser konnte ein wenig stärkere Lösung verwendet werden. Die Wirkung war die gleiche.

Binnen 15 Minuten färbt sich zuerst die Membran, dann auch der Zellsaft, und zwar in jungen Haaren stärker als in älteren. Man hat infolgedessen bei mittleren Vergrößerungen den Eindruck, als sei das Plasma gefärbt; stärkere zeigen hingegen, daß nur die Mikrosomen Methylviolett speichern. Ihr Farbenton ist infolge der Kleinheit nicht genau festzustellen, ich möchte ihn für mehr bläulich als violett ansprechen. Nach etwa 20 Minuten treten im Zellsaft der älteren, später auch der jüngeren Haare lockere, wolkige, blauviolette Ballen auf, die vom rotierenden Plasma mitgeschleppt werden. Sie wachsen mit der Zeit an. Der Zellsaft wird während ihres Entstehens immer heller, offenbar durch Bindung des Farbstoffes. Es handelt sich um einen Niederschlag, bestehend aus sehr feinen, amorphen, schwammigen, blauvioletten Gebilden, die aneinander festkleben und Haufen bilden. Sie können am Plasma

haften, werden indessen keinesfalls von diesem ausgestoßen. Die Kristalle sind bei ihrer Bildung schwerlich beteiligt, denn eine Umwandlung konnte nicht festgestellt werden, auch war eine Abnahme ihrer Zahl selbst bei dickem Niederschlag nicht zu bemerken. Nach einer Stunde zeigen nur ganz junge Haare noch keinen Niederschlag, obwohl ihr Zellsaft stark violett ist. Die Färbung der Mikrosomen ist jetzt sehr deutlich. Die Rotation hat sich allgemein stark verlangsamt, und steht in vielen Haaren still, worauf der Tod eintritt unter Desorganisation des Plasmas, das sich nunmehr deutlich blau färbt. Die Haare können partiell absterben wie bei Bismarckbraun. Nach dem Tode tritt schnelle Verwandlung der Kristallaggregate in bläuliche Körnchen ein, die Molekularbewegung besitzen und zu Ballen verkleben können. Nach 2 Stunden ist schon eine erhebliche Zahl der Haare tot, in den noch lebenden steht die Rotation still oder ist äußerst langsam. Die jungen Haare sind am widerstandsfähigsten. Nach 3 Stunden ist alles tot.

Methylviolett wirkt im höchsten Grade giftig und wird selbst aus einer so schwachen Lösung derartig stark gespeichert, daß in kurzer Zeit intensive Färbungen entstehen. Wenn für genügende Umspülung mit der Lösung gesorgt ist, reißt die Zelle offenbar auch die geringsten Spuren des Farbstoffes an sich, die dann rasch den Tod herbeiführen.

Gentianaviolett (Kristallviolett). 0,00001% (1 : 10000000) in Aqua dest., schwach violette Lösung mit etwas bläulichem Ton.

Die Membran färbt sich schwach violett. Nach $\frac{1}{2}$ Stunde bekommt das Plasma älterer Haare einen violetten Schimmer, die Rotation wird stark verlangsamt und ist in älteren Haaren nur schwer festzustellen. Die Mikrosomen färben sich, dem Anschein nach bläulich. Auch der Zellsaft speichert etwas Farbstoff. Im Zellsaft älterer Haare tritt ein wolkiger, violetter Niederschlag auf, der sich geradeso verhält wie bei Methylviolett. Eine ganze Anzahl ganz junger Haare platzt an der Spitze und spritzt ihren Inhalt portionsweise aus. Anfangs geht die Rotation trotzdem weiter, ist indessen durch wiederholtes Ausstoßen zuviel Plasma verloren, so stirbt das Haar ab, und das tote Plasma färbt sich blau. Nach $\frac{3}{4}$ Stunden ist in einigen der älteren Haare das Plasma deutlich hellviolett, der Zellsaft dicht mit Niederschlag erfüllt, die Rotation steht still. Jetzt folgt schnell der Tod und Desorganisation des Plasmas, das sich dabei von hellviolett in blau umfärbt. Die Zelle

kann in einem Teil tot sein, während in dem anderen noch Rotation sichtbar ist. Auch in jüngeren Haaren tritt schon häufig der Niederschlag auf und Färbung des Plasmas. Nach 1 Stunde sind diese Erscheinungen überall zu beobachten, die Rotation ist allgemein sehr langsam oder hat aufgehört. Nach 1½ Stunden sind die ganz jungen Haare so gut wie alle geplatzt und tot. Von den übrigen Haaren sind viele tot, ihr Plasma intensiv blau. Der Niederschlag in ihnen färbt sich mit der Zeit stärker. Nach 2 Stunden ist überall ein sehr starker Niederschlag vorhanden, die Haare sind so gut wie alle abgestorben. Es besteht ein starker Gegensatz zwischen dem rein blauen toten Plasma und dem blau-violetten Niederschlag.

Gentianaviolett gleicht hinsichtlich seiner Giftigkeit, der starken Speicherung sowie in manchen seiner Wirkungen dem Methylviolett. Abweichend ist die Färbung des Plasmas, die eine erhebliche Schädigung anzeigt wie bei Bismarckbraun. Beachtung verdient die Änderung der Farbe des Plasmas beim Eintreten des Todes von violett in blau, worüber an späterer Stelle noch zu sprechen sein wird. Ganz eigenartig ist das Ausspritzen des Zellinhaltes, das gerade die jüngsten Haare betrifft. Es kann sich doch nur um eine so erhebliche Steigerung des Turgors handeln, daß die Membran gesprengt wird, die an der wachsenden Spitze offenbar am schwächsten ist. Doch steht der Farbstoff mit dieser Wirkung nicht allein da, wie die folgenden Beobachtungen zeigen werden.

Methylenblau. 0,0001 % (1 : 1000000) in Aqua dest.

Membran und Zellsaft färben sich zart blau, bei jungen Haaren etwas stärker. Nach 1¾ Stunden treten in den jungen Haaren dunkelblaue, rundliche Körperchen auf, die von der Rotation mitgerissen werden, aneinander haften und zu kleinen Kugeln verschmelzen können. Sie bleiben auch am rotierenden Plasma kleben, von dem sie gelegentlich umflossen werden. Sie entstehen scheinbar aus den Kristallsternchen, die sich in amorphe Körperchen mit lebhafter Molekularbewegung verwandeln und langsam färben, wobei sie Kugelgestalt annehmen. Nach 4 Stunden ist die Rotation in alten Haaren langsamer geworden, in ihnen befinden sich keine blauen Kugeln. Diese sind überhaupt fast ausschließlich auf junge Haare beschränkt. Nach 5 Stunden sind viele alte Haare tot, ihr Plasma von der Membran abgelöst. In manchen Haaren wandeln sich die Kristalle in Körnchen um, die indessen ungefärbt bleiben.

Nach 6 Stunden rotiert das Plasma nur noch in ganz jungen Haaren langsam. Alle anderen sind bewegungslos oder tot. Die jungen Haare enthalten viele blaue Kügelchen, die gelegentlich zu mehreren großen Kugeln verschmolzen sind. Ältere Haare sind ganz frei davon.

Bei Lösung des Farbstoffes in abgestandenem Leitungswasser kann man eine nicht unerheblich stärkere Konzentration wählen, und die Wirkung ist etwas anders.

Methylenblau. 0,0005 % (1:200000) in abgestandenem Leitungswasser.

Der Zellsaft färbt sich langsam, erst nach $\frac{1}{2}$ Stunde gut erkennbar. Nach 1 Stunde erscheinen darin die blauen Kügelchen und zwar in sämtlichen Haaren, jungen wie alten. Sie zeigen die gleichen Eigenschaften wie geschildert. Bei dieser Versuchsanstellung, bei der die Kügelchen reichlicher auftreten, ist festzustellen, daß sie keinesfalls aus dem Plasma stammen, sondern daß sie Verwandlungsprodukte der Kristallaggregate sind, deren Zahl mit Zunahme der Kugeln abnimmt. Nach 4 Stunden hat sich die Rotation allgemein verlangsamt, in manchen Haaren steht sie still, einzelne sind schon tot. Nach 6 Stunden ist die Rotation, wo überhaupt noch vorhanden, äußerst langsam, zumeist hat sie aufgehört.

Sucht man dagegen eine gleichstarke Lösung (0,0005 %) in Aqua dest. zu geben, so ist die Wirkung ungleich heftiger. Binnen 5 Minuten sind die Haare tief blau. Nach $\frac{1}{2}$ Stunde zeigen sie keine Rotation mehr, sie platzen an der Spitze und spritzen ihren Inhalt aus. Zu einer Bildung der blauen Kugeln kommt es überhaupt nicht.

Bei Anwendung von abgestandenem Leitungswasser konnte sogar 0,001 % (1:100000) gegeben werden. Die Wurzelhaare sind zwar nach 5 Stunden tot, aber jene Kugeln treten sehr reichlich schon nach $\frac{3}{4}$ Stunden auf.

Im Leitungswasser muß wohl die Giftigkeit des Methylenblaus erheblich abgestumpft werden, vielleicht durch Bindung mit den Karbonaten, so daß auch andere Wirkungen, die einige Zeit erfordern, noch eintreten können, ehe sie durch Schädigung und Tod der Zelle unmöglich gemacht werden.

Übrigens werden die blauen Kugeln durch Jodjodkalium fixiert wie die Kristalle, wobei die Farbe durch Bildung des Jodhydrates des Methylenblaus in schwarz übergeht.

Neutralrot. 0,00005% (1 : 2000 000) in Aqua dest.

Der Zellsaft färbt sich schnell rosa, auch die Membran, doch mit einem mehr orangefarbenen Ton, wobei die Haarspitzen mit der Zeit dunkler werden. Nach etwa $\frac{3}{4}$ Stunden verwandeln sich in Haaren mit stark gefärbtem Zellsaft die Kristallsternchen in amorphe Körperchen mit Molekularbewegung, die sich abkugeln und karminrot färben. Nach 1 Stunde sind schon einzelne Haare dicht gefüllt mit roten Kügelchen, während die Kristalle selten geworden sind. Die Rotation ist überall lebhaft. Die Haare speichern den Farbstoff verschieden stark, auch wenn sie gleichmäßig von der Lösung gespült werden. In ganz jungen Haaren erscheint vor Beginn und während des Auftretens der Kugeln der rosa Zellsaft flockig mit dunkleren Wolken. Nach 2 Stunden sind alle Haare mehr oder weniger mit dunkelkarminroten Kügelchen erfüllt. Diese können durch Umfließen in das Plasma aufgenommen werden. Sie wachsen mit der Zeit durch Verschmelzen; denn sie haften häufig aneinander, und können im Saftraum durch die Rotation zu großen Haufen zusammengeschwemmt werden, die sich gelegentlich festklemmen. Ein Nachlassen der Rotation ist noch nicht zu bemerken. Vereinzelte junge Haare haben ihren Inhalt ausgespritzt, ihr totes Plasma färbt sich karmin. Eine Färbung des lebenden Plasmas tritt nicht ein, kann aber durch die von Membran und Zellsaft vorgetäuscht werden. Nach 3 Stunden rotiert das Plasma immer noch lebhaft. Im Zellsaft befinden sich allgemein sehr zahlreiche Kügelchen, aber nur noch wenige Kristalle. Nach 4 Stunden haben sich die Kugeln vielfach zu dichten dunkelkarminroten Haufen geballt. Die Rotation ist nur in ganz jungen Haaren etwas langsamer geworden. Nach 5 Stunden sind die Kugeln meist zu dicken Klumpen verklebt, die sich im Haar festklemmen und dann das Plasma anstauen können. Im Zellsaft solcher Haare schwimmen noch einige Kügelchen und ganz vereinzelt Kristallsternchen. Nach 6 Stunden ist die Ballung noch weiter fortgeschritten. Die Rotation hat allgemein etwas nachgelassen, in ganz vereinzelt Fällen ist Stillstand eingetreten.

Lösungen von Neutralrot in abgestandenem Leitungswasser sind orangefarben infolge der basischen Reaktion des Lösungsmittels, es entstehen gelegentlich auch Niederschläge. Die Wirkung auf die Zelle ist die gleiche wie beschrieben.

Neutralrot ist, wie man sieht, verhältnismäßig wenig giftig, so daß man wohl schon von Färbung des Zellinhaltes im Leben sprechen

kann. Natürlich würde sich auch noch eine schwächere Konzentration anwenden lassen, aber sicherlich auf Kosten der Erscheinungen im Zellsaft. Die hier gebotene dürfte sich nahe an der Grenze der für das Objekt stark schädlichen Dosis bewegen.

Safranin. 0,00005 % (1 : 2000000) in Aqua dest.

Die Membran färbt sich ganz schwach orange. Nach 2 $\frac{1}{2}$ Stunden ist die anfangs lebhaft rotierende in alten Haaren stark verlangsamt, in jüngeren dagegen noch ungestört. Im Zellsaft alter Haare zeigen sich hellkarminfarbene Wolken, die infolge der Rotation zu kugligen Ballen zusammengeschwemmt werden. Vereinzelt junge Haare haben ihren Inhalt ausgespritzt, ihr totes Plasma färbt sich karmin. Nach 3 Stunden sind die Haare mit Niederschlag häufiger geworden, die Rotation in diesen hat meist aufgehört. Nach 4 Stunden zeigen auch die jüngeren Haare Niederschlag. Es bildet sich in jedem Haar nur eine geringe Menge, die sich zu einem oder mehreren runden Klumpen ballt durch die Rotation. Diese ist in ganz jungen Haaren noch lebhaft. Nach 5 Stunden ist der Niederschlag allgemein geworden und die Rotation überall stark verlangsamt oder eingestellt. Nach 6 Stunden sind einige ältere Haare mit reichlichem Niederschlag abgestorben, ihr Plasma hat sich karmin gefärbt und kontrahiert. Die Rotation hat auch in jungen Haaren stark nachgelassen und ist vielfach kaum noch festzustellen. In den Epidermiszellen der Wurzel hat sich ebenfalls ein Niederschlag gebildet, er ist aber mehr zinnoberrot.

Lösungen in abgestandenem Leitungswasser können etwas stärker gewählt werden, sie haben die gleiche Wirkung.

Nunmehr mag über die Untersuchungen an der Epidermis von *Tradescantia virginica* kurz berichtet werden. In der Mitte der Zellen ist der Kern an Plasmasträngen aufgehängt, die Zirkulation zeigen. Die Bewegung ist infolge der großen Feinheit des ganzen Baues der Zelle etwas schwierig zu beobachten, indessen doch deutlich. Im Zellsaft befinden sich kugelige Gebilde, die gewöhnlich in großer Zahl an der Plasmahülle des Kernes haften, doch können sie auch mit der Zirkulation durch die ganze Zelle geschleppt werden. Nur in lebenden, normalen Zellen wurden sie gesehen.

Chrysoidin. 0,0004 % (1 : 250000).

Das Plasma färbt sich, auch die Membranen, doch diese mit einem anderen Ton, so daß der Plasmabelag beiderseitig gut zu

unterscheiden ist. Sehr stark speichern die Schließzellen der Spaltöffnungen den Farbstoff. Nach 6 Stunden ist alles noch ganz normal. Durch Plasmolyse kann der Nachweis erbracht werden, daß besonders in den Schließzellen wirklich der Protoplast gefärbt ist, nicht etwa nur Membranteile.

Methylenblau. 0,001 % (1 : 100000), [0,002 % war wirkungslos].

Der Zellsaft färbt sich blau, desgleichen die Membran. Nach 6 Stunden konnte weder eine Schädigung noch sonst irgend eine andere Wirkung festgestellt werden. Die Nebenzellen der Schließzellen bleiben ungefärbt, sei es, daß sie überhaupt keinen Farbstoff aufnehmen, oder daß dieser in eine Leukoverbindung verwandelt wird.

Weil sich in diesen beiden Fällen herausstellte, daß die Farbstoffe infolge der Kutikula, die noch dazu einen Wachsbelag trägt, sehr schlecht Zutritt zum Protoplasten finden, daß die Zellen sich sehr ungleichmäßig färben, und da noch technische Schwierigkeiten, wie z. B. starke Neigung zum Einrollen der Epidermisstücke, hinzukamen, wurde das Objekt aufgegeben. Solche aus dem Verband gelöste Gewebeteile, denen noch dazu der Aufenthalt im Wasser fremdartig ist, befinden sich ja auch bei den Versuchen sicherlich nicht in normalem Zustand, worauf an früherer Stelle bereits eingehend hingewiesen worden ist. Diese beiden Versuche sollen bei den folgenden Ausführungen auch unberücksichtigt bleiben.

Abschnitt II.

Saure Farbstoffe.

Säurefuchsin. Den Lösungen in Aqua dest. und in abgestandenem Leitungswasser gegenüber verhalten sich die Zellen ganz verschieden.

0,01 % (1 : 10000) in Aqua dest. hatte binnen 6 Stunden die einzige Wirkung, daß einzelne Haare an der Spitze platzen und ihren Inhalt portionsweise ausspritzen.

Bei 0,02 % explodieren nach wenigen Minuten fast alle Wurzelhaare.

Um festzustellen, ob an dieser so heftigen und eigenartigen Wirkung etwa das destillierte Wasser schuld sei, wurde auf dieselbe Wurzelspitze zunächst dieses allein gegeben, wodurch die Wurzelhaare in keiner Weise geschädigt wurden. Darauf wurde

die Farbstofflösung (0,02%) verabfolgt, und alsbald setzte das Platzen der Haare ein, die nach 10 Minuten sämtlich explodiert waren. Demnach kann nur der Farbstoff verantwortlich gemacht werden, zumal das verwendete destillierte Wasser aus der gleichen Flasche stammte und die Versuche am gleichen Vormittag angestellt wurden.

0,02% in abgestandenem Leitungswasser. Die Lösung ist viel heller als eine von gleicher Konzentration in Aqua dest. und besitzt einen orangefarbenen Ton. Besonders auffällig ist das bei dünnen Schichten auf dem Objektträger unter dem Mikroskop. Daß der Grund für die Änderung der Farbe in der basischen Reaktion des Leitungswassers zu suchen ist, wurde schon eingangs erwähnt.

Nach $\frac{1}{4}$ Stunde treten bei allen Wurzelhaaren im Zellsaft, der selbst keine Speicherung zeigt, hellorangefarbene, große, wolkige Ballen auf, die durch die Rotation abgerundet werden. Die Membran färbt sich rosa. Man sieht auch eine Menge orangefarbener Körnchen im Zellsaft. Es ist gut zu beobachten, wie die Kristallaggregate ihre Form verlieren und sich unter lebhafter molekularer Bewegung in amorphe Körperchen verwandeln, die sich färben; sie bleiben bei Berührung aneinander hängen und bilden jene Ballen, die mit der Zeit immer kompakter und kräftiger in Farbe werden. Nach einer Stunde sind schon eine ganze Menge Haare fast frei von Kristallen und enthalten dafür dichte orangefarbene Ballen und viele Körnchen. Nach 2 Stunden ist dieser Vorgang noch weiter fortgeschritten und Kristalle kaum noch zu finden. In alten Haaren hat die Rotation aufgehört. Nach 3 Stunden ist die Rotation in jüngeren Haaren immer noch lebhaft im Gange. Die Ballen, die immer fester und kleiner geworden sind, sind fast überall durch die Rotation in den basalen erweiterten Teil der Haare geschleppt worden. Im Zellsaft finden sich noch wenige orangene Körnchen, aber so gut wie keine Kristalle mehr. Nach 4 Stunden ist die Rotation allgemein etwas verlangsamt. Nach 5 Stunden sind die alten Haare tot, ihr Plasma desorganisiert und rot gefärbt. Der Zellsaft der unversehrten Haare sieht jetzt fast leer aus, da die Körnchen sich zum größten Teil mit den Ballen in der Haarbasis vereinigt haben. Nach 6 Stunden ist das Plasma der jüngeren Haare immer noch in langsamer Bewegung.

Die Giftigkeit von Säurefuchsin nimmt beim Stehen der Farblösungen ab. Es wurde einmal eine 2 Tage alte Lösung in Leitungs-

wasser von 0,1% (1:1000) gegeben, die an Farbe stark verloren hatte. Dieser gegenüber verhalten sich die Wurzelhaare hinsichtlich der Verwandlung der Kristalle im Zellsaft wie beschrieben, ein Nachlassen der Rotation war dagegen nicht zu bemerken. Entweder ist die im basischen Wasser entstandene Leukoverbindung nicht giftig oder sie wird überhaupt nicht aufgenommen, sondern nur die übrig gebliebenen ungebundenen Farbstoffteilchen, die dann eine sehr dünne Lösung ausmachen würden.

Von sauren Farbstoffen wurden ferner noch geboten: Methylorange, Tropaeolin 00 und 000, Bordeauxrot, Orange, Anilinblau, Kongorot, doch konnte für keinen eine Wirkung oder überhaupt Aufnahme festgestellt werden außer Membranfärbungen.

Man könnte einwenden, eine Beobachtungszeit von 6 Stunden genüge für die sauren Farbstoffe nicht, sie brauchten lange Zeit zum Eindringen in die Zellen, wie Versuche an anderen Objekten ergeben haben (Pfeffer 1886, Ruhland 1908 u. 1912). In manchen Fällen wird allerdings auch sehr schnelle Aufnahme angegeben (Ruhland 1912). Indessen bin ich der Ansicht, daß diese Farbstoffe in die voll lebensfähigen Wurzelhaare von *Hydrocharis Morsus ranae* und gewiß auch in die Zellen anderer Pflanzen, bei denen lange Zeit zur Aufnahme erforderlich ist, keinen Eingang finden, sondern erst wenn die Zellen sich infolge von veränderten Lebensbedingungen nicht mehr im normalen Zustand befinden. Schnelle Aufnahme mancher Farbstoffe scheint überhaupt für starke Abnormität einer Zelle zu sprechen nach den Untersuchungen von Collander (1921, S. 371). Eine Entfärbung der Farbstoffe in den Zellen, deren Möglichkeit derselbe Autor (1921) nachgewiesen hat, kommt für das vorliegende Objekt nicht in Frage, denn gerade das leicht reduzierbare Säurefuchsin wird ganz beträchtlich sichtbar gespeichert und Methylenblau ebenfalls nicht reduziert; ferner ist auch Zucker in den Wurzelhaaren nicht nachzuweisen.

Abschnitt III.

Zusammenfassung.

Die Beobachtungen über das Verhalten der Wurzelhaare von *Hydrocharis Morsus ranae* gegenüber den angewandten Farbstoffen haben, um eine kurze Übersicht zu bieten, folgendes ergeben.

Eine Speicherung im lebenden, ungeschädigten Plasma besteht nur bei Chrysoidin. Die Einwendungen von A. Meyer (1920, S. 477, 478) gegen die gleiche Angabe von Ruhland (1912, S. 381 u. 425) sind nicht gerechtfertigt, stützen sich auch nicht auf eigene Beobachtungen. Auch Prune pure soll nach Ruhland (a. a. O.) Plasmafärbung im Leben bewirken, doch stand mir dieser Farbstoff für eine Nachprüfung leider nicht zur Verfügung.

Färbung des Plasmas mit Bismarckbraun und Gentianaviolett tritt nur ein, wenn die Zelle geschädigt ist, und ist sicherer Vorbote des Todes. A. Meyer (1920, S. 478) behauptet freilich, daß auch das kranke Plasma keine Farbstoffe speichere, doch ist bei Gentianaviolett dessen violette Färbung neben den mehr bläulichen Mikrosomen durchaus deutlich.

Ob in diesen Fällen die Lipoide, die hydroiden Bestandteile des Plasmas oder das Wasser als Dispersionsmittel den Farbstoff festhalten, ist nicht feststellbar.

Eine Färbung des Kernes *intra vitam* wurde in keinem Falle gefunden. Sie kann gelegentlich vorgetäuscht werden, wenn die den Kern einschließende Plasmaschicht gefärbt wird, wie das bei den Epidermiszellen von *Tradescantia virginica* leicht erkenntlich ist. Darum brauchen jedoch die Angaben anderer Autoren darüber für andere Objekte nicht unrichtig zu sein, nur scheint mir Vorsicht geboten.

Methylviolett und Gentianaviolett werden in den Mikrosomen gespeichert, doch ist damit eine tiefgreifende Schädigung verbunden in Anbetracht der außerordentlichen Giftigkeit der Farbstoffe.

In allen Fällen, wo Reaktionen im Zellsaft erfolgen, muß natürlich der Farbstoff in diesen Eingang finden, mag er nun an diesem selbst sichtbar werden durch Speicherung oder unsichtbar bleiben, falls seine Konzentration im Zellsaft die gleiche ist wie in der Lösung oder falls er sofort irgendwie gebunden wird.

Einen Niederschlag im Zellsaft rufen Methylviolett, Gentianaviolett und Safranin hervor, seine Natur ist zweifelhaft.

Mit den Kristallaggregaten von Eiweißcharakter im Zellsaft treten unter Umwandlung dieser in Körnchen oder Kügelchen in Bindung Bismarckbraun, Methylenblau, Neutralrot und Säurefuchsin, nach dem Tode auch Methylviolett. Ob nun der Farbstoff unmittelbar mit den Kristallen

reagiert, oder ob diese infolge allgemeiner Schädigung der Zelle zuvor die Kristallform verlieren und ihre Umwandlungsprodukte sich dann färben, vermag ich nicht sicher zu entscheiden. Ich möchte freilich das letztere annehmen, denn ich habe gesehen, wie bei Behandlung der Wurzelhaare mit frischem Leitungs- und mit gekauftem dest. Wasser sich die Kristalle gleichfalls in amorphe Körperchen verwandeln, während oder worauf bald eine Schädigung der Zelle in Verlangsamung der Rotation offenbar wurde. Ferner ist zu beachten, daß bei Anwendung von Farbstoffen aus den Kristallen erst jene farblosen Körperchen werden und nachher deren Färbung eintritt, indem sie meist Kugelgestalt annehmen.

Gerbsäure ist bei dieser Bindung der Farbstoffe und bei den Niederschlägen nicht im Spiele; denn sie ist in den Wurzelhaaren nicht nachzuweisen. Auch Pfeffer (1886, S. 190, 214, 231, 236) hat mehrfach Fällungen bei Abwesenheit von Gerbsäure beobachtet.

Man wird bei den speziellen Beobachtungen bemerkt haben, daß die meisten der Farbstoffe deutlich unterschiedene Tönungen bei der Speicherung in den einzelnen Bestandteilen der Zelle, in Niederschlägen und dergleichen annehmen. Daraus lassen sich Schlüsse auf deren basische oder saure Reaktion ziehen.

Zunächst soll gezeigt werden, wie sich dünne Farbstofflösungen gegenüber Basen und Säuren verhalten. Methylenblau scheidet dabei aus, da es von diesen nicht verändert wird. Als Basen wurden angewandt: Ammoniak, Natronlauge und Kalilauge; als Säuren: Salzsäure, Schwefelsäure, Oxalsäure, Tannin und Äpfelsäure.

Chrysoidin — mit allen Basen: gelber Niederschlag; mit allen Säuren: rotbraun.

Bismarckbraun — mit allen Basen: gelb; mit allen Säuren: gelbbraun.

Methylviolett — NH_3 : langsame Entfärbung; NaOH : rötlich; KOH : rotviolett; HCl , H_2SO_4 und $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ schwach: blau; stark: grün; $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_9$ und $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$: blau.

Gentianaviolett — NH_3 : langsame Entfärbung; NaOH : rötlich; KOH : violett mit rotem Ton; HCl , H_2SO_4 und $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ schwach: blau; stark: grün; $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_9$ und $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$: blau mit violettem Ton.

Neutralrot — NH_3 und NaOH : orange mit Niederschlag; KOH : orange; mit sämtlichen Säuren: karmin.

Safranin — mit allen Basen: rot; HCl und H_2SO_4 : tiefrot mit karmin Ton; $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$, $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_9$ und $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$: hellkarmin.

Säurefuchsin — alle Basen schwach: orange; stark: Entfärbung; mit allen Säuren: kräftig rot.

Daraus ergibt sich für die Reaktion der Zellbestandteile folgendes.

Das lebende bzw. noch lebende Plasma färbt sich mit Chrysoidin gelb, ebenso mit Bismarckbraun und mit Gentianaviolett violett, ist also basisch. Die Tönungen von Chrysoidin und Bismarckbraun sind allerdings nur bei einiger Übung richtig einzuschätzen, da ja die beiden Farbstoffe an sich schon in dünner Lösung gelblich sind; dagegen ist bei Gentianaviolett gegenüber dessen etwas ins Bläuliche gehender Lösung das reine Violett des Plasmas durchaus eindeutig.

Das tote Plasma färbt sich mit Bismarckbraun bräunlich, mit Methylviolett und Gentianaviolett blau, mit Neutralrot und Safranin karmin und mit Säurefuchsin intensiv rot. Dies läßt unzweifelhaft auf saure Reaktion schließen. Besondere Beachtung verdient Gentianaviolett, das ja das noch lebende Plasma violett färbt; denn man kann den Übergang in Blau beim Tode unmittelbar beobachten. Und diese Umfärbung tritt ein, noch ehe irgend eine Desorganisation erfolgt, sie ist also das erste Anzeichen des Todes.

Über die Mikrosomen läßt sich nicht mit voller Sicherheit etwas aussagen; denn infolge ihrer geringen Größe ist der Farbenton, den sie mit Methyl- und Gentianaviolett annehmen, nicht genau festzustellen. Da er mir indessen bläulich erschien, wäre den Mikrosomen mit Vorbehalt saure Reaktion zuzusprechen.

Der Zellsaft zeigte, wo er überhaupt Farbstoff speichert, den gleichen Ton wie die Lösung, ist also wohl neutral.

Die Niederschläge im Zellsaft sind sauer; denn sie nehmen bei Methyl- und Gentianaviolett blauviolette, bei Safranin hellkarmin Farbe an.

Die Umwandlungsprodukte der Kristalle färben sich mit Bismarckbraun bräunlich, mit Methylviolett nach dem Tode der Zelle bläulich und mit Neutralrot karmin, reagieren demnach mit allen basischen in Aqua dest. gelösten Farbstoffen sauer. Dagegen zeigen sie mit Säurefuchsin gelöst im alkalischen Leitungswasser unverkennbar orange Färbung und wären daher basisch. Dieser Gegensatz erklärt sich vielleicht so, daß aus dem Farbstoff mit den Karbonaten des Lösungsmittels eine so starke Base wird, daß die an sich saure Reaktion der Verwandlungsprodukte übertönt wird.

Alle diese Ergebnisse stimmen mit unseren bisherigen Kenntnissen über die Reaktion der Zellbestandteile überein, und die benutzten Farbstoffe können gewiß für derartige Untersuchungen an anderen Objekten bei geeigneter Versuchsanstellung gute Dienste leisten.

Für das so eigentümliche Platzen der Haare an den Spitzen und das folgende wiederholte Ausspritzen des Zellinhaltes bei Gentianaviolett, Methylenblau, Neutralrot, Safranin und besonders bei Säurefuchsin, in Aqua dest. gelöst, vermag ich leider keine Erklärung zu geben, die mich befriedigte. Daß die Farbstoffe diese Wirkung verursachen und nicht das destillierte Wasser, ist nach den Versuchen mit Säurefuchsin wohl sicher. Aber was mag zu einer so bedeutenden Steigerung des Innendruckes, daß die Wand gesprengt wird, führen? Sollte die Regulierung der Wassereinfuhr gestört werden? Der Turgor muß auch nach der ersten Explosion wieder wachsen, um eine zweite zu bewirken, und so fort, so lange die Zelle noch einigermaßen lebensfähig ist. Eine Herabsetzung des Druckes der Lösung kann schwerlich in Frage kommen; denn in diesem Falle würden die Haare nur einmal platzen. Ganz merkwürdig ist, daß gerade junge Haare betroffen werden, deren Protoplasten sich doch sonst am widerstandsfähigsten zeigen. Ihre im Wachstum begriffene Membran mag freilich nicht so stark sein wie die älterer Wurzelhaare, indessen kommt es auf sie allein hier ja nicht an.

Diese sämtlichen Ergebnisse in bezug auf den Chemismus der Zelle auszuwerten, fühle ich mich nicht berufen, das muß auf dem Gebiete der Biochemie wohl erfahrenen Autoren überlassen bleiben, und selbst diese sind ja, wie erwähnt, zu ganz verschiedenen Theorien gelangt. Jedenfalls bedarf es noch vieler eingehenden Untersuchungen, um auf diesem Gebiete klarer zu sehen.

Zum Schlusse sei nochmals betont, daß die vorliegenden Beobachtungen nur für die Wurzelhaare von *Hydrocharis Morsus ranac* gelten, und zwar unter den erörterten Kautelen, und daß sie nicht ohne weiteres auf „die Zelle“ übertragen werden dürfen, wenn sie freilich auch für andere Objekte gewisse Anhaltspunkte bieten können.

Breslau, Pflanzenphysiologisches Institut.
November 1922.

Literatur.

- Collander, R., 1921, Über die Permeabilität pflanzlicher Protoplasten für Sulfosäurefarbstoffe. *Jahrb. f. wiss. Bot.*, Bd. 60.
- Czapek, F., 1915, Ausblicke auf biologische Adsorptionserscheinungen. *Jahrb. f. wiss. Bot.*, Bd. 56.
- —, 1919, Zum Nachweis von Lipoiden in Pflanzenzellen. *Ber. d. Deutsch. Bot. Ges.*, Bd. 47.
- Meyer, A., 1920, Analyse der Zelle der Pflanzen und Tiere. I.
- Overton, E., 1900, Studien über die Aufnahme der Anilinfarben in die lebende Zelle. *Jahrb. f. wiss. Bot.*, Bd. 34.
- Pfeffer, W., 1886, Über die Aufnahme von Anilinfarben in die lebende Zelle. *Untersuchungen a. d. Bot. Inst. Tübingen*, II.
- Rubland, W., 1908, Beiträge zur Kenntnis der Permeabilität der Plasmahaut. *Jahrb. f. wiss. Bot.*, Bd. 46.
- —, 1912, Studien über die Aufnahme von Kolloiden durch die pflanzliche Plasmahaut. *Jahrb. f. wiss. Bot.*, Bd. 51.

Eine umfassende Zusammenstellung der gesamten Literatur findet sich in der obigen Abhandlung von Collander. Viele dieser Arbeiten sind in dem genannten Buche von A. Meyer besprochen.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik](#)

Jahr/Year: 1923

Band/Volume: [62](#)

Autor(en)/Author(s): Schaede Reinhold

Artikel/Article: [Über das Verhalten von Pflanzenzellen gegenüber Anilinfarbstoffen. 65-91](#)