Über die Wirkung wässeriger Lösungen oberflächenaktiver Substanzen auf die Chlorophyllkörner.

Von

Erna Liebaldt.

Mit einer Doppeltafel.

LIB
NEW
BOTA
GAR

I. Einleitung.

Nachdem eine Methode bekannt geworden ist, die es erlaubt, die normale Oberflächenspannung der Plasmahaut von Pflanzenzellen quantitativ zu bestimmen[1], erschien es wünschenswert die messenden Feststellungen auch auf die lebenden Einschlüsse des Protoplasmas auszudehnen und deren Verhalten zu wässerigen Lösungen oberflächenaktiver Substanzen zu studieren.

Czapek stellte die Grenzkonzentrationen wässeriger Lösungen oberflächenaktiver Stoffe von bekannter Oberflächenspannung fest, welche eben imstande sind, die Exosmose von leicht nachweisbaren Zellinhaltsstoffen zu bewirken. Es zeigte sich dabei, daß diese Grenzkonzentrationen äquikapillar sind, d. h. daß sie die gleiche Oberflächenspannung besitzen. Dabei erfolgt eine irreversible Schädigung der Zelle. Diese für die verschiedensten Substanzen festgestellten Grenzkonzentrationen (untersucht wurden einwertige Alkohole, Ketone und Ester derselben, ungesättigte Alkohole, mehrwertige Alkohole und Ester derselben und andere oberflächenaktive Substanzen in wässeriger Lösung sowie oberflächenaktive Kolloidlösungen) entsprechen bei Zellen höherer Pflanzen einheitlich einer Oberflächenspannung von etwas weniger als 0,69 der des Wassers gegen Luft. Daraus

[1]) Czapek, Fr., Über eine Methode zur direkten Bestimmung der Oberflächenspannung der Plasmahaut von Pflanzenzellen. Jena. 1911.

trationen zu lösen als nach Abkühlen in denselben löslich ist. In einigen Konzentrationen, in welchen bei Zimmertemperatur noch nicht die geringste Fluoreszenz wahrzunehmen war, konnte eine solche nach Erhöhung der Temperatur selbst um wenige Grade auftreten und recht deutlich werden.

Bei Anwendung von Chlorophyllextrakten aus Selaginella Martensii wurde die Chlorophyllösungsgrenze bei 18° C festgestellt

für Methylalkohol bei 59%
„ Äthylalkohol „ 44%
„ n-Propylalkohol „ 25%

Iso-Butyl und Iso-Amylalkohol lösen auch in ihren konzentrierten wässerigen Lösungen und selbst bei erhöhter Temperatur Chlorophyll nicht in nachweislichen Mengen. Höhere Alkohole wurden, ihrer geringen Wasserlöslichkeit wegen, nicht untersucht. Die ermittelten Zahlen brauchen für Chlorophyllextrakte aus verschiedenen Pflanzen, wegen des Wechsels der Begleitstoffe nicht vollständig genaue Geltung zu haben. In der Tat sind zuweilen Schwankungen um einige Prozent beobachtet worden.

Beziehungen der ermittelten Werte zur Größe der Oberflächenaktivität des Lösungsmittels sind nicht vorhanden.

III. Mikroskopisch sichtbare Veränderungen an den Chloroplasten unter dem Einflusse von Wasser und verdünntem Alkohol.

Lösung und Exosmose der Farbstoffe sind nicht die ersten Veränderungen die sich als Wirkung oberflächenaktiver wässeriger Lösungen an den Chloroplasten bemerkbar machen. Schon in Konzentrationen weit unter der Lösungsgrenze des Chlorophylls lassen sich mikroskopische Veränderungen beobachten. Es stellt der Vorgang der Farbstoffexosmose vielmehr das Endglied einer Reihe von Erscheinungen dar, die regelmäßig zu beobachten sind, wenn man Chloroplasten in aufsteigenden Konzentrationen eines oberflächenaktiven Lösungsmittels untersucht.

Bei der Einwirkung verdünnter Alkohole auf die Chloroplasten lassen sich verschiedene Stadien der Veränderungen unterscheiden die von der Konzentration und von der chemischen

Natur des betreffenden Alkohols abhängig sind. Man darf jedoch nicht erwarten, daß man bei den Chloroplasten aller Pflanzen durch eine bestimmte Konzentration eines bestimmten Alkohols ausschließlich ein bestimmtes Stadium mit Sicherheit erhält. Es treten vielmehr häufig Differenzen zwischen den verschiedenen untersuchten Objekten und selbst zwischen den Chloroplasten in Schnitten aus verschiedenen Teilen eines und desselben Objektes, ja in den Zellen eines Schnittes zutage. Man kann nicht darauf rechnen, daß der Alkohol in alle Zellen mit der gleichen Schnelligkeit eindringt. Dazu kommt noch, daß die einzelnen Stadien sich ganz allmählich einstellen und dadurch vielfach ineinander übergreifen. Es muß also von vornherein berücksichtigt werden, daß man bei Anwendung einer bestimmten Konzentration verschiedene graduelle Übergänge der Veränderungen finden wird. Immerhin stellt sich an der Hand zahlreicher Versuche ein gewisses Bild heraus, welches die fortschreitenden Veränderungen der Chloroplasten unter dem Einfluß steigender Alkoholkonzentration umfaßt.

Da zwischen naheliegenden Konzentrationen eines Alkohols in der Wirkung auf die Chlorophyllkörner selten scharfe Unterschiede zu beobachten sind, so konnte ich mich auf die Anwendung einiger weniger Konzentrationen beschränken; es handelte sich nur darum, dieselben so zu wählen, daß alle mikroskopisch unterscheidbaren Stadien der Veränderungen in lückenloser Reihenfolge zur Beobachtung kamen.

Nach den ersten orientierenden Versuchen mit einer größeren Zahl von Verdünnungen kamen meist folgende Konzentrationen der verschiedenen Alkohole zur Anwendung:

Methylalkohol: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 %
Aethylalkohol: 5, 10, 20, 30, 50 %
Normal-Propylalkohol: 2,5, 5, 7,5, 10, 20, 30 und eventuell 40, 50 %
Isobutylalkohol: 1,08, 2,17, 4,3, 5,8, 8,7 %
Isoamylalkohol: 1,25, 2, 2,5 %

Die Konzentrationen von Butyl- und Amylalkohol wurden so hergestellt, daß die konzentrierte wässerige Lösung auf $^2/_3$, $^1/_2$, $^1/_4$, $^1/_8$ resp. $^4/_5$, $^1/_2$ verdünnt wurde. Höhere Alkohole kamen, ihrer geringen Wasserlöslichkeit wegen, nicht zur Verwendung.

Als niederste Konzentrationen wurden jene gewählt in denen

nach vier- bis sechsstündiger Einwirkungsdauer bei den meisten Objekten eben die ersten Veränderungen an den Chloroplasten der unverletzten Zellen zu beobachten waren. Nur bei Butyl- und Amylalkohol hätten vielleicht noch etwas niedrigere Konzentrationen gewählt werden können.

Die Veränderungen, die sich nach einer gewissen Einwirkungsdauer als Endresultat der Wirkung einer bestimmten Alkoholkonzentration beobachten lassen, stellen sich auch ein, wenn man die nächst höhere der angeführten Konzentrationen anwendet, nur meist schon nach viel kürzerer Zeit. Offenbar dauert es eine gewisse Zeit, bis sich ein osmotischer Ausgleich zwischen Zellinhalt und Außenflüssigkeit hergestellt hat. Es muß also die Alkoholkonzentration in der Zelle allmählich ansteigen, wobei jene Stadien, welche sich als endliche Einstellung der Chloroplasten auf niedrigere Konzentrationen beobachten ließen, rasch durchlaufen werden. Es lassen sich daher bei Anwendung der höheren Konzentrationen nach kurzer Einwirkungsdauer häufig in verschiedenen Zellen eines Schnittes noch alle Stadien nebeneinander beobachten. Bei Anwendung von Konzentrationen, welche sich der Lösungsgrenze des Chlorophylls nähern oder dieselbe etwas überschreiten, kann man den Beginn und das Fortschreiten der Veränderungen mit Leichtigkeit verfolgen, wenn man den Alkohol direkt unter dem Mikroskop auf das betreffende Objekt einwirken läßt.

Dadurch, daß die Herstellung des Konzentrationsgleichgewichtes allmählich erfolgt, geht die Schärfe der Abstufungen zwischen der Wirkung der einzelnen Konzentrationen verloren und die einzelnen Stadien greifen vollständig in einander über. Nach 24 Stunden hat sich der Gleichgewichtszustand sicher eingestellt und es ist nach Ablauf dieser Zeit meist keine Zunahme der Veränderungen an den Chloroplasten mehr zu beobachten, außer in sehr niederen Konzentrationen, in denen die Zellen nur langsam desorganisiert werden und bei Anwendung höherer Alkohole, welche langsamer einzudringen scheinen, sodaß die Einstellung des Gleichgewichtes längere Zeit, oft mehrere Tage erfordert. Es wurde jedoch zu den Beobachtungen eine kürzere Einwirkungsdauer gewählt, nämlich vier bis sechs Stunden, nach welcher Zeit mit reinem destillierten Wasser wenigstens

an den Chloroplasten der normalen unverletzten Zellen noch keine Veränderungen zu bemerken sind, während sich nach 24 Stunden in Zellen, welche der Wirkung von Wasser ausgesetzt waren, an den Chloroplasten vielfach schon die ersten Desorganisationserscheinungen zeigen. Die Präparate wurden außerdem nach 24 Stunden, bei Anwendung von Butyl- und Amylalkohol auch nach mehreren Tagen, wieder kontrolliert.

Die Verdünnung der Alkohole auf die gewünschten Konzentrationen geschah in der Weise, daß auf die abgemessene Alkoholmenge im Meßglas Wasser bis zur Marke aufgefüllt wurde, also unter Außerachtlassung der Volumskontraktion bei der Mischung von Alkohol und Wasser. Die Alkohollösungen wurden für jedes Objekt frisch hergestellt und, nach Eintragen der Schnitte, in gut schließenden Pulvergläsern kühl und dunkel aufbewahrt. In der Wärme werden alle Desorganisationserscheinungen, namentlich die im Wasser zu beobachtenden sehr beschleunigt, das Chlorophyll wird rasch zersetzt und nimmt einen braungrünen Farbenton an. Auch am Licht verändert sich der Chlorophyllfarbstoff bekanntlich schon nach kurzer Zeit.

Dem Chlorophyllkorn wird vielfach eine bestimmte körnige Struktur zugeschrieben, die auf Einlagerung zahlreicher grüner Tröpfchen oder Körnchen in die Poren der farblosen Grundsubstanz beruhen soll. Es ist jedoch wiederholt von den Autoren betont worden, daß diese Struktur der Chloroplasten nicht unter allen Umständen und nicht bei jedem Objekt gleich deutlich zu beobachten ist; häufig sind energische Eingriffe notwendig um dieselbe sichtbar zu machen. Soweit meine Beobachtungen reichen, kann ich sagen, daß in weitaus den meisten Fällen eine bestimmte räumliche Verteilung ihrer beiden Komponenten sich nicht unterscheiden läßt. Sie erscheinen ganz homogen grün oder höchstens etwas feinkörnig. Nur da wo zahlreiche sehr kleine Stärkekörnchen in den Chloroplasten enthalten sind, kann zuweilen das Vorhandensein einer Struktur vorgetäuscht werden, indem die Stärkekörnchen hell durch die grüne Hülle hindurchschimmern.

Um wirklich normale Chloroplasten in der intakten lebenden, unter günstigen Vegetationsbedingungen stehenden Zelle zu beobachten, wählt man am besten Pflanzen mit sehr dünnen

Blättern, die man unzerschnitten unter das Mikroskop bringen kann, etwa Muium, oder besser noch Wasserpflanzen, deren Blätter man zum Zwecke der mikroskopischen Untersuchung nicht einmal in ein anderes als das sie gewöhnlich umgebende Medium zu übertragen braucht wie Elodea, Riccia, Lemna trisulca o. a. Als ein für das Studium lebender Chlorophyllkörner besonders geeignetes Objekt erwies sich Vallisneria spiralis. Stärkearme Chloroplasten dieser Pflanze erscheinen meist ganz gleichmäßig grün gefärbt und lassen keinerlei mikroskopische Differenzierungen erkennen. Schwach gekörnt erscheinende Chloroplasten wurden häufig beobachtet bei Hartwegia comosa, Hyacinthus orientalis, Yucca, zuweilen auch bei Tradescantia viridis, Pinus silvestris, Vinca minor, dem Gartenstiefmütterchen, und anderen. Im allgemeinen scheint das normale Aussehen der Chloroplasten zu wechseln mit dem Alter der Blätter, dem Wassergehalt und vielleicht auch mit den Vegetationsbedingungen, etwa der Temperatur, der Belichtung, vor allem aber mit der Natur der Assimilationsprodukte. Chloroplasten, welche ölartige Substanzen als erstes mikroskopisch nachweisliches Assimilationsprodukt führen, haben oft ein mehr gekörntes oder feintropfiges Aussehen. Jedenfalls muß man die Beobachtungen auf möglichst viele verschiedene Pflanzen erstrecken, um ein allgemeines Urteil über das Aussehen normaler Chlorophyllkörner zu gewinnen. Häufig ist zu beobachten, daß auch innerhalb eines und desselben Blattschnittes die Chloroplasten nicht völlig gleich aussehen, indem etwa die einen homogen, die anderen körnig erscheinen, oder indem an einzelnen Chloroplasten Unregelmäßigkeiten der Gestalt zu beobachten sind. Ferner zeigen oft die Chloroplasten verschiedener Zellschichten eines Blattes kleine Unterschiede, und Chlorophyllkörner in jüngeren Pflanzenteilen sind von solchen in älteren zuweilen leicht zu unterscheiden.

Ihr völlig normales Aussehen bewahren die Chloroplasten in den zum Zweck der mikroskopischen Untersuchung hergestellten Blattschnitten nicht lange Zeit. In unverletzten Zellen bleiben sie in Wasser wenigstens 4 bis 6 Stunden lang sicher unverändert. Wo dagegen die Zellen beim Ausführen des Schnittes verletzt wurden, gewinnen die Chloroplasten häufig nach kürzester Zeit ein völlig verändertes Aussehen. Beim Eintragen

in Wasser quellen sie fast momentan stark auf und nehmen bald ein Vielfaches ihres ursprünglichen Volumens ein. Dabei treten sie aus den Zellen hervor und bilden bald unregelmäßige, klumpige, stark körnelige Massen (Fig. 1), bald erscheinen sie gleichmäßig blasenförmig aufgetrieben und der Farbstoff, der vorher scheinbar das ganze Chlorophyllkorn gleichmäßig tingierte, ist jetzt weniger fein im Stroma verteilt. Es macht den Eindruck, als sei er in Form sehr kleiner Tröpfchen oder Körnchen über die auf das Vielfache vergrößerte Oberfläche des Stromas verteilt. Häufig hat es den Anschein, als entstünde beim Eintragen in Wasser im Innern des Chlorophyllkornes plötzlich eine Vakuole, die sich rasch vergrößert. Die gefärbte Substanz erscheint dann als ein kappenförmiger Überzug auf der einen Seite des Bläschens (Fig. 2). Wo die Chloroplasten in der verletzten Zelle zurückgeblieben sind, da erfüllen sie dieselbe als eine bald dichte, körnige, bald grobvakuolige, schaumige Masse. Fig. 3 stellt den letztgenannten Fall an quer durchschnittenen Palissadenzellen eines Blattes des Gartenstiefmütterchens dar. Die Erscheinung dieser plötzlichen Verquellung läßt sich nicht bei allen Objekten gleich leicht beobachten. Besonders geeignet sind in dieser Hinsicht einige Monokotyledonen: Crinum, Vallisneria, Hyacinthus, Zea mays, Clivia, Aloe, Tradescantia, Tillandsia, Orchidaceen u. a., aber auch viele Dikotyledonen, und recht gut manche Lebermoose (Fegatella). Hauptsächlich an stärkearmen und stärkefreien Chloroplasten treten die Quellungsvorgänge deutlich in Erscheinung. Wo sehr kleine Stärkekörnchen in den Chloroplasten enthalten sind, fallen dieselben bei der Quellung oft heraus und zeigen deutliche Molekularbewegung (Tillandsia usneoides). Bei einzelnen Pflanzen, etwa bei Vinca, Helleborus, Hedera, ferner bei Gymnospermen konnte ich derartige momentane und bedeutende Verquellungen nicht beobachten. Offenbar ist die Konsistenz der Chloroplasten nicht in allen Fällen die gleiche.

Erscheinungen, die den beschriebenen entsprechen, sind lange bekannt. H. v. Mohl[1] unterschied auf Grund derartiger Beobachtungen zwei Typen von Chlorophyllkörnern: 1. solche, deren Umkreis »nicht von einer gleichmäßig gebogenen Linie

[1]) Bot. Zeitg. 1855. **13**, 109.

begrenzt, sondern unregelmäßig gezackt erscheint.« Dieselben quellen in Wasser stark auf; 2. solche mit glatter Oberfläche, feinkörniger Substanz und geringer Quellbarkeit in Wasser. Als Beispiel für den ersten Typus führt er die Chloroplasten von Clivia nobilis, für den letzteren die von Ceratophyllum demersum an. Mohl liefert eine eingehende Beschreibung der Quellungserscheinungen in Wasser. Auch Sachs[1], Rosanoff[2], Hofmeister[3], A. Meyer, Bredow, Küster, Vouk u. a. machen Angaben über die Erscheinung starker Quellung von Chloroplasten bei Berührung mit Wasser.

In unverletzten Zellen sind derartig starke Quellungen niemals zu beobachten, doch machen sich hier ebenfalls, wenn auch nach viel längerer Zeit, Veränderungen an den Chloroplasten bemerkbar, die zuweilen mit Volumszunahme verbunden sind und gleichfalls als Quellungserscheinungen gedeutet werden müssen. Die Chloroplasten vieler Pflanzen zeigen nach etwa 24stündiger Einwirkung von destilliertem Wasser ein stark körniges Aussehen, oder sie bleiben ziemlich homogen, erscheinen aber in ihren Umrissen stark verändert. Ihre normalerweise regelmäßigen, glatten Konturen werden eckig, unregelmäßig, zeigen häufig kurze stumpfe Spitzchen oder Vorstülpungen und Fortsätze. Wo die Chloroplasten isoliert liegen, können sie dadurch ein sternförmiges Aussehen gewinnen. Wo sie einander genähert sind, sodaß sie mit den Spitzchen einander berühren, da verkleben diese Spitzchen zu kurzen grünen Strängen, durch welche die Chloroplasten miteinander verbunden erscheinen.

Ähnliche Erscheinungen sind für normale, lebende Chloroplasten wiederholt beschrieben worden. Haberlandt[4] beobachtete bei verschiedenen Arten der Gattung Selaginella unregelmäßig gekrümmte und konturierte, durch dünne Verbindungsstränge kettenförmig verbundene Chloroplasten. Diese Verbindungsstränge sollen bei unvollständiger Trennung der durch Teilung hervorgegangenen Chloroplasten zurückbleiben;

[1]) Flora. 1862. **45**, 135.

[2]) Mémoires d. l. Soc. Imp. des Sc. nat. d. Cherbourg. **13**, 230.

[3]) Die Lehre von der Pflanzenzelle. Leipzig. 1867. 369.

[4]) Flora. 1888. **71**, 291.

ähnliche Beobachtung machte Küster[1] an Chloroplasten von Moosen. G. Senn[2] deutet von ihm häufig gesehene „pseudopodienartig veränderliche Stränge" an den Chloroplasten von Funaria, Mnium, Marchantia, Aspidistra elatior, Sedum Sieboldtii, Equisetum arvense als einer das Chlorophyllkorn umgebenden plasmatischen Hülle, dem Peristromium, angehörende Lokomotionsorgane. Er bringt das Auftreten derartiger Fortsätze in Beziehung zu Bewegungs- und Verlagerungserscheinungen an den Chloroplasten. Auch andere Forscher beschreiben Fortsätze und Verbindungsfäden an den Chloroplasten mancher Pflanzen.

Nach allem was ich beobachten konnte, handelt es sich in den von mir gesehenen pseudopodienähnlichen Fortsätzen und netz- oder kettenförmigen Chloroplastenverbänden bloß um Quellungsformen und nicht um normale Erscheinungen. Nur in vereinzelten Fällen konnte ich ähnliche Verbindungsfäden schon in frischen Blattschnitten beobachten. Meist traten dieselben erst als Folge einer Schädigung der Zellen auf. In solchen Zellen zeigt auch das Protoplasma häufig Desorganisationserscheinungen, indem feine Plasmagerinnsel sich an die Fortsätze der Chloroplasten ansetzen und diese weithin verlängern und häufig zum Zellkern überleiten und sich an diesen ansetzen, sodaß der Eindruck hervorgerufen werden kann, als ständen Kern und Chloroplasten durch feine Stränge miteinander in Verbindung.

Die Erscheinungen der Formänderung des Chlorophyllkornes sind nicht bei allen Pflanzen gleich leicht hervorzurufen. Das Eindringen des Wassers in die Zellen erfolgt offenbar nicht überall gleich leicht und auch die Chloroplasten selbst scheinen ungleich resistent zu sein. Aber auch bei einer bestimmten Pflanze sind die Gestaltsänderungen der Chloroplasten nicht unter allen Umständen gleich leicht zu bewirken. Innerhalb gewisser Grenzen scheint die Möglichkeit eines Konsistenzwechsels der Chloroplasten und damit eines Wechsels im Verhalten gegen äußere Einflüsse gegeben zu sein.

Die Veränderungen die durch verdünnte Alkohole an den Chloroplasten hervorgerufen werden unterscheiden sich zunächst,

[1]) Zeitschr. f. allg. Physiol. 1904. **4**, 234.

[2]) Die Gestalts- und Lageveränderung der Pflanzenchromatophoren. Leipzig. 1908.

wenn die Konzentrationen sehr niedere sind, die Einwirkungszeit eine kurze ist, nicht oder sehr wenig von den Desorganisationserscheinungen die durch reines Wasser nach längerer Zeit hervorgebracht werden. Wie erwähnt dauert es anscheinend mehrere Stunden bis sich ein Gleichgewichtszustand zwischen der Alkoholkonzentration in der Außenflüssigkeit und in den Chloroplasten eingestellt hat, weshalb scharfe Unterschiede zwischen der Wirkung verschiedener aber nicht zu weit auseinanderliegender Konzentrationen nicht zu erwarten sind. Die homologen Alkohole der Fettreihe, soweit sie in hinreichendem Maße wasserlöslich sind, unterscheiden sich außer durch eine verschieden schnelle Wirkungsweise (Butyl- und Amylalkohol scheinen, wie erwähnt, sehr langsam einzudringen) in ihrem Einfluß auf die Chloroplasten nur dadurch voneinander, daß zur Erzielung eines bestimmten Effektes von jedem höheren Alkohol eine bedeutend geringere Konzentration notwendig ist als von dem nächst niedrigeren Glied der Reihe. Bekanntlich wird in dieser Reihe durch gleiche Mengen der einzelnen Glieder die Oberflächenspannung von Wasser gegen Luft in verschiedenem Grade erniedrigt, indem die Oberflächenaktivität mit dem Molekulargewicht sehr stark zunimmt, und zwar von Glied zu Glied mit dem Koeffizienten 3 (Traube's Regel), so daß zur Erzielung einer bestimmten Oberflächenspannungserniedrigung von jedem höheren Alkohol nur ein Drittel der Konzentration des nächst niedrigeren anzuwenden ist. Aequikapillare Konzentrationen rufen daher, wie von verschiedenen Forschern gezeigt worden ist, die gleichen physiologischen Wirkungen hervor, so daß anzunehmen ist, daß die Giftwirkung der Alkohole eine Funktion ihrer kapillaren Eigenschaften darstellt. Die die Zunahme der Giftwirkung der Alkohole mit steigendem Molekulargewicht behandelnden Arbeiten finden sich zusammengestellt in der zitierten Arbeit von Fr. Czapek S. 14.

Wenn man die Veränderungen, welche verdünnte Alkohole verschiedener Konzentration bis zum vollständigen Farbstoffentzug an den Chloroplasten hervorrufen, überblickt, so lassen sich im allgemeinen drei Hauptstadien der Veränderungen herausheben, die, wenn auch nicht immer gleich deutlich, doch bei allen untersuchten höheren Pflanzen aufgefunden werden konnten.

Am leichtesten lassen sich diese Veränderungen bei Anwendung von Äthyl- oder Propylalkohol überblicken. Am wenigsten scharf sind die einzelnen Stadien mit Methylalkohol zu erhalten, wo sich die Veränderungen auf ein sehr weites Konzentrationsintervall verteilen. Butyl- und Amylalkohol sind nur in sehr geringen Mengen, ersterer zu etwa 8,7, letzterer zu 2,5 % in Wasser löslich, Konzentrationen welche, wie erwähnt, nicht hinreichen den Chlorophyllfarbstoff in nachweislichen Mengen zu lösen. Hier fehlt das 3. Stadium vollständig oder sein Eintritt wird nur eben andeutungsweise wahrnehmbar. Die ganze Reihe der Veränderungen ist hier mehr zusammengedrängt, da ein geringes Plus der Alkoholkonzentration schon eine beträchtliche Verstärkung der physiologischen Wirkung bedeutet.

Das erste Hauptstadium in der Reihe der Veränderungen an den Chloroplasten läßt sich durch den Ausdruck Agglutination charakterisieren, da dasselbe in einer Verklebung der Chloroplasten gipfelt. Es lassen sich damit alle Wirkungen zusammenfassen, die sich in Änderungen der äußeren Umrisse der Chloroplasten kundgeben. Es gehören dazu somit auch die bereits beschriebenen Desorganisationserscheinungen, welche an Chloroplasten auftreten, wenn die mikroskopischen Schnitte längere Zeit der Wirkung von destilliertem Wasser ausgesetzt sind. Bei den Agglutinationserscheinungen handelt es sich in erster Linie um Quellungsvorgänge. Die Veränderungen die in niedrigen Konzentrationen der Alkohole (Methylalkohol bis 15 %, Äthylalkohol bis 10 % und Propylalkohol bis 5 %) an den Chloroplasten hervorgerufen werden, lassen sich mikroskopisch von den Desorganisationserscheinungen wie sie schon in destilliertem Wasser auftreten können, nicht unterscheiden; nur treten diese Wirkungen in Alkohol schon nach einer sehr viel kürzeren Zeit auf. Die Gestalt der Chloroplasten wird unregelmäßig und eckig, es bilden sich Spitzchen und Fortsätze, wodurch die Chloroplasten ein sternförmiges Aussehen gewinnen können. Mit diesen Spitzchen verkleben die Chloroplasten an den Berührungsstellen miteinander (Fig. 4).

Offenbar sind auch die Ursachen in beiden Fällen die gleichen. Hofmeister[1] hat bereits vor einer Reihe von Jahren darauf

[1]) Archiv f. Exp. Pathol. u. Pharm. 1891. **28**, 224.

aufmerksam gemacht, daß niedrige Alkoholkonzentrationen Quellungen an Hydrokolloiden hervorrufen können, welche an Stärke die durch Wasser hervorgebrachten Quellungen sogar noch übertreffen können. Seine Beobachtungen machte er an Leimplatten, welche er in Lösungen von verschiedenem Alkoholgehalt zwischen 0 und 10 % quellen ließ. Dabei ergab sich ein Quellungsmaximum zwischen 0,5 und 1,0 % von Äthylalkohol. Aber auch in bedeutend höheren Konzentrationen nimmt die Quellung noch nicht viel ab. Als Gesamtmenge der imbibierten Lösung fand Hofmeister auf ein Teil Leim für Wasser 11,05, ein zweites Mal 10,91 Teile, für 0,5 proz. Alkohol 12,61 Teile, für 10 proz. Alkohol aber immer noch 8,80 Teile. Diese Feststellungen beziehen sich auf die Gewichtszunahme der Leimscheiben in den Quellungsmitteln. Da aber die Alkohol-Wasser-Mischungen ein niedrigeres spez. Gewicht als Wasser haben, so müßte die erhöhte Quellung sich in der Volumszunahme noch stärker äußern als in der Gewichtszunahme.

Bestätigt scheint die Annahme einer bedeutenden Quellbarkeit der Chloroplasten in verdünnten Alkoholen durch die Beobachtung, daß Chloroplasten verletzter Zellen ebenso wie in Wasser auch in sehr verdünnten Alkoholen die beschriebenen, mit sehr bedeutender Volumszunahme verbundenen, bei Berührung mit der Außenflüssigkeit momentan eintretenden Quellungserscheinungen zeigen. Diese Quellbarkeit der Chloroplasten nimmt mit steigender Konzentration nur sehr langsam ab und geht erst in relativ hohen Alkoholkonzentrationen verloren.

Häufig kommt es in Alkohol geringer Konzentration zu einer vollständigen Verklebung der Chloroplasten. Wo dieselben nahe beisammen liegen, da verschmelzen sie reihen- oder gruppenweise; sie erscheinen dann oft zu dichten grünen Klumpen zusammengeballt oder förmlich zusammengeronnen. Wo sie mehr isoliert liegen gewinnen sie ein unregelmäßig zerflossenes Aussehen. Diese Erscheinung des Verklebens und Zerfließens der Chlorophyllkörner stellt sich mit gewissen Konzentrationen ein, die jedoch nicht scharf festgestellt werden konnten, in Methylalkohol etwa bei 20 bis 30 Prozent, in Äthylalkohol in Konzentrationen um 20 Prozent, in Propylalkohol um 7,5 Prozent.

Das zweite Hauptstadium kennzeichnet sich in einer zunehmenden Abtrennung des grünen Farbstoffes von dem farblosen Stroma. Zunächst erhalten die Chloroplasten ein stark körniges Aussehen. In etwas höheren Konzentrationen treten dann kleine grüne Tröpfchen deutlich hervor, die mit zunehmender Konzentration immer größer werden und sich häufig auch völlig ablösen. Endlich liegen große, sehr dunkel gefärbte grüne Tropfen in den Zellen, die (wie man sich überzeugen kann wenn man eine noch höhere Konzentration nur wenige Minuten direkt unter dem Mikroskop auf grüne Gewebe einwirken läßt), durch Vereinigung der kleineren Tropfen entstanden sind. Die Chloroplasten bleiben, deutlich blässer gefärbt, zurück. Wegen des ungleichmäßigen Eindringens des Alkohols kann man auch nach mehrstündiger Einwirkung häufig die Veränderungen in manchen Zellen erst bis zur feintropfigen Entmischung (Fig. 5) in den Nachbarzellen vielleicht schon bis zur Bildung der Farbstofftropfen (Fig. 7) vorgeschritten finden und alle Übergänge nebeneinander beobachten. Es seien diese Vorgänge mikroskopisch wahrnehmbar zunehmender Entmischung unter dem Begriff der Chlorophyllolyse zusammengefaßt. Die Konzentrationen, welche den Eintritt dieses Stadiums in den Veränderungen der Chloroplasten bewirken, liegen für Methylalkohol um 40, für Äthylalkohol um 30, für Propylalkohol um 15 Prozent. Auch bei Anwendung von Butyl- und Amylalkohol sind die Entmischungserscheinungen meist leicht hervorzurufen und wegen des äußerst langsamen Fortschreitens der Veränderungen in diesen Alkoholen gut zu beobachten. Butylalkohol ruft von etwa 4 Prozent, Amylalkohol von 2 Prozent aufwärts mikroskopisch wahrnehmbare Entmischungsvorgänge hervor. Am besten läßt sich die Tropfenausscheidung hier jedoch bei Anwendung der konzentrierten wässerigen Lösungen beobachten, da dieselben, wie erwähnt, sehr schlechte Chlorophyllösungsmittel sind und dieses Stadium daher nicht oder kaum überschritten wird.

Besonders leicht ist die Abscheidung grüner Tropfen bei jenen Pflanzen zu beobachten, welche fettähnliche Assimilationsprodukte in ihren Chloroplasten führen, die sich mit dem Chlorophyll zu mischen und zur Tropfenvergrößerung beizutragen

scheinen. Herbstliche Blätter führen häufig große Tropfen fettartiger Natur in ihren Zellen. Diese Tropfen stellen ein gutes Chlorophyllösungsmittel dar; sie färben sich nämlich mit dem Eintritt der Chlorophyllolyse, offenbar dann, wenn sie mit den Chloroplasten in Berührung kommen, intensiv grün und man erhält ein Bild das von dem der freien Farbstofftropfen kaum zu unterscheiden ist, trotzdem es sich hier nicht um die ursprüngliche Erscheinung der Abscheidung des Chlorophyllfarbstoffes in großen Tropfen, sondern um eine Speicherung desselben in schon vorhandenen Tropfen handelt. Diese Erscheinung kann schon durch die ersten Anfänge einer Entmischung eingeleitet werden, während die Abscheidung von größeren Tropfen erst in etwas höheren Konzentrationen erfolgt.

Steigert man die Alkoholkonzentration noch um ein weniges, so kann man an Stelle der Farbstofftropfen in den Zellen allenthalben große und kleine dunkelgrüne Kristalldrusen finden, daneben häufig auch rotgelbe Kristallnadeln oder Plättchen welche den gelben Komponenten des Chloroplastenfarbstoffgemisches entsprechen. Von den Tropfen ist mit Eintritt dieses dritten Stadiums meist nichts mehr zu sehen, auch dann nicht, wenn Chlorophyll in schon vorher vorhandenen Tropfen gespeichert war. Es konnte nicht entschieden werden, ob die Kristallbildung durch Auflösung und Wiederabscheidung der Farbstoffe erfolgt oder ob Kristallisation durch Entziehung eines ursprünglich vorhandenen Lösungsmittels durch den Alkohol dabei im Spiele ist. In keinem Falle bleiben die Tropfen nach der Bildung der Kristalle farblos zurück; auch dann nicht, wenn der Farbstoff nur durch präformierte Fetttropfen gespeichert worden war. Es ist daher an die Möglichkeit zu denken, daß das grüne Farbstoffgemisch im Chloroplasten eine Grundlage lipoider Natur besitzt. Es würde dann zur Entstehung von Kristallen immer mit der Erreichung der Lösungsgrenze dieser Lipoidsubstanz in der alkoholhaltigen Außenflüssigkeit der Anlaß gegeben sein. Damit würde es sich erklären, daß Chlorophyllkristalle hie und da schon in Alkoholkonzentrationen ausfallen können, in denen das Chlorophyll an sich noch nicht nachweislich löslich ist. Mehr Wahrscheinlichkeit hat die Annahme, daß die bei der Chlorophyllolyse sich abschei-

denden grünen Tropfen ein Gemisch der Farbstoffe mit dem Alkohol darstellen und daß es zum Ausfall der Kristalle notwendig ist, daß die Farbstoffe in der betreffenden Alkoholkonzentration eben, wenn auch nur in Spuren, löslich sind. Es würden dann die Kristalle umso leichter ausfallen müssen, je geringer die einwirkende Alkoholmenge, je eher also eine zum Kristallausfall führende Übersättigung erreicht werden kann. Die Voraussetzung, daß die Farbstoffe im Chlorophyllkorn in einer farblosen lipoidartigen Substanz gelöst sind, wäre damit überflüssig. Es würde hierfür auch die Erscheinung sprechen, daß die Ausfällung der grünen und gelben Kristalle nicht immer gleichzeitig erfolgt. Die Entstehung der Kristalle aus den Tropfen oder in Fällen wo es zu keiner vollständigen Loslösung der Tropfen vom Stroma kam, direkt an diesem, läßt sich unter dem Mikroskop verfolgen, wenn man eine etwas höhere Konzentration kurze Zeit einwirken läßt und dieselbe nach vollzogener Entmischung durch Wasserzusatz oder Verdunstenlassen des Alkohols etwas herabsetzt, so daß die Übersättigung schneller erreicht wird. Die Erscheinung des Kristallausfalles unterhalb der durch den Fluoreszenznachweis ermittelten Lösungsgrenze könnte dann dafür sprechen, daß die Lösungsgrenze in Wirklichkeit tiefer liegt, als durch die Fluoreszenz nachgewiesen werden kann.

Als zur Erzielung von Kristallen best geeignete Konzentrationen sind zu nennen, für Methylalkohol Lösungen von 60 bis 70 Prozent, für Äthylalkohol von 50, für Propylalkohol von 30 Prozent. Mit der konzentrierten wässerigen Lösung von Butylalkohol wurden, nur ausnahmsweise, spärliche und schlecht ausgebildete Kristalle erhalten. Mit der Amylalkohollösung konnten solche überhaupt nicht erzielt werden. Dagegen kann man in Butyl- und Amylalkohol an den Farbstofftropfen oder wo sich dieselben nicht völlig vom Stroma getrennt haben, an diesen selbst nach mehrtägiger Einwirkung zuweilen eine Verdichtung der grünen Substanz beobachten. Es bilden sich unregelmäßig geformte großkörnige Aggregate, wobei es sich offenbar um den ersten Beginn einer Kristallisation handelt, doch reicht die lösende Kraft offenbar nicht hin um die Bildung gut entwickelter Kristalle zu veranlassen. In Methylalkohol

sind die Kristallaggregate am hellsten gefärbt, die Drusen am lockersten aufgebaut und die einzelnen feinen, spießförmigen Nadeln, die sie zusammensetzen, meist gut zu unterscheiden. In Äthylalkohol sind die Drusen gewöhnlich etwas dichter, in Propylalkohol stets am massigsten; die einzelnen Kristalle sind kurz und gedrungen, ihre Färbung erscheint sehr dunkel. In einzelnen Fällen wurden auch andere Kristallformen beobachtet, worauf ich später zurückkomme.

Wird die Alkoholkonzentration über die Lösungsgrenze für Chlorophyll hinaus bedeutend gesteigert, so gehen die Kristalle, falls der Alkohol nicht schon reichlich Chlorophyll gelöst enthält, in Lösung und in den Zellen bleiben nur die völlig entfärbten Stromata verschrumpft und zerfallen zurück. Über das 3. Stadium, die Bildung der Kristalle hinaus, treten, abgesehen von vielleicht noch zunehmender Schrumpfung der Stromata, keine weiteren Veränderung an den Chloroplasten auf. Dieselben zeigen häufig, auch nach vollständiger Entfärbung, noch die Verbindungen und Verklebungen die sich während des langsamen Ansteigens der Konzentration gebildet haben und dann durch die allmähliche Schrumpfung und Erhärtung fixiert worden sind. Eine bestimmte Struktur ist an ihnen nicht zu erkennen. Häufig zeigen sich dagegen unregelmäßige Gerinnungsformen.

Da die Veränderungen, welche sich als Folge der Wirkung verdünnter Alkohole an den Chloroplasten bemerkbar machen, recht mannigfaltige sind und zwischen dem Verhalten der Chloroplasten verschiedener Pflanzen wenigstens auf den ersten Eindruck große Verschiedenheiten bestehen, fällt es nicht leicht, die genannten drei Stadien an jedem beliebigen Objekte zu erzeugen. Die Erscheinungen, die sich im Laufe der Veränderungen einstellen, werden nicht überall, und vielleicht auch nicht unter allen Umständen mit gleicher Deutlichkeit, sichtbar. Mit einiger Übung wird man aber auch an weniger günstigen Objekten dieselben Veränderungen wie sie in anderen Fällen typisch erschienen, wenigstens andeutungsweise wiederfinden. Es besteht offenbar nur ein gradueller Unterschied zwischen der Reaktionsfähigkeit der Chloroplasten. Erscheinungen, welche von den geschilderten wirklich verschieden gewesen wären wurden nicht beobachtet; es wurde nur zuweilen in einer Versuchsreihe

das eine oder andere Stadium nicht oder weniger deutlich erhalten, während Begleiterscheinungen mehr in den Vordergrund traten.

Im Verhalten von Chloroplasten höherer Pflanzen verschiedener systematischer Stellung ergab sich kein Unterschied. In allen Stämmen der höheren Pflanzen sind Objekte aufzufinden, welche eine Verfolgung dieser Desorganisationsvorgänge sehr leicht zulassen, ohne daß sich dabei wesentlich neue Erscheinungen ergeben. Die einmalige Untersuchung eines Objektes in der Reihe der Alkoholkonzentrationen erwies sich häufig als nicht ausreichend, da die Reaktionsfähigkeit speziell die Quellbarkeit der Chloroplasten, mit verschiedenen Umständen zu wechseln scheint. Schwierigkeiten ergaben sich ferner, aus dem anscheinend recht ungleichmäßigen Eindringen des Alkohols.

Nachstehende Tabelle gibt eine Übersicht über die untersuchten pflanzlichen Objekte.

	Methyl-alkohol	Äthyl-alkohol	Propyl-alkohol	Butyl-alkohol	Amyl-alkohol
Hepaticae					
Riccia sp.	,,	,,	,,	,,	,,
Fegatella conica	,,	,,	,,	,,	,,
Marchantia polymorpha .		,,			
Musci					
. Mnium cuspidatum . . .	,,	,,	,,	,,	,,
Filicales					
Nephrolepis phillippensis .		,,			
Aneimia fraxinifolia . .		,,			
Salvinia auriculata . . .	,,	,,	,,		
Equisetales					
Equisetum hiemale . . .		,,			
Lycopodiales					
Psilotum triquetrum . .		,,	,,	,,	
Selaginella Martensii . .		,,			
Cycadaceae					
Cycas revoluta	,,	,,			
Coniferae					
Pinus silvestris		,,	,,		
Picea pungens		,,	,,		
Abies alba		,,	,,		
Cryptomeria japonica . .		,,			
Taxus baccata		,,			
Hydrocharitaceae					
Elodea canadensis u. densa	,,	,,	,,	,,	,,
Vallisneria spiralis . . .	,,	,,	,,	,,	,,

	Methyl-alkohol	Äthyl-alkohol	Propyl-alkohol	Butyl-alkohol	Amyl-alkohol
Gramineae					
Triticum sativum . . .		,,	,,		,,
Zea mays	,,	,,	,,		,,
Araceae					
Anthurium magnificum .		,,			
Lemnaceae					
Lemna minor	,,	,,			
Lemna trisulca		,,			
Commelinaceae					
Tradescantia viridis . . .	,,	,,	,,		,,
Pontederiaceae					
Eichhornia crassipes . .		,,		,,	
Liliaceae					
Chlorophytum commosum .		,,	,,	,,	
Aloe elegans	,,	,,	,,	,,	
Hyacinthus orientalis . .	,,	,,	,,		
Yucca sp.		,,			
Aspidistra elatior . . .		,,	,,		
Amaryllidaceae					
Clivia nobilis		,,	,,		
Crinum amabile		,,	,,		
Agave americana . . .	,,	,,	,,	,,	,,
Iridaceae					
Iris germanica		,,	,,		
Orchidaceae					
Orchis maculata		,,	,,		
Ophrys muscifera . . .			,,		
Listera ovata			,,		
Coelogyne cristata . . .	,,	,,	,,	,,	
Cupuliferae					
Quercus esculenta . . .		,,	,,		
Urticaceae					
Pellionia Daveauana . .	,,	,,			
Loranthaceae					
Viscum album		,,	,,		
Ranunculaceae					
Helleborus niger . . .		,,			
Ranunculus bulbosus . .		,,	,,		
Cruciferae					
Erysimum Cheiri	,,	,,	,,	,,	,,
Crassulaceae					
Echeveria Scheideckerii u. gracilis	,,	,,	,,	,,	,,
Sedum reflexum	,,	,,	,,	,,	,,
Leguminosae					
Phaseolus multiflorus . .	,,	,,	,,	,,	,,
Robinia pseudacacia . .			,,		
Geraniaceae					
Pelargonium zonale . . .		,,			

	Methyl-alkohol	Äthyl-alkohol	Propyl-alkohol	Butyl-alkohol	Amyl-alkohol
Rutaceae					
Ruta graveolens		,,	,,		
Euphorbiaceae					
Euphorbia palustris . . .		,,	,,		
Violaceae					
Gartenstiefmütterchen . .		,,	,,		
Cactaceae					
Epiphyllum sp.		,,	,,		
Araliaceae					
Hedera Helix		,,			
Umbelliferae					
Aegopodium podagraria .		,,	,,		
Apocynaceae					
Vinca minor		,,	,,		
Labiatae					
Lamium album		,,	,,		
Scrophulariaceae					
Scutellaria altissima . . .			,,		
Compositae					
Aster Novi Belgii . . .	,,	,,	,,	,,	,,
Helichrysum arenarium .			,,		
Taraxacum officinale . .		,,	,,		

IV. Experimentelle Hinweise.

Um die erwähnten Unterschiede im Verhalten der Chloroplasten verschiedener Pflanzen zu kennzeichnen, sei hier eine kurze Darstellung einzelner Versuchsreihen gegeben.

Als eine zu Beobachtungen an den Chlorophyllkörnern besonders geeignete Pflanze erwies sich Vallisneria spiralis. Die Chloroplasten dieser Pflanze besitzen eine große Quellungsfähigkeit in Wasser. Sie zeigen häufig beim Austritt aus den Zellen die beschriebenen blasenförmigen Auftreibungen. Versuche mit Methylalkohol gaben folgendes Resultat: In Konzentrationen bis zu etwa 10% waren die Veränderungen außer in den verletzten Zellen, in denen dieselben Quellungserscheinungen auftraten wie in Wasser, nach nicht zu langer Einwirkung keine auffallenden. In 10proz. Methylalkohol erschienen die Chloroplasten in ihrer Gestalt stark geändert und in kurze, stumpfe Spitzchen ausgezogen; in 20—30proz. Alkohol wurden Verbindungsstränge sichtbar, die von einem Chloroplasten zum anderen zogen; diese waren gleichzeitig an den Berührungsstellen stark miteinander verklebt. In 40proz. Lösung war zuweilen eine Abtrennung des grünen Farbstoffes in Form sehr feiner Tröpfchen deutlich wahrnehmbar. In 50proz. Methylalkohol waren bedeutend größere grüne Tropfen zu beobachten, die sich von den Chloroplasten noch nicht völlig abgetrennt hatten. In 60proz. Alkohol war reichliche Abscheidung von Carotinfarbstoffen in Form von Nadeln sichtbar. In 70proz. Alkohol waren neben diesen Carotinkristallen grüne Kristalldrusen vorhanden. Noch die entfärbten Chloroplasten er-

schienen in vielen Zellen, wenn auch nicht allgemein, deutlich verklebt und ineinander verflossen, und gleichzeitig waren sie stark geschrumpft.

In Äthylalkohol gestaltete sich die Reihe der Desorganisationserscheinungen ganz ähnlich. In 5 proz. Alkohol waren nach der gleichen Einwirkungsdauer noch keine oder äußerst geringe Veränderungen an den Chloroplasten unverletzter Zellen wahrzunehmen. In 10 proz. Alkohol war der Beginn der Gestaltsänderung und Übergang in Sternform festzustellen. Die Wirkung der 20 proz. Lösung bedeutete nur eine Zunahme dieser Gestaltsänderungen. In 30 proz. Alkohol schienen die Chloroplasten zu agglutinieren; bei 50 % war das Vorhandensein großer grüner Tropfen in den Zellen zu konstatieren und gleichzeitig die Bildung grüner Kristalldrusen.

Die Wirkung von Propylalkohol läßt sich etwa in folgender Weise zusammenfassen: In 1 proz. Alkohol sind nach 4—6 stündiger Einwirkung keine oder geringe Veränderungen zu bemerken. In 2,5 proz. Propylalkohol ist die Bildung netziger Chloroplastenverbände die augenfälligste Erscheinung. In 7,5- und 10 proz. Alkohol erscheinen die Chloroplasten körnig oder sehr feintropfig. In 20 proz. Alkohol ist ein Austritt grüner Tröpfchen deutlich zu beobachten und zuweilen gleichzeitig der Beginn einer Kristallbildung. In 30 proz. Alkohol sind die Chloroplasten stark entfärbt, zeigen unregelmäßige Gerinnungsformen; einige scheinen noch kleinere Chlorophylltropfen zu führen. Allenthalben sind große dunkelgrüne Kristalldrusen in den Zellen wahrzunehmen.

Ähnlich gestalteten sich die Veränderungen an den Chloroplasten bei Anwendung von Butylalkohol. In 2,15 proz. Lösung waren die Chloroplasten bereits deutlich verändert; sie zeigten Unregelmäßigkeiten der Konturen und standen untereinander vielfach durch grüne Fortsätze in Verbindung. Der Beginn der Entmischung schien in Konzentrationen um 6 % einzutreten. In 6 proz. Butylalkohol wiesen die Chloroplasten an ihrer Oberfläche kleine grüne Tropfen auf. In 8,7 proz. Alkohol war die Tropfenabscheidung noch deutlicher, die Färbung der einzelnen Chlorophylltröpfchen schien eine dunklere, stellenweise hatten sie sich zu größeren vereinigt, und gleichzeitig schien hier und da besonders nach längerer Einwirkung der Beginn einer Abscheidung des grünen Farbstoffes in fester Form eingeleitet. Die grünen Tropfen hatten ihre runde Form aufgegeben und stellten unregelmäßige, grobkörnige Aggregate dar. Deutlich ausgebildete Kristalldrusen wurden nicht erhalten. Die Stromata erschienen geschrumpft.

Etwas anders gestalteten sich die Veränderungen in Amylalkohol. Sie waren hier überhaupt nicht bedeutend und beschränkten sich auf Zu- und Abnahme des Volumens und das Auftreten von Koagulationsformen am Stroma. Deutlich war nur die tropfige Entmischung in 2,5 proz. Alkohol, jedoch beschränkt auf die größeren Chloroplasten der Mesophyllzellen. Auch nach mehrtägiger Einwirkung waren hier keine bedeutenden Fortschritte der Desorganisation zu verzeichnen.

Als ein weiteres, für die Beobachtung der Chloroplasten sehr geeignetes Objekt erwies sich Psilotum triquetrum. Schon in der normalen lebenden Zelle sind die Chloroplasten häufig reihenweise miteinander verbunden. Seit den erwähnten Untersuchungen von Haberlandt ist anzunehmen, daß derartige Chloroplastenverbände bei der Vermehrung der Chloroplasten durch Teilung entstehen, indem die Chloroplasten sich nicht vollständig voneinander trennen. In Wasser und niederen Alkohol-

konzentrationen quellen die Chloroplasten verletzter Zellen stark auf. Die Chloroplasten von Psilotum ändern ihre Gestalt sehr leicht, und für die Beobachtung des Stadiums der Sternform ist diese Pflanze vielleicht das geeignetste Objekt. Schon 5 proz. Äthylalkohol ruft nach wenigen Stunden Veränderungen hervor, indem die Chloroplasten feinkörnig und ihre gleichmäßigen glatten Konturen unregelmäßig und eckig werden. Noch deutlicher sind diese Erscheinungen in 10 proz. Alkohol. In Propylalkohol war das Stadium der Sternform in Konzentrationen von 5 % aufwärts ganz besonders deutlich zu beobachten. Die Chloroplasten waren in derbe, längere oder kürzere grüne Fortsätze ausgezogen und schienen durch grüngefärbte Stränge verbunden. Es waren diese Chloroplastenverbände von den normalen, durch Teilung zustandegekommenen deutlich zu unterscheiden. Auch Verklebungen und Verschmelzungen von Chloroplasten waren häufig. Die feintropfige Entmischung war in 4,3 proz. Butylalkohol hier und da deutlich sichtbar; aber auch in Propylalkohol ließ sich die Entmischung leicht erkennen und zwar waren verschiedene Grade derselben gut zu unterscheiden. Die freien Farbstofftropfen wurden besonders mit 8,6 proz. Butylalkohol sehr schön erhalten und waren besonders in den Spaltöffnungsschließzellen groß und dunkelgefärbt. Nach vollständig oder teilweise vollzogener Entmischung erschien das Stroma als ein farbloses oder blaßgrünes schwammartiges Gebilde, oder es war stark und unregelmäßig zerfallen. Augenscheinlich handelte es sich dabei um Gerinnungsformen. Grüne Kristalle wurden nicht beobachtet, doch besteht kaum ein Zweifel darüber, daß auch bei dieser Pflanze solche erhalten werden können.

Die übrigen untersuchten Pflanzen schließen sich im Verhalten der Chloroplasten diesen beiden im wesentlichen an. Die dem ersten Stadium entsprechenden Gestaltsänderungen waren bei den Chloroplasten von Fegatella, Marchantia, Aspidistra, Sedum und anderen, besonders auch bei den Chloroplasten von Mnium, Elodea gut zu beobachten. Bei letzteren allerdings erst in den höheren Konzentrationen, da hier ganze, unzerschnittene Blätter verwendet wurden, wodurch das Eindringen des Alkohols sehr erschwert scheint. Bei vielen Objekten treten diese auffälligen Formänderungen zurück gegen Quellungserscheinungen, welche sich im Hervortreten einer feinen Granulierung dokumentieren, oder in deren Verstärkung, wo eine solche schon von vornherein vorhanden war. Zuweilen handelt es sich dabei nur um ein immer deutlicheres Hervortreten der ebenfalls quellenden Stärkekörnchen, wie bei Tradescantia. In den höheren Konzentrationen kommt es dann zu einem starken Zerfall der Chloroplasten. Stärkearme Chloroplasten neigen am meisten zu Gestaltsänderungen.

Als Beispiel einer Pflanze mit zwar leicht quellbaren, die regelmäßige Gestalt dabei aber gut bewahrenden Chloroplasten sei Tradescantia genannt. Die an diesen Chloroplasten auftretenden Erscheinungen sollen hier noch in Kürze beschrieben werden.

Tradescantia viridis besitzt große, bequem zu untersuchende Chloroplasten, die bald homogen, bald grobkörnig erscheinen; letzteres dann, wenn reichlich Stärkekörnchen vorhanden sind, die deutlich hervortreten und durch die grüne Umhüllung hell hindurchschimmern. In Wasser gebracht, quellen diese Chloroplasten momentan, so plötzlich, daß man den Eindruck gewinnt, daß sie zerplatzen. Die zahlreichen Stärkekörnchen scheinen dabei aus dem Gefüge des Chlorophyllkörpers herauszufallen. Die Beobachtungen wurden ausgeführt mit Methyl-, Äthyl-, Propyl-, Butyl- und

Amylalkohol. Gestaltsänderungen waren kaum zu beobachten. Die Chloroplasten unverletzter Zellen blieben scharf begrenzt und behielten ihre regelmäßigen Konturen bei, bildeten keine Kanten, Fortsätze und Verbindungen, erschienen nur selten zerflossen und verklebt. Die Wirkung der verdünnten Alkohole äußerte sich nur in einem mit zunehmender Konzentration immer deutlicheren Hervortreten der Stärkeeinschlüsse. Die unter der Bezeichnung Agglutination zusammengefaßten Erscheinungen fehlten hier gewöhnlich. Trotzdem kann ein abweichendes Verhalten der Chloroplasten nicht angenommen werden, da sich zuweilen in einzelnen Zellen die beschriebenen Agglutinationserscheinungen ebenso einstellten wie etwa bei den Chloroplasten von Vallisneria oder Psilotum. Wahrscheinlich hängt dieses verschiedenartige Verhalten mit Größe und Menge der Stärkekörnchen zusammen, so daß mit wechselnden Assimilationsbedingungen bei ein und derselben Pflanze bald der eine, bald der andere Reaktionsmodus zu beobachten ist. Die Entmischungsvorgänge waren am besten in Butyl- und Amylalkohol zu verfolgen, und zwar wurden dieselben schon in verhältnismäßig niederen Konzentrationen recht deutlich (4,3 bew. 2 %). Besonders in Amylalkohol waren die freien Farbstofftropfen deutlich wahrzunehmen. Grüne Kristalldrusen wurden mit Methyl- (70 %), Äthyl- (50 %) und Propylalkohol (20 %) in größter Menge und zuweilen auch mit der konzentrierten wässerigen Lösung von Butylalkohol erhalten. Der Unterschied im Aussehen der Chloroplasten innerhalb der verletzten Zellen und jener, welche durch Anschneiden der Zellen in die Außenflüssigkeit ausgetreten waren, war noch in recht hohen Konzentrationen ein beträchtlicher. Er bestand in den höheren Konzentrationen allerdings weniger in Größendifferenzen als vielmehr im Grade des Zerfalles der Chloroplasten. In Methyl- und Äthylalkohol war dieser Unterschied noch bei 20 % deutlich, in Propylalkohol bei 10, in Butyl- bei 5,8 und in Amylalkohol bei 2 % noch vorhanden. Die genauen Grenzen, bis zu welchen sich diese Abweichung ergibt, wurden nicht ermittelt.

Bei einigen der untersuchten Pflanzen äußerte sich die Wirkung niedriger Alkoholkonzentrationen auf die Chloroplasten überhaupt nicht in mikroskopisch zu verfolgenden Veränderungen. Die Erscheinungen des ersten Stadiums waren kaum kenntlich, so bei Nephrolepis, Cycas. Auch die Quellungserscheinungen bei den in die Außenflüssigkeit ausgetretenen Chloroplasten wurden mitunter nicht beobachtet (Helleborus, Hedera, Ligustrum, Vinca). Zuweilen war starke Schrumpfung der Chloroplasten in den höheren Konzentrationen überhaupt die erste in die Augen fallende Erscheinung, und nur der endliche Ausfall der Kristalle zeigte die vollzogene Entmischung an. Die Chloroplasten der untersuchten Koniferen ließen überhaupt wenig Veränderungen erkennen. Unter ihnen erwies sich Abies alba noch als günstigstes Objekt, an dem nicht nur Entmischungs-, sondern auch Agglutinationserscheinungen zuweilen recht gut beobachtet werden konnten. Eichhornia, Trianea, Pelargonium, Hedera, Yucca, Vinca, Helleborus scheinen für die Beobachtung der Veränderungen an den Chlorophyllkörnern sehr ungeeignet zu sein. Trotz dieser scheinbaren Abweichungen im Verhalten besteht wohl keine Notwendigkeit, in diesen Fällen andere Verhältnisse anzunehmen, da bei wiederholter Beobachtung eines Objektes sich mit irgendeinem der verwendeten Alkohole hie und da doch wieder die gleichen charakteristischen Erscheinungen feststellen ließen, nur waren dieselben nicht mit derselben Regelmäßigkeit und nicht gleich leicht zu beobachten.

Auch das dritte Stadium, die Kristallabscheidung, war nicht bei allen Objekten gleich leicht zu beobachten. Während bei manchen Pflanzen, etwa bei Vallisneria, Tradescantia, Fegatella, Triticum, Zea mays, Crinum, Aspidistra, Hyacinthus, Lemna u. a., die grünen Kristalle leicht und reichlich erzielt werden konnten, waren bei anderen Pflanzen Chlorophyllkristalle nur schwer und in geringer Zahl zu erhalten. Demnach scheint die Möglichkeit einer solchen Kristallabscheidung ganz allgemein zu bestehen, selbst bei chlorophyllärmeren Pflanzen. Schlecht geeignet zur Erzielung von Kristallen sind die untersuchten Gymnospermen, ferner Riccia, Mnium, Selaginella, Trianea, Viscum.

Beobachtungen an Algen.

Im Anschluss an die höheren Pflanzen wurde noch eine Reihe von Algen auf das Verhalten ihrer Chromatophoren gegen die Einwirkung verdünnter Alkohole geprüft. Es zeigte sich, daß die Algenchromatophoren häufig ganz anders auf die unternommenen Eingriffe antworten, als die Chlorophyllkörner der höheren Pflanzen. Als Beobachtungsmaterial wurden einige grüne Algen gewählt: Spirogyra, Cladophora, Vaucheria, Nitella, dann aber auch andersfarbige Algen und vor allem einige Rotalgen. Während die genannten grünen Algen kaum Anlaß zur Annahme anderer Verhältnisse geben dürften, scheinen bei den Rotalgen solche zu bestehen.

Die Chloroplasten der grünen Algen zeigten Gestaltsänderungen, tropfenförmige Farbstoffabscheidungen und Entstehung von Chlorophyllkristallen in verdünnten Alkoholen ebenso, wie die der untersuchten höheren Pflanzen.

Vaucheria zeigte in besonders deutlicher Weise den Austritt von Farbstofftropfen, das Anwachsen derselben mit Zunahme der Konzentration und endlich die Ausbildung von Kristallen, die hier stets in größter Menge erhalten wurden. Tropfige Entmischung und Kristallisation waren hier in bedeutend niedrigeren Konzentrationen zu beobachten als gewöhnlich. Die übrigen Grünalgen ließen hingegen Veränderungen erst in verhältnismäßig hohen Konzentrationen erkennen.

Unter den Rotalgen erwiesen sich als ausgezeichnete Objekte für die Beobachtung der Chromatophoren Nitophyllum, Ceramium rubrum, Antithamnion plumula und einige andere. Schon beim Eintragen dieser Algen in destilliertes Wasser zeigen die Chromatophoren fast momentan eine Änderung ihrer Gestalt. Die anfangs langgestreckten, ja oft fädlichen Chromatophoren von Ceramium runden sich plötzlich ab, ziehen sich zu Tropfenform zusammen oder zerfallen in mehrere kleinere Tröpfchen, welche häufig untereinander verklebt erscheinen. Häufig bilden sich in diesen zusammengeballten Überresten der Chromatophoren blasige Auftreibungen, welche an die Quellungsformen der Chloroplasten höherer grüner Pflanzen erinnern. Es folgt also auf die plötzliche Kontraktion meist eine Volumenzunahme. Bei dem plötzlichen Zerfließen der Chromatophoren und dem Zerfall in mehrere Tropfen machen die Chromatophoren völlig den Eindruck einer flüssigen Substanz. Dieselben Erscheinungen wie beim Übertragen in destilliertes Wasser kann man nun auch in Alkoholen verschiedener Verdünnung beobachten. Gleichzeitig sind diese Veränderungen die einzigen, die festgestellt werden konnten. Erst nahe der Chlorophyll-Lösungsgrenze stellten sich Entmischungserscheinungen ein. Die vorher gleichmäßig rosagefärbten Chromatophoren wiesen eine grüne Randzone um eine rote Zentral-

zone auf. Eine eingehende Schilderung der Veränderungen von Florideenchromatophoren in verdünnten Alkoholen liefert Küster[1], der auf Grund seiner Beobachtungen den Aggregatzustand derselben für flüssig hält. Jedenfalls scheinen hier in bezug auf den Aggregatzustand Unterschiede vorzuliegen. Bezüglich des Aufbaues scheinen die Florideenchromatophoren nicht in Gegensatz zu den Chloroplasten zu stehen. Nach vollständiger Extraktion des Farbstoffes bleibt hier wie dort ein farbloses Stroma zurück, eine in Lipoidlösungsmitteln unlösliche Grundsubstanz. Ganz besonders leicht wurden bei Rotalgen die kristallinischen Chlorophyllabscheidungen erhalten, welche meist moosförmige Aggregate von feinen Nädelchen darstellten, zuweilen auch dichte Drusen bildeten. Daneben wurden stets auch gelbe Farbstoffe und zuweilen auch das Phykoerythrin in Kristallform erhalten. (Fig. 10.)

Eine Reihe von Algen wurde lediglich zum Zwecke der Beobachtung grüner Kristalle in den Zellen untersucht. Das Resultat dieser Versuche wird an anderer Stelle mitzuteilen sein.

V. Versuche mit weiteren oberflächenaktiven Substanzen.

Außer verdünnten Alkoholen studierte ich eine Reihe von anderen oberflächenaktiven Substanzen: Ketone, Aldehyde und Ester der gesättigten Alkohole der Fettreihe, welche ebenfalls gute Chlorophyllösungsmittel sind.

a) Versuche mit Aldehyden.

Acetaldehyd löst sich leicht und in jedem Verhältnis in Wasser.

Angewendete Konzentrationen: 10, 20, 30, 50, 80%. Versuchsobjekte: Vallisneria, Fegatella, Tradescantia.

Die Veränderungen an den Chloroplasten sind völlig die gleichen wie bei Anwendung eines der genannten Alkohole. In 10- und 20 proz. Acetaldehyd war an den Chloroplasten von Vallisneria und Fegatella das Stadium der Agglutination deutlich zu erkennen. Die Chlorophyllolyse war schon in 30proz. Lösung sichtbar und wurde in der 50proz. noch vollkommener; die Tröpfchen waren größer und intensiver gefärbt. Hie und da konnten an Stelle der Tropfen dunkelgrüne Aggregate, zuweilen auch sehr kleine grüne Kristalldrusen beobachtet werden. In der 80proz. Lösung war der Farbstoff teils gelöst, teils noch in Form von festen Abscheidungen in den Zellen vorhanden. Die Stromata wiesen wieder festere, regelmäßigere Umrisse auf als in den niederen Konzentrationen. Die Chloroplasten von Tra-

[1]) Verworn, Zeitschr. f. allg. Physiol. 1904. **4**, 221.

descantia zeigten ebenfalls genau die gleichen Erscheinungen wie bei Behandlung mit Alkoholen, indem in den niedersten Konzentrationen Agglutinationserscheinungen weniger auffallend waren als eine immer stärker hervortretende Granulierung.

Propionaldehyd löst sich nur in geringen Mengen in Wasser.

Die Wirkung der konzentrierten wässerigen Lösung dieser Substanz wurde an Vallisneria studiert. Die hervorgerufenen Veränderungen waren sehr intensive, aber keine anderen als in Alkohol; sie äußerten sich in einem starken Verkleben und Verfließen der Chloroplasten; gleichzeitig ließen sich Entmischungserscheinungen deutlich beobachten. Kleine, sehr intensiv grün gefärbte Tröpfchen wurden von den Chloroplasten abgeschieden. Bis zu einer nachweisbaren Lösung des Farbstoffes kam es nicht. Kristalle wurden nicht erhalten. Auch bei Vaucheria, welche in Alkohol ganz besonders leicht schöne Chlorophyllkristalle liefert, konnten bei Anwendung der wässerigen Lösung von Propionaldehyd solche nicht erhalten werden. Ein Fortschritt dieser Veränderungen war auch nach mehrtägiger Einwirkung nicht zu beobachten.

b) Versuche mit Ketonen.

Aceton. Angewendete Konzentrationen: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 %.

Versuchsobjekte: Vallisneria, Fegatella, Tradescantia, Selaginella; für die höheren Konzentrationen: Spirogyra, Vaucheria, Nitophyllum.

Die Veränderungen entsprachen auch hier vollkommen den an den einzelnen Objekten durch die Alkoholwirkung hervorgerufenen. Das Stadium der Agglutination war in der 20 proz. Lösung am besten, die Entmischung in Konzentrationen von 30 % aufwärts zu beobachten. In Konzentrationen von 60 % aufwärts wurden feste Chlorophyllabscheidungen erhalten und zwar teils in kristallinischen Körnern, teils in großen Drusen von feinen Nadeln (nach 24 Stunden). Bei Vaucheria waren weit verzweigte moosförmige Aggregate aus feinen Chlorophyllnädelchen nach dreitägiger Einwirkung schon in Konzentrationen von 40 % aufwärts zu beobachten. Neben den Chlorophyll-

kristallen wurden stets auch sehr reichlich »Carotin«kristalle erhalten (Fig. 12, 13).

Methyläthylketon ist bei Zimmertemperatur in Wasser nur wenig löslich (zu etwa 9 %).

Versuchsobjekte: Vallisneria, Tradescantia, Vaucheria. Die Veränderungen gestalten sich ebenso wie bei der Einwirkung der vorgenannten Substanzen, schreiten aber nur bis zu einer feintropfigen Entmischung vor. Feste Abscheidungen der Farbstoffe wurden nicht erhalten.

Methylpropylketon, in Wasser wenig löslich.

Versuchsobjekte: Vallisneria, Fegatella, Tradescantia, Riccia, einige Algen.

Die durch die konz. wässerige Lösung hervorgerufenen Veränderungen waren keine wesentlich anderen als die durch die vorgenannten Substanzen erzielten. Kristallinische Chlorophyllabscheidungen wurden bei Vaucheria reichlich erhalten, waren aber schlecht ausgebildet.

c) Versuche mit Estern.

Äthylformiat (Ameisenäther) löslich in Wasser zu ca. 10 %. Angewendete Konzentrationen: 3, 5, 7, 10 %.

Versuchsmaterial: Vallisneria, Tradescantia, Vaucheria.

Auch hier zeigten sich wiederum völlig die gleichen Erscheinungen. Die beiden ersten Stadien waren nebeneinander gut zu beobachten. Bis zur Abscheidung von Chlorophyllkristallen schritten die Vorgänge jedoch auch in der konzentrierten Lösung nicht fort. Dagegen gelangten Carotinfarbstoffe in Kristallform zur Abscheidung. Die tropfige Entmischung war schon von 3 % an sichtbar und ihre Zunahme mit jeder höheren Konzentration sehr schön zu verfolgen.

Methylacetat. Angewendete Konzentrationen: 5, 10 %, konzentrierte Lösung.

Versuchsmaterial: Vallisneria, Tradescantia, Vaucheria.

Dem Stadium der Agglutination folgte bei Vallisneria ein starker Verfall der Chloroplasten. Dieselben erschienen zerklüftet und von Hohlräumen durchsetzt. In der konz. Lösung war dieser Zerfall bis zur Unkenntlichkeit der Umrisse gesteigert. Gleichzeitig machte sich die Abscheidung grüner Tröpfchen

bemerkbar. Nach mehrtägiger Einwirkung wurden in der konzentrierten wässerigen Lösung kleine grüne Kristalldrusen erhalten. Die Veränderungen waren hier durch Verlängerung der Einwirkungsdauer bedeutend weiter zu bringen. Nach zweitägiger Einwirkung ergab sich in der 10proz. Lösung dasselbe Bild, wie es in der etwa 20proz. nach 1 Tag erhalten wurde.

Äthylacetat (Essigäther) zu etwa 8 % in Wasser löslich.

Versuchsmaterial: Vallisneria, Tradescantia, Vaucheria.

Abweichende Erscheinungen wurden nicht beobachtet. In der konzentrierten Lösung traten in den Zellen von Tradescantia reichlich kleine grüne Kriställchen auf, die teils als Körner den Chloroplasten aufsaßen, teils als kleine Drusen umherlagen. Vaucheria lieferte ebenfalls sehr reichlich körnige Abscheidungen und kleinere moosförmige Aggregate von feinen grünen Nädelchen.

Äthylpropionat, löslich zu etwa 3 Volumproz. Angewendete Konzentrationen: 1, 2, 3 %.

Versuchsobjekte: Vallisneria, Vaucheria.

Die Chloroplasten von Vallisneria zeigten nach 5stündiger Einwirkung der 1 proz. Lösung noch keine oder fast keine Veränderungen. Dagegen wirkte die 2 proz. Lösung nach der gleichen Zeit etwa wie 10 proz. Äthylalkohol auf die Chloroplasten dieser Pflanze, während 3 proz. Äthylpropionat etwa dasselbe Aussehen der Chloroplasten hervorrief wie 20 proz. Äthylalkohol. Eine tropfige Entmischung wurde bei Vallisneria auch nach mehrtägiger Einwirkung dieser Substanz nicht beobachtet; in den Vaucheriafäden traten dagegen größere grüne Tropfen und sehr dunkelgrüne ungleichmäßig geformte, anscheinend feste und vielleicht kristallinische Chlorophyllabscheidungen auf.

Äthylurethan, eine feste kristallisierte Substanz, leicht löslich in Wasser. Angewendete Konzentrationen: Mollösung = 8.91 % 20, 30, 40, 50 % (= konzentrierte Lösung).

Versuchsmaterial: Vallisneria, Fegatella, Tradescantia.

Bei allen drei Objekten machten sich starke Quellungserscheinungen in der 9 proz. und 20 proz. Lösung geltend. In der 30 proz. und 40 proz. Lösung erschienen die Chloroplasten stark zerklüftet, wodurch häufig netzige Scheinstrukturen vorgetäuscht wurden. Gleichzeitig waren Entmischungserscheinungen

deutlich zu beobachten. Die konzentrierte Lösung bewirkte starke Entfärbung der Chloroplasten und gleichzeitig eine überaus reichliche Abscheidung von grünen und gelben Kristallen. Am entfärbten Stroma waren häufig noch feine Tröpfchen eines gelben Farbstoffes zurückgeblieben.

Zur Erzeugung von Chlorophyllkristallen in der Zelle scheint diese Substanz sich ganz besonders gut zu eignen. In den untersuchten Schnitten der angeführten Pflanzen fehlten solche nach 10- bis 20stündiger Behandlung mit 50 proz. Urethan kaum in einer Zelle. Die Kristalle konnten jedoch auch schon in Konzentrationen von 30 % aufwärts, nur weniger reichlich und schlechter entwickelt, erhalten werden. Äthylurethan löst selbst in konzentrierter wässeriger Lösung nur wenig Chlorophyll, so daß die Lösung, bis zu 50 % hinauf, beliebig verstärkt werden kann, ohne daß erhebliche Chlorophyllmengen aus der Zelle verloren gehen. Es gelangt hier daher nach und nach fast alles Chlorophyll zum Ausfall in kristallisierter Form und die einmal gebildeten Kristalle bleiben in der Urethanlösung gut erhalten. Zuweilen findet die Kristallisation des Chlorophylls in Urethan leichter statt als in den Alkoholen, bei denen die obere Grenze für den Ausfall von Kristallen leicht überschritten wird. Es konnten in einigen Pflanzen, bei denen mit Alkohol nur sehr spärliche oder keine Kristalle erhalten wurden, solche mit Urethan reichlich erzielt werden, so bei Clivia, Elodea, Pellionia, Riccia, ferner bei einigen Algen. Nur spärlich wurden die Kristalle bei Sedum und Echeveria erhalten. Bei Mnium und Viscum kam es jedoch auch bei Anwendung von Äthylurethan nur zu Tropfenabscheidung, nicht aber zur Kristallbildung.

Aus diesen Ergebnissen der Versuche mit Aldehyden, Ketonen und Estern scheint hervorzugehen, daß ein Unterschied in der Wirkungsweise dieser Substanzen in ihren verdünnten, wässerigen Lösungen nicht besteht und daß dieselbe der Wirkung verdünnter Alkohole vollständig entspricht. Ein Unterschied liegt wohl nur darin, daß zur Erzielung der gleichen Wirkung sehr verschiedene Konzentrationen der einzelnen Substanzen notwendig sind. Ebenso ist die zur Erzielung eines bestimmten Effektes notwendige Zeit für jede der untersuchten Substanzen

eine andere, was vielleicht in dem verschieden raschen Eindringen derselben seinen Grund hat. Wegen der unvollkommenen Wasserlöslichkeit einiger der verwendeten Substanzen schreiten die Veränderungen der Chloroplasten in den wässerigen Lösungen mit zunehmender Konzentration nicht immer bis zur Lösung der Farbstoffe und damit zur vollendeten Entmischung der beiden Komponenten fort. Dagegen konnten in allen Fällen, wo dies der Fall war, kristallinische Farbstoff-Abscheidungen beobachtet werden.

d) Versuche mit Chloroform und Äther.

Die konzentrierten wässerigen Lösungen dieser bekanntlich in sehr geringem Maße wasserlöslichen Substanzen sind kaum imstande, an den Chloroplasten (Vallisneria und Trandescantia) andere Wirkungen hervorzurufen, als reines Wasser nach der gleichen Einwirkungsdauer. Die Chloroplasten verletzter Zellen quellen sehr stark blasenartig auf. Bis zu Entmischungserscheinungen schreiten die Veränderungen nicht fort.

VI. Diskussion der Resultate.

Die gesamten Veränderungen, die sich als Wirkung wässeriger Lösungen oberflächenaktiver Stoffe von verschiedener Konzentration an den Chloroplasten der höheren Pflanzen einstellen, vollziehen sich, wie wir sahen, wesentlich in 3 Hauptstadien:

I. Agglutination,
II. Chlorophyllolyse,
III. Farbstoffkristallisation.

Eingeleitet wird das erste Stadium bereits mit den Quellungserscheinungen, wie sie sich bei längerer Einwirkung von Wasser an den Chlorophyllkörnern geltend machen. Die Wirkung sehr verdünnter Alkohole und analog wirkender Substanzen stellt offenbar auch nichts anderes dar, als eine Anreicherung der Chloroplasten an einem Quellungsmittel, infolge derer es zu Gestaltsänderungen und endlich zu Verklebungen der Chloroplasten kommt. Das Chlorophyllkorn besteht, wie man annehmen muß, aus zwei kolloiden Komponenten oder Phasen, die sich in chemischer und physikalischer Hinsicht sehr verschieden verhalten. Während der grün gefärbten Komponente

die Eigenschaften einer lipoidartigen Substanz zukommen, stellt die farblose Komponente ein in Wasser quellbares, in Fettlösungsmitteln unlösliches Hydrokolloid dar.

Das Aussehen normaler lebender Chlorophyllkörner ist, wie erwähnt, sehr häufig auch bei den stärksten mikroskopischen Vergrößerungen ein völlig homogenes. Es muß sich daher um eine äußerst feine, »amikronische« Verteilung der beiden Phasen ineinander handeln. Diese Verteilung ist jedoch durch Eingriffe verschiedener Art leicht zu ändern. Schon in Berührung mit Wasser erfolgt eine Anreicherung der Hydroidphase am Quellungsmittel, wodurch die Verteilung der Lipoidphase eine etwas gröbere werden kann, indem sich die Adsorptionsaffinität zwischen beiden Phasen ändert und die lipoide Phase sich als oberflächenaktive Substanz nun an den Grenzflächen anreichert. In angeschnittenen Zellen, wo bei der direkten Berührung mit Wasser die Quellung der Chloroplasten unter bedeutender Volumenzunahme erfolgt, kann man leicht sehen, daß die grüne Substanz sich in Form von kleinen unregelmäßigen Tröpfchen oder Körnchen an der Oberfläche des blasenförmig aufgetriebenen Stromas ansammelt. Dabei handelt es sich aber nicht um reine Farbstoffabscheidungen; diese Körnchen oder Tröpfchen sind sehr blaßgrün gefärbt und unterscheiden sich von den bei der Entmischung durch Alkohole abgeschiedenen grünen Lipoidtröpfchen auch dadurch, daß sie nicht imstande sind, Fettfarbstoffe zu speichern. Auf Färbungsversuche an der Lipoidphase wird später zurückzukommen sein. Es handelt sich also bei dieser Art einer unvollkommenen Trennung der beiden Phasen um einen ganz anderen, nicht beliebig zu steigernden Vorgang, als bei der Entmischung durch Lipoidlösungsmittel.

Aber auch in der unverletzten Zelle kann man beobachten, daß die vorher homogenen Chlorophyllkörner bei längerer Einwirkung von Wasser feinkörnig werden; in Fällen wo sie schon von vornherein etwas gekörnt erschienen, wird diese Granulierung durch die Wasserwirkung noch verstärkt. Es scheint das Aussehen der Chloroplasten vom Wassergehalt des Stromes sehr abhängig zu sein. Häufig erscheinen normale lebende Chloroplasten ein und derselben Pflanze bald völlig homogen, bald

schwach körnig; es dürfte auch im Leben der Pflanze das Aussehen der Chlorophyllkörner vom Wassergehalt und damit von der Konsistenz des Hydrokolloids abhängig sein und mit den Vegetationsbedingungen wechseln. Wie bereits früher betont wurde, ist ein körniges Aussehen der Chloroplasten aber auch häufig die Folge sehr reichlichen Gehaltes an Stärkekörnern oder Öltröpfchen.

Eine viel vollkommenere Trennung der beiden Phasen, als durch die Quellung in Wasser, erreicht man durch Anwendung wässeriger Lösungen oberflächenaktiver Substanzen, welche sich nicht nur mit der Hydroid-, sondern auch mit der Lipoidphase mischen. Von den beiden Komponenten der wässerigen Lösung wird das Wasser stärker von der Hydroidphase der Chloroplasten aufgenommen, während sich die Lipoidphase bei der Verteilung des gelösten organischen Stoffes (Alkohol, Äthylurethan usw.) mehr an diesem anreichert. Dadurch muss zunächst eine Vergrößerung der amikronischen Teilchen durch Aufnahme des in Wasser gelösten oberflächenaktiven Stoffes erfolgen, dann ein Zusammenfließen dieser feinsten Tröpfchen zu immer gröberen Teilchen, bis man dieselben mikroskopisch direkt als distinkte grüne Tröpfchen wahrnehmen kann. Auch diese vergrößern sich auf Kosten des einwirkenden Stoffes nach und nach zu Solitärtropfen, und ist die Konzentration der Lösung hinreichend groß, so tritt spurenweise Lösung der Chloroplastenpigmente ein; dies scheint der Punkt zu sein, wo man meist (offenbar durch Wiederfällung des Farbstoffes aus der gesättigten Lösung) die Chlorophyll- und »Carotin«kristalle erhält. Ist die dargebotene Lösung noch konzentrierter an Alkohol, so ist auch Chlorophyll darin so gut löslich, daß sich keine Kristalle mehr bilden können.

Die unternommenen Eingriffe in die normalen Verhältnisse des Chlorophyllkornes bedingen sämtlich eine Änderung in der Feinheit der Verteilung von Hydroid- und Lipoidphase ineinander und bewirken eine mehrminder vollkommene Entmischung derselben, welche darin besteht, daß die Partikel der Lipoidphase von Amikronen allmählich zu Submikronen und endlich zu Mikronen anwachsen, welches letztere Stadium dem Eintritt der Chlorophyllolyse entsprechen würde. Wahrscheinlich kommt

es schon im Stadium der Agglutination bis zu einem gewissen Grade zu einer Sonderung beider Phasen. Die gequollene und lipoidärmer gewordene Hydroidphase wird dadurch eine visköse, schleimige Beschaffenheit erhalten und mehr als im normalen Zustand zu Gestaltsänderungen neigen, und es wird, wo mehrere derartig veränderte Chloroplasten miteinander in Berührung kommen, leicht ein Aneinanderhaften und Verfließen derselben erfolgen.

Die Quellbarkeit der Chloroplasten ist nicht in allen Fällen die gleiche, was vielleicht ebenso wie der erwähnte Wechsel des normalen Aussehens auf Unterschiede in der Konsistenz und damit auf Wechsel der Lebensbedingungen zurückgeführt werden kann. Hartlaubige Gewächse besitzen im allgemeinen weniger leicht angreifbare, vor allem weniger stark quellende Chloroplasten als Pflanzen mit weichem sommergrünen Laub. In manchen Fällen, wie z. B. bei den Chromatophoren der Florideen scheint es sich um sehr weiche, substanzarme Sole zu handeln, in anderen Fällen etwa um wenig elastische, sehr wasserarme Gele, welche den Eingriffen einen bedeutend größeren Widerstand entgegensetzen.

Die Hydroidphase des Chlorophyllkornes zeigt nicht nur in Bezug auf die Quellbarkeit, sondern auch in Anbetracht der in höheren Alkoholkonzentrationen erfolgenden Koagulationsvorgänge Ähnlichkeit mit einer gelatineartigen Substanz. Nach der Entfärbung bleiben die Hydrokolloide häufig geschrumpft und dabei unregelmäßig zerklüftet zurück, und es entsteht der Eindruck eines porösen schwammartigen Körpers. Diese Gerinnungsformen sind häufig beschrieben und als ein dem Chloroplasten zugrundeliegendes festes Gerüstwerk gedeutet worden. Man meinte, daß im lebenden Chlorophyllkorn die grüne Komponente in gesetzmäßer Weise auf dieses bestimmt strukturierte Gerüstwerk verteilt sei, etwa derart, daß die „Netzmaschen“ von grüner Flüssigkeit erfüllt, nach anderen Ansichten, daß die Netzbalken selbst gefärbt seien. Seit den Untersuchungen von Arthur Meyer[1] wird allgemein angenommen, daß der Farbstoff in Gestalt bestimmt geformter, vielleicht ihrerseits in bestimmter Weise aufgebauter „Grana“ in

[1]) Inaugural-Dissertation d. Kaiser Wilhelms-Univ. Straßburg. 1883.

die Poren des Stromas eingelagert ist. Bestärkt wurde diese Auffassung durch die häufige Beobachtung von normalerweise körnig erscheinenden Chloroplasten.

Indessen scheint nach dem Gesagten eine Notwendigkeit für die Annahme einer bestimmten morphologischen Struktur nicht zu bestehen.

VII. Das kristallisierte Chlorophyll.

Als drittes Stadium der Veränderungen, welche sich bei Einwirkung wässeriger Lösungen oberflächenaktiver Substanzen mit zunehmender Konstruktion an den Chloroplasten einstellen, bezeichnete ich die vollständige Trennung der beiden Phasen mit nachfolgendem Ausfall der Farbstoffe in Kristallform. Wenn auch diese Kristallisation nicht bei allen Pflanzen gleich leicht und reichlich erfolgt, dürfte diese Erscheinung doch allgemeine Verbreitung besitzen. Bei der Beobachtung der Chromatophoren einiger Rhodophyceen in ihrem Verhalten gegen verdünnte Alkohole ergab sich, daß auch in diesen nicht grünen, chlorophyllführenden Pflanzen Chlorophyllkristalle sehr leicht und in reichlicher Menge erzeugt werden können, und es wurden daher an diese Beobachtungen weitere an nichtgrünen Algen angeschlossen.

Von den untersuchten Diatomeen lieferten wenigsten die größeren und farbstoffreicheren Formen (Pinnularia, Epithemia, Pleurosigma, Synedra, Navicula u. a.) nicht nur in Alkoholen, sondern auch bei Behandlung mit Äthylurethan mehr oder minder gut entwickelte Chlorophyllkristalle (Drusen oder grobkörnige Aggregate). Fast immer fielen gleichzeitig auch die rotgelben Farbstoffe in Kristallform, als lange Nadeln oder regelmäßig sechsseitige Plättchen, aus. Die Algenzelle erschien dann oft dicht erfüllt von grünen und orangefarbenen Kristallen. Es stellt die Behandlung dieser Algen mit etwa 50 proz. Äthyl- oder 30 proz. Propylalkohol also eine bequeme Methode dar, die beiden Farbstoffe, resp. Farbstoffgruppen, in der Zelle nebeneinander, in Kristallform nachzuweisen. Es ist dazu nur notwendig, eine verhältnismäßig große Menge des Algenmaterials in ein bestimmtes Quantum des Alkohols einzutragen, da, wie bereits betont wurde, ein gewisser Sättigungsgrad des

Lösungsmittels an Farbstoff Vorbedingung für den Ausfall der Kristalle ist. In einzelnen Fällen schritt der Vorgang nicht bis zum Ausfall von Kristallen fort, sondern es erfolgte nur eine Abscheidung der Farbstoffe in Tropfenform. Dabei waren die grünen und gelben Farbstoffe jedoch deutlich getrennt, indem beiderlei Tropfen nebeneinander lagen, oder indem grüne Tropfen die Zelle erfüllten, während die Chromatophoren intensiv gelb gefärbt erschienen (Melosira) oder umgekehrt, oder indem nur der eine der beiden Farbstoffkomplexe zur Kristallisation gelangte; dann waren grüne Drusen neben gelben Tropfen zu beobachten.

Weiterhin wurden einige Phaeophyceen (Fucus, Cystosira, Scytosiphon, Ectocarpus) in den höheren Konzentrationen der Alkohole untersucht. Auch hier wurden grüne und gelbe Kristalle erhalten.

Zu den bereits im IV. Kapitel mitgeteilten Beobachtungen an Rhodophyceen sei noch erwähnt, daß dort, wo auch Phykoerythrinkristalle neben Kristallen von Chlorophyll und Farbstoffen der Carotingruppe beobachtet wurden, dieselben eigentlich nicht durch die Wirkung der verdünnten Alkohole zum Ausfall gekommen sein dürften, Phykoerythrin kristallisiert auch ohne Alkoholzusatz beim Absterben der Zelle häufig aus. Zuweilen finden sich in einem sonst normalen Thallus einzelne abgestorbene Zellen deren Chromatophoren hellgrün gefärbt sind, während das Phykoerythrin in schönen Kristallen ausgefallen ist. In solchen Zellen sind gewöhnlich keine Chlorophyll- und Carotinkristalle mehr zu erzeugen, wohl aber in den noch normalen Nachbarzellen, so daß man die Kristalle der drei Farbstoffe leicht nebeneinander, wenn auch nicht in ein- und derselben Zelle, beobachten kann (Fig. 10). Endlich wurden einige Cyanophyceen der Alkoholbehandlung unterzogen. Auch hier wurden wenigstens bei den größeren und chlorophyllreicheren Formen (untersucht wurden verschiedene Arten der Gattungen Oscillaria, Rivularia, Nostoc) neben Nädelchen und Plättchen von gelber Färbung, winzige grüne Kristalldrusen in großer Zahl erhalten.

Zum mikrochemischen Nachweis der gelben Blattfarbstoffe getrennt vom Chlorophyll steht eine von Molisch[1] angegebene

[1]) Ber. d. d. bot. Ges. 1896. **14**, 18.

Methode in Gebrauch, welche darin besteht, daß die grünen Gewebe mit 40proz. Alkohol, welcher 20% Kaliumhydroxyd gelöst enthält, behandelt werden, wodurch das Chlorophyll als Alkalichlorophyll in Lösung geht, während die gelben Farbstoffe in den Zellen zurückbleiben und in Kristallform ausfallen. Wie aus meinen Beobachtungen hervorgeht, kann eine Trennung der beiden Farbstoffgruppen auch durch Anwendung von verdünnten Alkoholen allein erreicht werden. Für den Ausfall der »Carotinoide«[1] in kristallisierter Form ist nach dem oben gesagten Zusatz von Lauge zu dem verdünnten Alkohol nicht unbedingt nötig, und es lassen sich durch die hier angegebene Methode grüne und gelbe Farbstoffe nebeneinander in Kristallform nachweisen.

Borodin[2] war der erste, der das Auftreten von Chlorophyllkristallen nach Behandlung grüner Pflanzenteile mit Alkohol an einem großen Pflanzenmaterial studierte und beschrieb. Er erhielt die Kristalle, wenn er die mikroskopischen Schnitte grüner Blätter mit absolutem Alkohol betupfte und dann die Präparate unter dem Deckglase langsam eintrocknen ließ. Er erhielt auf diese Weise zwar bei sehr verschiedenen Pflanzen grüne Kristalle, konnte sie aber nicht bei jeder beliebigen Pflanze erzeugen. Unter 776 Pflanzenarten, die Borodin in dieser Hinsicht prüfte, lieferten nur 190, also 24 %, grüne Kristalle. Dennoch war kaum daran zu zweifeln, daß alle chlorophyllführenden Pflanzen imstande sind, solche Kristalle zu liefern. Borodin nahm als Grund für die Tatsache, daß er die Kristalle nicht aus allen Pflanzen erhalten konnte, schwerere Extrahierbarkeit des Chlorophylls durch Alkohol, bedingt durch die Organisation des betreffenden Blattes, oder Reichtum an organischen Säuren an.

Was die Gestalt dieser Chlorophyllkristalle anlangt, so muß erwähnt werden, daß die von Borodin beschriebenen Kristalle meist die Gestalt gleichseitiger Dreiecke besaßen. Ich konnte dreieckige und auch sechseckige Plättchen, sowie dreiseitige Pyramiden nur in einem einzelnen Falle, bei Lemna trisulca nach Behandlung mit 50proz. Äthylalkohol gut ausgebildet be-

[1]) Tswett, M. (Ber. d. d. bot. Ges. 1911. **29**, 630) gebraucht diesen Ausdruck für die ganze Gruppe der gelben und rotgelben Blattfarbstoffe.

[2]) Bot. Zeitg. 1882. S. 608.

obachten (Fig. 8 u. 9). Wie erwähnt wurden sonst meist dunkelgrüne, sehr dichte Drusen oder Büschel feiner grüner Nadeln von nicht näher zu ermittelnder Ausbildung beobachtet. Nun scheint dieser Unterschied in der Kristallform jedoch von keiner weiteren Bedeutung zu sein, da auch bei Lemna trisulca das kristallisierte Chlorophyll häufig in Form von dichten Drusen erhalten wurde, während größere grüne Kristallplättchen, wenn auch unregelmäßig ausgebildet, gelegentlich auch bei anderen Pflanzen beobachtet werden konnten. Borodin hat in einzelnen Fällen auch Chlorophyllabscheidungen in Form von dunklen Körnern von mehr abgerundeten Umrissen beobachtet, wie ich dieselben zuweilen bei mangelhafter Kristallbildung besonders in den höheren Alkoholen beobachtete und direkt an den Tropfen entstehen gesehen habe. Auch dendritische Formen, wie sie bei einigen Algen (Nitophyllum, Vaucheria) fast immer zu erhalten waren, hat Borodin für einige Fälle beschrieben. Die von Willstätter[1] gewonnenen Kristalle hatten die Form regelmäßig drei- oder sechsseitiger Plättchen.

Ich bezeichnete bisher alle Vorkommnisse von kristallinischen Abscheidungen der grünen Farbstoffkomponente kurzweg als »Chlorophyllkristalle«. Nun müssen aber diese Kristalle durchaus nicht immer die gleiche Zusammensetzung haben.

Borodin äußerte betreffs der chemischen Natur seines »kristallisierten Chlorophylls« die Vermutung, daß es sich wohl nicht um natürliches Chlorophyll, vielmehr um »eine chemische Verbindung des Chlorophylls mit einem noch unbekannten Stoffe« handeln dürfte. Über die chemische Zusammensetzung des Chlorophyllfarbstoffes war damals noch wenig bekannt. Der Aufbau des Chlorophyllmoleküls ist erst in neuerer Zeit genauer ermittelt worden. Bekanntlich hat Willstätter[2] gezeigt, daß das Chlorophyll eine esterartige Verbindung ist. Durch Verseifung konnte er einen Alkohol der Fettreihe und eine magnesiumhaltige chromophore Verbindung von sauren Eigenschaften isolieren. Das Chlorophyllmolekül enthält nach Will-

[1]) Untersuchungen über das Chlorophyll VI. Liebigs Annalen d. Chemie. Bd. 358.

[2]) Willstätter, R., Untersuchungen über das Chlorophyll II. u. III. Ebenda. Bd. 350 u. 354.

stätter drei Carboxyle, von denen eines frei ist, ein zweites mit Methylalkohol und ein drittes mit einem stickstofffreien, ungesättigten, primären Alkohol der Fettreihe verestert ist, dem er die Formel $C_{20}H_{39}OH$ zuschreibt und den Namen Phytol beilegt. Das Phytol macht ungefähr ein Drittel des Moleküls aus. Als wahrscheinlichste Strukturformel des Chlorophyllmoleküls gibt Willstätter die folgende an:

$$C_{31}H_{29}N_4Mg \begin{cases} COOH \\ COOCH_3 \\ COOC_{20}H_{39} \end{cases}$$

Anfänglich unterschied Willstätter ein amorphes und ein kristallisierendes Chlorophyll. Später zeigte sich, daß das »amorphe« Chlorophyll identisch ist mit dem natürlichen, in der Pflanze vorliegenden Phytylchlorophyllid, welches einige Jahre später ebenfalls kristallisiert erhalten wurde; das »kristallisierende« Chlorophyll stellte sich hingegen als ein Umsetzungsprodukt heraus, welches bei der Einwirkung von Alkohol auf Chlorophyll, wenn dasselbe mit der extrahierten Blattsubstanz in Berührung bleibt, entsteht.[1] Der hierbei wirksame Bestandteil der Blattsubstanz ist ein Enzym, eine Esterase. Diese Umsetzung besteht darin, daß an Stelle des Phytols der betreffende, zur Extraktion verwendete Alkohol in das Chlorophyllmolekül eintritt. Von den drei Carboxylen des Chlorophylls reagiert nur jenes, welches mit dem Phytol verestert ist. In jeder Phase der Reaktion ist dabei der eintretende Alkohol äquivalent dem abgespaltenen Phytol.

In den Borodinschen Kristallen muß nach diesen Befunden Willstätters Äthylchlorophyllid vorgelegen haben. Auch bei den von mir durch die Einwirkung verdünnter Alkohole auf die Chloroplasten beobachteten kristallinischen Abscheidungen lagen offenbar derartige Alkylchlorophyllide vor.

Der Grund für die Erscheinung, daß die Kristalle nicht bei allen Pflanzen gleich leicht und reichlich entstehen, dürfte in verschieden reichlichem Vorhandensein der Chlorophyllase und dadurch bedingter, verschieden schneller Umsetzung des nativen Chlorophylls zu suchen sein. Doch dürfte auch verschieden

[1]) Willstätter, R., Untersuchungen über das Chlorophyll. XI. Liebigs Annalen d. Chemie. Bd. 378.

großer Chlorophyllgehalt und verschieden leichtes Eindringen der Außenflüssigkeit in manchen Fällen eine Rolle spielen. (Wie erwähnt, liefern besonders manche Algen sehr leicht und schon nach kurzer Einwirkungszeit reichlich grüne Kristalle, so Vaucheria, dann einzellige Algen wie Euglena, Carteria.)

Willstätter hat seine Untersuchungen nur mit den beiden ersten Gliedern der Alkoholreihe, mit Methyl- und Äthylalkohol ausgeführt. Es liegt jedoch kein Grund vor, an der Möglichkeit einer Substitution des Phytols durch höhere Alkoholradikale zu zweifeln. Die von mir in Propylalkohol meist sehr reichlich erhaltenen grünen Kristalle dürften wohl als Propylchlorophyllid anzusprechen sein. Dafür, daß in den in verschiedenen Alkoholen entstehenden Kristallen nicht die gleiche Substanz vorliegt, scheint die Beobachtung zu sprechen, daß die Färbung derselben nicht völlig übereinstimmend ist. Die in Propylalkohol entstehenden, meist sehr dichte Drusen von kurzen gedrungenen Kriställchen bildenden Abscheidungen, scheinen neben den rein laubgrünen, meist als lockere strahlige Aggregate von feinen Nadeln ausfallenden Kristallen in Methylalkohol einen Stich ins olivbraune zu haben.

Die Farbstoffabscheidungen, welche in Butyl- und Amylalkohol beobachtet wurden, zeigten meist nur schlecht ausgebildete kristallinische Formen oder behielten überhaupt die Tropfengestalt bei. Doch steht nichts im Wege, auch hier eine Umsetzung analog den vorerwähnten anzunehmen.

Anders verhält es sich mit den durch einige andere Lösungsmittel erhaltenen Chlorophyllkristallen. Wie erwähnt, konnten auch bei Behandlung der Chloroplasten mit wässerigen Lösungen von verschiedenen Aldehyden, Ketonen und Estern der einwertigen Alkohole der Ausfall von zuweilen deutlich ausgebildeten grünen Kristallen festgestellt werden. Es ist natürlich auf dem Wege der mikroskopischen Beobachtungen nicht festzustellen, was bei der Einwirkung von Ketonen, Aldehyden und Estern mit dem Chlorophyll geschieht und es müßte chemischen Untersuchungen überlassen bleiben, zu ermitteln, ob dasselbe auch hier eine Umsetzung erfährt, oder ob die Kristalle natives Phytylchlorophyllid darstellen, welches durch irgend-

welche Umstände hier leichter zur Kristallisation gelangt, als es für gewöhnlich im reinen Lösungsmittel der Fall ist.

Streng genommen ist der Chlorophyllfarbstoff keine einheitliche Substanz. Es ist mehrfach, zuletzt von Tswett, darauf hingewiesen worden, daß er aus zwei Komponenten besteht, von denen die eine mehr blau-, die andere mehr gelbgrüne Färbung besitzt. Aus den Willstätterschen Untersuchungen der letzten Jahre geht hervor, daß diese beiden Farbstoffe in chemischer Beziehung einander sehr nahe stehen, indem sie verschiedene Oxydationsstufen eines und desselben stickstoffhaltigen Kernes darstellen. In bezug auf den Gehalt an Magnesium und Phytol zeigen diese beiden Substanzen keinen Unterschied. Es ist daher anzunehmen, dass jede der beiden Farbstoffkomponenten imstande ist, durch Substitution des Phytols den Ester eines anderen Alkohols zu liefern. Die Borodinschen Kristalle stellen ein isomorphes Gemisch der beiden Äthylchlorophyllide dar. Übrigens tritt nach Willstätter der eine Farbstoff hinter dem anderen der Menge nach weit zurück. Das Verhältnis ist etwa 1 : 2 · 5.

Für die Beurteilung der als Endprodukt bei der Entmischung der beiden Phasen hervorgehenden grünen Kristalle sind somit folgende Umstände maßgebend:

1. Die Kristalle stellen nicht die Gesamtmenge der Lipoidphase dar, sondern nur den grün gefärbten Anteil derselben, während die Farbstoffe der Carotingruppe entweder ihrerseits als Kristalle ausfallen oder in Lösung gehen, in manchen Fällen auch in Tropfenform in der Zelle zurückbleiben.

2. Die grünen Kristalle sind keine einheitliche Substanz, sondern ein isomorphes Gemisch zweier Substanzen.

3. Die Kristalle bestehen, wenigstens da, wo die Entmischung der beiden Phasen des Chloroplasten durch Alkohole durchgeführt wurde, nicht aus dem nativen Phytylchlorophyllid, sondern aus einem Substitutionsprodukt des Chlorophyllids mit dem verwendeten Alkohol.

VIII. Versuche zur Ermittlung der chlorophyllolytischen Grenzkonzentration.

Zurückkehrend zur Ausgangsfrage, ob die Erscheinung der Chlorophyllolyse in irgend einem Zusammenhang steht mit den

kapillaren Eigenschaften jener niedersten Konzentrationen oberflächenaktiver Substanzen, welche ihren Eintritt hervorrufen, wurden noch einige weitere Versuche unternommen.

Makroskopisch, nämlich auf Grund der Fluoreszenz-Erscheinungen in der Lösung war, wie im 2. Kapitel ausgeführt worden ist, eine Feststellung der chlorophyllolytischen Grenzkonzentration aus dem Grunde nicht möglich, weil die Lösung und Exosmose des Farbstoffes erst lange nach stattgehabter Chlorophyllolyse erfolgt, also erst in Konzentrationen, welche über den zur Entmischung der beiden Phasen des Chlorophyllkornes notwendigen Konzentrationen liegen. Die Abtrennung ist nämlich nicht eine Folge der Lösung des Chlorophylls, sondern beruht zunächst auf einer Anreicherung der betreffenden oberflächenaktiven Substanz in der Lipoidphase. Es ist nun nicht leicht, dieses Stadium der Entmischung in allen Fällen schon in seinem Beginn unter dem Mikroskop zu erkennen und vor allem die für seinen Eintritt charakteristischen Konzentrationen genau festzustellen. Es mußte daher nach einer Methode gesucht werden, durch welche der Unterschied im Aussehen entmischter und nicht entmischter Chloroplasten deutlicher gemacht werden kann, falls eine feste Grenze da überhaupt bestehen sollte. Wie erwähnt, sind schon sehr niedere Alkoholkonzentrationen, ja selbst reines Wasser imstande, Änderungen in der Verteilung der beiden Phasen hervorzurufen, und es können alle Übergänge zwischen dieser Art der Entmischung und der als Chlorophyllolyse bezeichneten Abscheidung von Farbstofftröpfchen bestehen.

Vor einigen Jahren hat Tswett[1] auf die Erscheinung aufmerksam gemacht, daß gewisse organische Substanzen, welche als gute Chlorophyll-Lösungsmittel bekannt sind, das Chlorophyll trotzdem direkt aus dem grünen Gewebe nicht zu lösen vermögen. Er erklärt diese Beobachtung mit der Annahme einer »mechanischen, molekularen Affinität« des Chlorophylls zum Stroma, welche wohl durch Alkohol, Äther usw., nicht aber durch Petrolkohlenwasserstoffe überwältigt wird. Bringt man grüne Blätter in Alkohol oder Äther, so geht der grüne Farbstoff leicht und reichlich heraus. In Petroläther findet

[1]) Ber. d. d. bot. Ges. 1906. **24**, 316.

dagegen eine Lösung nicht statt. Es gehen nur etwas gelbe Farbstoffe in Lösung. Auch zerriebene Blätter geben nur Spuren von Chlorophyll an Petrolkohlenwasserstoffe ab, während Carotin aus diesen in großer Menge gewonnen werden kann. Wenn man nach den Angaben von Tswett statt reinen Petroläthers zur Extraktion solchen verwendet, dem geringe Mengen von Alkohol zugesetzt wurden, oder wenn man das Blattmaterial vor der Behandlung mit Petroläther abkocht, geht das Chlorophyll leicht in Lösung und liefert stark grün gefärbte Auszüge. Die Petrolkohlenwasserstoffe vermögen die Chlorophyllfarbstoffe erst dann zu lösen, wenn dieselben durch irgend einen Eingriff, wie die vorhergehende Abkochung oder die Wirkung von Alkoholzusätzen, »aus dem Bereich der Molekularkräfte« herausgebracht sind. Werden grüne Gewebe mit kochendem Wasser behandelt so zeigen sich dieselben Veränderungen an den Chloroplasten wie bei der Behandlung mit Alkoholen von jenen Konzentrationen, welche die Chlorophyllolyse bewirken, nämlich die Abtrennung feiner grüner Tröpfchen.

Wenn nun die Wirkung wässeriger Lösungen oberflächenaktiver Substanzen in bestimmten Konzentrationen eine Entmischung, also eine Lösung dieser Adsorptionsverbindung bewirkt, so war an die Möglichkeit zu denken, jene niedersten Konzentrationen oberflächenaktiver Substanzen festzustellen, von welchen das Chlorophyll in einen Zustand gebracht wird, in welchem es von Petrolkohlenwasserstoffen aus der Zelle gelöst werden kann.

Versuche in dieser Hinsicht wurden in der Weise angestellt, daß unverletzte Blätter der Versuchsobjekte (Ficus stipulata, Selaginella Martensii, Adiantum nigrum) mit Alkoholen verschiedener Konzentration vorbehandelt, hierauf getrocknet und zur Extraktion in Petroläther übertragen wurden. Das Vorhandensein von Chlorophyll wurde dann durch die rote Fluoreszenz vor dem in den dunklen Raum einfallenden Lichtkegel einer elektrischen Bogenlampe nachgewiesen. Die bei diesen Versuchen erhaltenen Resultate waren jedoch sehr schwankende. Selbst dann, wenn das Blattmaterial nach der Behandlung mit wässerigem Alkohol erst bei Zimmertemperatur, dann mehrere

Tage lang bei Temperaturen bis zu 100° getrocknet wurden, ging meist kein Chlorophyll in den Petroläther oder es konnte nur sprunghaft in einzelnen Proben der Reihe nachgewiesen werden. Auch das Zerreiben der Blätter führte zu keinem brauchbaren Resultat. Nach Abkochung der Blätter in Wasser wurde dagegen die Lösung des Chlorophylls in Petroläther leicht festgestellt, ebenso dann, wenn dem Petroläther geringe Mengen von Alkohol zugesetzt wurden. Es muß demnach ein Unterschied bestehen zwischen der tropfigen Entmischung, hervorgerufen durch siedendes Wasser und der Chlorophyllolyse durch wässerige Lösungen oberflächenaktiver Substanzen. Da also die auf diesem Wege erhaltenen Resultate nur unzuverlässige waren, mußte diese Methode verlassen werden.

Wenn man mikroskopische Schnitte einer grünen Pflanze mit einer wässerig-alkoholischen Lösung von Sudan III behandelt, so zeigt sich dabei, daß die Chloroplasten, da wo durch den Alkohol eine tropfige Entmischung hervorgerufen worden war, den Farbstoff speichern. Wendet man den Farbstoff hingegen in Alkohol von sehr niedriger Konzentration gelöst an, so tritt diese Färbung an Chloroplasten frischer Schnitte nicht auf. Allerdings lösen sehr niedere Alkoholkonzentrationen nur minimale Mengen von Sudan III, immerhin sind diese aber ausreichend, um, in Konzentrationen, welche Chlorophyllolyse bewirken, angewendet, eine Speicherung in der Lipoidphase deutlich erkennen zu lassen. Offenbar ist also ein bestimmtes Stadium der Entmischung notwendig, um die Speicherung von Farbstoff in der Lipoidphase zu ermöglichen. Eine Reihe von Versuchen zielte nun darauf hin, festzustellen, in welchen niedersten Konzentrationen der Alkohole die Farbstoffspeicherung durch die Chloroplasten erfolgt, von welchen Konzentrationen aufwärts also die Chloroplasten sich mit Sudan färben lassen. Sudan III ist als typisch lipoidlöslicher Farbstoff bekannt. Es löst sich in der Lipoidphase des Chloroplasten leichter als im Stroma, und man kann deutlich beobachten, daß nur die grünen Tröpfchen, nicht aber das Stroma den roten Farbstoff aufnehmen. Als ein günstiges Objekt für diese Untersuchungen erwies sich Tradescantia viridis, deren Chloroplasten auch relativ leicht den Tropfenaustritt erkennen lassen. Die Beobachtungen wurden

nur an den Chloroplasten angeschnittener Zellen, hauptsächlich an den Schnitträndern gemacht, um eine direkte Berührung der Chloroplasten mit der Außenflüssigkeit zu ermöglichen und den Konzentrationsausgleich zu erleichtern. Dieselben lassen die Farbstoffspeicherung tatsächlich in etwas niedrigeren Konzentrationen erkennen als Chloroplasten unverletzter Zellen nach derselben Zeit der Einwirkung. Als völlig ungeeignet für solche Versuche erwiesen sich die Chloroplasten einiger anderer monokotyler Pflanzen, deren Chloroplasten an Stelle von Stärke Tröpfchen einer ölartigen Substanz produzieren. Wie erwähnt, lassen solche Objekte den Austritt grüngefärbter Tropfen bei Behandlung mit Alkoholen besonders leicht beobachten, offenbar darum, weil die Lipoidphase der Chloroplasten sich nach der bis zu einem gewissen Grade fortgeschrittenen Entmischung mit diesen Tropfen vereinigt. Diese tropfenförmige Assimilationsprodukte speichern nun die Fettfarbstoffe sehr leicht und zwar nehmen sie den Farbstoff in jeder beliebigen, auch der niedersten Alkoholkonzentration leicht auf. Dadurch wird die Erkennung jenes Stadiums, in dem die grüne Lipoidphase den Farbstoff speichert, unmöglich gemacht. Es scheint diese Beobachtung dafür zu sprechen, daß zwischen der Art, wie diese fettartigen Assimilationsprodukte im Chlorophyllkorn enthalten sind und der Art, wie die grüngefärbte Lipoidphase an seinem Aufbau beteiligt ist, ein beträchtlicher Unterschied besteht. Lipoidphase und lipoidartige Assimilationsprodukte scheinen nicht in gleicher Weise am Stroma adsorbiert zu sein.

Chloroplasten angeschnittener Zellen lassen in Berührung mit Wasser oder Alkoholen sehr niederer Konzentration starke Quellungserscheinungen beobachten, wobei es wahrscheinlich auch bis zu einem gewissen Grade zu einer Trennung der beiden Phasen kommt. Nun zeigen aber Chloroplasten, bei denen diese Quellungserscheinungen in sehr niedrigen Alkoholkonzentrationen hervorgerufen wurden, nicht die Fähigkeit, Farbstoff zu speichern. Offenbar ist ein ganz bestimmter Grad der Entmischung notwendig, um die Farbstoffaufnahme zu ermöglichen. Es war zunächst daran zu denken, daß die Farbstoffspeicherung mit der Tötung der Plasmakörper in Zusammenhang stände, aber es zeigte sich, daß jene Alkoholkonzentrationen,

in welchen die Färbung erfolgt, höher liegen, als die, welche die Abtötung bewirken. Neben Sudan III wurden noch ein paar andere Farbstoffe verwendet. Neutralrot, ein Farbstoff, der sich gleich gut in Alkohol wie in Wasser löst, bewirkt ebenfalls eine Färbung der Chloroplasten, allerdings wohl hauptsächlich eine Färbung der Hydrokolloide, welche ebenfalls nur von einer bestimmten Alkoholkonzentration aufwärts wahrgenommen werden kann, so daß auch hier angenommen werden muß, daß eine Lockerung in der Bindung der beiden Komponenten, eine Lösung des Gefüges des Chlorophyllkörpers notwendig ist, um die Aufnahme von Farbstoffen in eine der beiden Phasen möglich zu machen.

Diese Beobachtungen waren sehr erschwert durch den Umstand, daß es nicht leicht möglich ist, die Farbstoffaufnahme bei den schon an sich grüngefärbten Körperchen zu erkennen und daß schon größere Mengen dieses Färbungsmittels aufgenommen werden müssen, um einen Farbenunterschied erkennbar zu machen. Nur große Kontraste können wahrgenommen werden, und da sich solche nicht ergaben, wenn die Alkoholkonzentrationen nur wenig verschieden waren, wurden die gewünschten genauen Resultate auch auf diesem Wege nicht erhalten.

Zusammenfassung.

Das Chlorophyllkorn der höheren grünen Pflanzen besteht aus zwei Phasen, einer leicht quellbaren Hydroidphase und einem grüngefärbten Anteil von Lipoidcharakter. Die Tatsache, daß das lebende Chlorophyllkorn in den meisten Fällen ein völlig homogenes Aussehen hat, führt zur Annahme einer überaus feinen emulsoidartigen Verteilung der Lipoidphase in der Hydroidphase, so daß der normale Aufbau des Chloroplasten als eine amikronische Verteilung der beiden Komponenten angesehen werden kann. Durch Einwirkenlassen von oberflächenaktiven Substanzen in wässerigen Lösungen verschiedener Konzentration gelingt es, die beiden Phasen in beliebigem Grade zu entmischen und die amikronische Verteilung der Lipokolloide in den Hydrokolloiden in eine submikronische und endlich eine mikronische überzuführen.

Die Veränderungen, die durch wässerige Lösungen oberflächenaktiver Stoffe (zur Untersuchung gelangten Alkohole der Fettreihe, einige Aldehyde, Ketone und Ester) mit zunehmender Konzentration hervorgebracht werden, lassen sich in folgender Weise zusammenfassen:

I. Stadium der Agglutination: entspricht dem allmählichen Übergang aus dem amikronischen in den submikronischen Verteilungszustand und ist hauptsächlich eine Folge der Quellung der Hydroidphase. Hier sind fallweise einige Substadien zu unterscheiden, unter denen die Annahme sternförmiger Umrisse und die Klumpenbildung die wichtigsten sind.

II. Stadium der Chlorophyllolyse: die Vergröberung der Teilchen zu Mikronen und die damit verbundene zunehmende Trennung der beiden Phasen. Die Chlorophyllolyse läßt sich häufig unterscheiden in

feintropfige Entmischung und
Bildung freier Farbstofftropfen.

III. Stadium der Kristallabscheidung in Konzentrationen knapp an der Lösungsgrenze für Chlorophyll und etwas darüber.

Beziehungen zwischen dem Eintritt des Stadiums der Chlorophyllolyse und den Kapillaritätseigenschaften der zur Erzielung desselben notwendigen Konzentrationen der oberflächenaktiven Substanzen konnten mangels genauer Methoden nicht aufgefunden werden.

Konsistenz und Widerstandsfähigkeit scheint nicht bei allen Chloroplasten gleich zu sein. Besonders in bezug auf Quellbarkeit verhalten sich die Chloroplasten verschiedener Pflanzen recht verschieden. Florideenchromatophoren scheinen dem flüssigen Aggregatzustand am nächsten zu kommen.

Die Lösungsgrenze für den Chlorophyllfarbstoff wurde für die ersten drei Glieder der Alkoholreihe festgestellt.

Methylalkohol	löst	bei	18°C	von	etwa	59%	aufwärts
Äthylalkohol	„	„	„	„	„	44%	„
Propylalkohol	„	„	„	„	„	25%	„

Höhere Alkohole vermögen in ihren wässerigen Lösungen Chlorophyll nicht mehr in durch Fluoreszenz nachweisbaren Mengen zu lösen. Die Fluoreszenzerscheinung beim Chloro-

phyll wird beeinträchtigt durch jede Trübung des Lösungsmittels. Jeder Überschuß an Chlorophyll erzeugt solche Trübungen, weshalb zum Nachweis der Fluoreszenz in wässerigen Alkohollösungen stets die geringste Chlorophyllmenge, welche in absolutem Alkohol noch Fluoreszenz hervorruft, zu verwenden ist.

Die Möglichkeit zur Entstehung grüner Farbstoffkristalle ist allgemein vorhanden. Grüne Kristalle sind in Pflanzen, welche Chlorophyll in nicht zu geringen Mengen führen, leicht zu erzeugen. Der Nachweis wurde an einer Reihe von Pflanzen der verschiedensten systematischen Stellung erbracht. Unter anderem wurden in den Zellen verschiedener Algen aus der Reihe der Florideen, Phaeophyceen, Diatomeen und selbst in chlorophyllreicheren Cyanophyceen Kristalle erhalten. Gleichzeitig mit dem Chlorophyll werden auch die gelbroten Chromatophorenfarbstoffe, meist in kristallisierter Form, abgeschieden.

Grüne Kristalle wurden nicht nur in Alkohol, sondern auch in verschiedenen anderen Chlorophyllösungsmitteln, in Estern, Aldehyden und Ketonen erhalten. Die in Alkoholen erzeugten Kristalle dürften nach Willstätter Alkylderivate des Chlorophylls darstellen; die Frage nach der chemischen Natur der in anderen Lösungsmitteln ausfallenden grünen Kristalle konnte auf dem Wege der angeführten Methoden keine Beantwortung erfahren.

Prag, Pflanzenphysiologisches Institut der Deutschen Universität, September 1912.

Figurenerklärung.

Fig. 1. Quellungserscheinungen in Wasser an Chloroplasten angeschnittener Zellen von Crinum amabile.

Fig. 2. Quellungserscheinungen in Wasser an Chloroplasten angeschnittener Zellen von Vallisneria spiralis.

Fig. 3. Querdurchschnittene Palissadenzellen eines Blattes des Gartenstiefmütterchens, von verquollenen Chloroplasten erfüllt, die eine schaumige Masse bilden.

Fig. 4. Chloroplasten von Vallisneria spiralis nach 24stündiger Behandlung mit 5proz. Äthylalkohol. (Sternform, Verbindungsstränge.)

Fig. 5. Chloroplasten von Vallisneria spiralis nach sehr kurzer Einwirkung von 50proz. Äthylalkohol. (Agglutination und feintropfige Entmischung.)

Fig. 6. Entmischungserscheinungen an den Chloroplasten von Agave americana nach 7stündiger Einwirkung von $2^1/_2$proz. Amylalkohol.

Fig. 7. Entmischungserscheinungen an den Chloroplasten von Sedum reflexum nach 24stündiger Einwirkung von $2^1/_2$proz. Amylalkohol.

Fig. 8 u. 9. Chlorophyllkristalle in den Zellen von Lemna trisulca, erzeugt in 50proz. Äthylalkohol. (In Fig. 9 auch einige gelbe Kristalle.)

Fig. 10. Chlorophyllkristalle und Kristalle eines Farbstoffes der Carotingruppe neben Phycoerythrinkristallen in den Zellen von Nitophyllum.

Fig. 11. Tropfenförmige grüne und gelbe Farbstoffabscheidungen bei Diatomeen nach Behandlung mit 50proz. Äthylurethan.

Fig. 12. Kristallinische Abscheidungen von Chlorophyll und gelben Farbstoffen in Blattzellen von Tradescantia viridis nach Behandlung mit 70proz. Aceton.

Fig. 13. Moosförmige Aggregate von nadelförmigen Chlorophyllkriställchen in einer Vaucheria nach Behandlung mit 70proz. Aceton.

Vergrößerung sämtlicher Figuren: Reichert Ok. IV. Obj. 7a.

Liebaldt gez.

Verlag von Gusta

E. Laue, Lith. Inst. Berlin

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Zeitschrift für Botanik

Jahr/Year: 1913

Band/Volume: 5

Autor(en)/Author(s): Liebaldt Erna

Artikel/Article: Über die Wirkung wässeriger Lösungen oberflächenaktiver Substanzen auf die Chlorophyllkörner. 65-113