©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Vitalfärbungsstudien an Lebermoosen. II

Von

Walter Porzer

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien)

Mit 1 Tafel

Eingelangt am 12. Juni 1952

Im I. Teil (Porzer 1952) behandelte ich die Färbbarkeit der Lebermoose im Übersichtsbild, sowie die Abhängigkeit der Zellinhaltsfärbung von der Wasserstoffionenkonzentration. Der nun folgende II. Teil berichtet über die Färbbarkeit der Lebermooszellwände und Rhizoiden. Im Anschluß daran folgen einige erwähnenswert erscheinende Beobachtungen an einzelnen Moosen.

Das Verhalten der Zellwände lebender und toter Zellen bei Vitalfärbung wurde schon an vielen Objekten untersucht und beschrieben (vgl. Becker 1936, Czaja 1936, Borris 1937, Kersting 1937, Höfler 1946 f. u. a. m.). Die Lebermooszellwand dagegen hat, sowohl was die vitalfärberische als auch die chemische Untersuchung betrifft, wenig Beachtung gefunden. Da Chemismus und Färbbarkeit in gewissem Zusammenhang stehen, will ich vorerst einen kurzen Überblick über chemische Befunde an Lebermoosen geben.

Stahl 1888 empfahl als erster die chemische Untersuchung der Lebermoose, da diese nach seiner Ansicht vor Tierfraß „chemisch" geschützt seien. Ruge 1893 fand, daß Zellulosereaktion bei gewissen Laub- und Lebermoosen erst nach vorherigem Erwärmen mit Kalilauge eintritt. Er schloß auf einen gerbstoffähnlichen Körper, der durch die Vorbehandlung entfernt wird. Ohne Schwierigkeit gelang der Zellulosenachweis Gjokic 1895, allerdings nur an drei Arten. Kamerling 1897 fand in der Wand aller Rhizoiden von *Marchantia* Zellulosereaktion. Czapek 1899, 1913 isolierte zwei neue chemische Körper „Sphagnol" und „Dicranumgerbsäure". In der Lebermoosasche fand Lohmann 1903 Kalkinkrustierung bei *Pellia*, sowie bei allen Lebermoosen Manganstoffe, Kaligehalt, Magnesia, Chlor, Phosphorsäure und Kieselsäure in wechselnden Mengen. Eingehende Untersuchungen stammen von Müller 1905. Er nimmt an, daß die Zellwände aus mehreren Zellulosen bestehen, denen z. T. phenolartige Bestandteile beigemengt seien. Ferner wurden bei *Mylia (Leptoscyphus) Taylori* und *Mastigobryum trilobatum* Hemizellulosen und Methylpentosen nachgewiesen. Douin 1922 gibt an, daß die Zellwandverdickungen in den Kapselzellen der Lebermoose aus Zellulose und „Bryophytin" bestehen. Letzteres bedinge die Färbung. Nach Zwickel 1932 besteht die Mittellamelle, die oft auch Gerbstoffe gespeichert hat, aus Zellulose, wäh-

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

rend sich die Verdickungen der Zellen aus Hemizellulosen, vermengt mit Gerbstoffen und Pektin, zusammensetzen sollen.

Als Vorbereitung für meine Untersuchungen führte ich einige mikrochemische Reaktionen durch. Der Zellulosenachweis mit Chlorzinkjod zeigte bei *Calypogeia trichomanis, Lepidozia reptans, Lophozia barbata, Scapania nemorosa* eine farblose Mittellamelle und violett gefärbte Verdickungsschichten. Auch die Rhizoiden waren intensiv violett. Bei Behandlung mit Kupferoxydammoniak ließen die Membranen starke Quellung erkennen.

1. Färbung der Mittellamelle und Verdickungsschichten mit basischen Farbstoffen und Entfärbung mit $CaCl_2$

Bei vitaler Tinktion von Membranen unterscheidet man allgemein zwei verschiedene Arten. Entweder erfolgt eine chemische Bindung der Farbstoffteilchen mit Stoffen, welche die Zellwand imprägnieren, dann spricht man nach Drawert von chemischer Niederschlagsfärbung, oder es erfolgt eine lockere Bindung durch Elektroadsorption, die als elektroadsorptive Färbung bezeichnet wird. Allerdings betrachtet Kinzel 1951, der am Wiener Pflanzenphysiologischen Institut mit Algen arbeitete, den Unterschied zwischen diesen beiden Färbearten nicht als grundsätzlich, sondern führt ihn auf Verschiedenheit der Dissoziationskonstanten der entstehenden Substrat-Farbstoffverbindungen zurück. Bekanntlich sind die zellulosehältigen Membranen bei neutraler und schwach saurer Lösung negativ aufgeladen. Dies ermöglicht die Adsorption der positiv geladenen Farbkationen. Die negative Aufladung der Zellwand ist vom cH der umgebenden Lösung abhängig. Die elektroadsorptive Färbung der Zellwand ist also im Gegensatz zur chemischen Niederschlagsfärbung an eine p_H-Grenze gebunden. Für den praktischen Mikroskopiker ist die Unterscheidung dieser beiden Färbungsarten von Bedeutung. Folgende Reaktion läßt sich anwenden. Eine $CaCl_2$-Lösung von 0,15—0,3 mol wird durch das gefärbte Präparat gesaugt. Es hat sich als günstig erwiesen, die Konzentration, dem osmotischen Wert des Objektes angepaßt, so zu wählen, daß mäßig schwache Plasmolyse bewirkt wird. Sofort beim Durchsaugen kann man erkennen, wie sich Farbstoffwolken vom gefärbten Präparat loslösen und das Filterpapier färben. Es wird nun solange Salzlösung durchgesaugt, bis das $CaCl_2$ farblos bleibt. Nun zeigt sich, daß elektroadsorptiv gefärbte Schichten der Membran rasch entfärbt werden, während chemische Niederschlagsfärbung durch diese Behandlung nicht verändert wird. Es ist seit Pfeffer 1886 bekannt und eine in neuerer Zeit oft bestätigte Tatsache (Borris 1937, Drawert 1937, Kersting 1937, Höfler und Stiegler 1947, Höfler und Schindler 1951 und Stiegler 1950), daß durch Zu-

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

satz positiv geladener Salzkationen basische Farbstoffe, die an pflanzlichen Zellwänden adsorptiv festgelegt sind, aus ihrer Adsorptionsbindung verdrängt werden.

Als einleitenden Reihenversuch verwendete ich die Farbstoffe im Lösungsverhältnis 1 : 5000, 1 : 10.000, 1 : 20.000, 1 : 30.000 und 1 : 50.000 bei einer Färbedauer von 10 Minuten, um festzustellen, bei welcher Konzentration wohl eine kräftige Färbung der Zellwand bewirkt wird, der Unterschied zwischen Mittellamelle und Sekundärlamelle aber am deutlichsten erkennbar ist. 1 : 5000 und 1 : 10.000 lieferten die besten Ergebnisse, während die Zellwände bei 1: 20.000 hellblau und bei 1 : 50.000 nur mehr ganz schwach gefärbt waren.

Im folgenden variierte ich auch die Färbedauer zwischen 1 und 10 Minuten. Hierbei erweisen sich 5—10 Minuten als günstigste Zeit. Bei zu kurzer Färbung war die Tinktion zu gering und bei längerer zu kräftig, so daß die Zellwand einheitlich dunkel getönt erschien. Auf Grund dieser Ergebnisse verwendete ich im weiteren die Farbstoffe im Lösungsverhältnis 1 : 10.000 und wählte als Färbedauer 10 Minuten.

Bei den zunächst ohne Berücksichtigung des pH-Wertes durchgeführten Färbungen konnte ich feststellen, daß die Zellmembranen eine Differenzierung in die bekannten Schichten erkennen lassen, die im ungefärbten Zustand nicht auftritt. Die schmale, stets nur hell gefärbte Mittellamelle liegt zwischen den dunkleren Verdickungsschichten, die vielfach noch dunkel gesäumt erscheinen (Abb. 1 a). Dieser Unterschied ist nicht bei allen Farbstoffen (Brillantgrün, Janusgrün und Safranin) deutlich erkennbar. Als ich dann cH-abgestufte Farbbadreihen verwendete, ließ sich in allen pH-Bereichen der Schichtbau mehr oder weniger deutlich erkennen. Die Intensität der Färbung war jedoch, wie aus folgender Tabelle ersichtlich, in den einzelnen pH-Stufen nicht gleich.

Im stark sauren Bereich (pH = 2,4) ist die Membranfärbung gering, nimmt dann an Intensität allmählich zu, und ist von pH 4,8 bis 7,1 gleichbleibend stark. Ab pH 7,45 und z. T. schon ab 7,1 macht sich die Speicherkonkurrenz durch den Zellsaft bemerkbar, so daß wieder eine Abnahme, bzw. bei pH 10,1 oft völliges Fehlen von Färbung beobachtet wird.

Die praktische Durchführung der Untersuchungen erfolgte so, daß ich nach dem Auswaschen mit Traubenzucker plasmolysierte, um genau feststellen zu können, ob Färbung der Membran oder des Zellinhaltes vorliegt. Nicht immer zeigen Verdickungsschichten und Mittellamelle denselben Farbton. *Chiloscyphus pallescens* hatte bei Färbung mit Brillantcresylbau im Gegensatz zu allen übrigen Moosen violette Sekundärschichten, während die Mittellamelle hellblau gefärbt war. Bei *Calypogeia fissa*, die ich mit Gentianaviolett gefärbt hatte, waren die

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Zellwandfärbung bei *Calypogeia fissa*

	pH 2,04	3,1	4,8	6,0	6,35	7,1	7,45	10,1
Brillantcresylblau	±	+	++	++	++	++	+	+
Cresylechtviolett	±	+	++	++	++	+	±	±
Gentianaviolett	±	+	++	++	++	++	++	—
Neutralrot	±	+	++	++	++	+	+	—
Neutralviolett	±	++	++	++	++	++	+	—
Prune pure	—	±	±	±	±	±	±	±

+ + = stark, + = hell, ± = schwach, — = nicht gefärbt.

Mittellamelle violett und die angrenzenden Verdickungsschichten blau. Ein eigenartiges Verhalten der Membranen konnte ich bei Färbung mit Neutralrot an *Calypogeia fissa* feststellen. Ich verwendete die pH-Stufen 3,1 und 4,8. Bei mikroskopischer Untersuchung nach kurzem Auswaschen konnte ich in beiden Fällen deutliche Membranfärbung feststellen. Die gleichen Moosstämmchen untersuchte ich auch am nächsten Tag, nachdem ich sie 24 Stunden in der farblosen Pufferlösung belassen hatte. Nun zeigten sich die Zellwände fast völlig entfärbt und das Innere der Zelle enthielt zahlreiche dunkelviolette Farbtröpfchen. Ähnliches fand ich auch bei *Blepharostoma trichophyllum, Chiloscyphus pallescens, Lophozia Mülleri* und *Lophozia reptans,* deren Zellwände nach Färbung mit Neutralrot deutlich rosa gefärbt waren. Nach 24 stündigem Auswaschen in Pufferlösung waren die Zellwände farblos.

Für tote Zellen konnte ich immer wieder die bekannte Tatsache ermitteln, daß die Membranen durch Stoffe, die aus den abgetöteten Protoplasten in die Zellwand treten, die Eigenschaft der stärkeren Färbbarkeit erhalten (BRAUNER 1933).

Es war nun von Interesse festzustellen, wie die gefärbte Mittellamelle und die Verdickungsschichten auf einwirkendes $CaCl_2$ reagieren. Nach Durchsaugen einer 0,33 molaren $CaCl_2$-Lösung trat sofort geringe Plasmolyse auf und die das Moos umgebende Lösung färbte sich. Nun lag die Mittellamelle der Membranen als schmaler, dunkler Streifen zwischen den stark entfärbten Verdickungsschichten (Abb. 1 b). Auch wiederholtes Durchsaugen von $CaCl_2$ konnte den Farbstoff aus der

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Mittellamelle nicht verdrängen. Dies läßt darauf schließen, daß deren Färbung durch chemische Bindung des Farbstoffes erfolgt, während die Sekundärlamellen durch elektroadsorptiv gebundene Kationen gefärbt werden. Die im stark sauren und stark alkalischen Bereich auftretende geringe Färbung der Membranen verschwindet nach Einwirkung von $CaCl_2$ völlig.

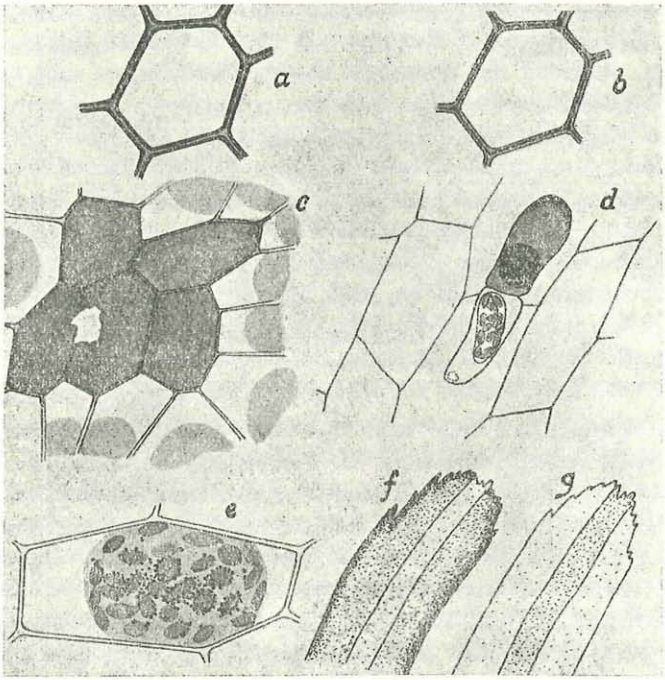


Abb. 1. Vitalfärbung von Lebermoosen. — a) Zellwand von *Calypogeia fissa*, gefärbt mit Brillantcresylblau 1 : 10.000. — b) Desgl., nach Behandlung mit $CaCl_2$ 0,33 mol. — c) *Pellia Neesiana*, durch Stichwunde verletzt, dann mit Brillantcresylblau gefärbt und plasmolysiert. — d) Desgl., Schleimpapille, gefärbt mit Brillantcresylblau 1 : 10.000. — e) Desgl., Zelle mit Neutralrot p_H 4,8 gefärbt, sodann plasmolysiert. — f) *Diplophyllum albicans*, Blättchen nach Färbung mit Methylenblau 1 : 10.000. — g) Desgl., nach Behandlung mit $CaCl_2$.

2. Färbbarkeit der Rhizoiden

An der Stengelunterseite vieler folioser Lebermoose finden sich, meist in der Mitte oder am Grunde der Unterblätter aus Initialzellen entspringend, ungekammerte Zellschläuche, die Rhizoiden. Im ungefärbten

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Zustand erscheinen diese wasserhell oder leicht bräunlich gefärbt; sie enthalten vielfach Pilzhyphen.

Bei Vitalfärbung fällt die leichte und rasche Anfärbbarkeit der Rhizoiden auf. Diese Erscheinung, sowie bisweilen auftretende Intensitätsunterschiede zwischen Rhizoiden und Zellwände veranlaßten mich, den zeitlichen Verlauf der Färbung vom Beginn des Farbstoffzutrittes an fortlaufend zu beobachten. Zunächst ging ich so vor, daß ich dem unter dem Mikroskop liegenden Präparat die Farbstofflösung zugab und den Verlauf der Färbung direkt beobachtete. Dabei zeigte sich, daß die Rhizoiden sofort bei Kontakt mit dem Farbstoff blasse Färbung annahmen, während die Zellwände an den Blatträndern erst nach etwa 1 Minute denselben Farbton aufwiesen. Nach 4 Minuten waren die Rhizoiden normal kräftig tingiert, die Zellwände erreichten diesen Grad der Färbung erst nach etwa 5 Minuten Färbedauer. Auch Wiederholungen dieses Versuches ergaben immer ein Vorauseilen der Rhizoiden. Es bestand die Möglichkeit, daß der Farbstoff zu den Rhizoiden leichter Zutritt findet als zu den Zellwänden der Blättchen; ich änderte daher die Versuchsanordnung so ab, daß ich die zu färbenden Stämmchen mit einer Pinzette in die Farblösung hielt und dabei hin- und herbewegte; die Färbedauer variierte ich von einer Sekunde bis zu einer Minute. Auch jetzt zeigten die Rhizoiden schon nach der ersten Sekunde geringe Anfärbung, während die Zellwände noch farblos waren; diese ließen erst nach 2—3 Sekunden beginnende Färbung erkennen.

Es schloß sich die Frage an, wie sich die Färbung der Rhizoiden gegen stark ionisierte Salzlösung verhält. Beim Durchsaugen von 0,33 mol $CaCl_2$ trat wie bei den Zellwänden rapide Entfärbung ein. Die Membran der Rhizoiden wurde dabei recht hell, aber niemals konnte ich auch bei längerem Bad mit $CaCl_2$ eine völlige Entfärbung feststellen. Bei einzelnen Moosen wie *Diplophyllum albicans* und *Lophozia barbata* ist die Entfärbung besonders stark. Es ist anzunehmen, daß neben der elektroadsorptiven Bindung des Farbstoffes auch chemische Niederschlagsfärbung beteiligt ist. Bei Anwendung pH-gestufter Farbreihen fiel auf, daß die Rhizoiden wohl in allen Fällen Färbung zeigten, im stark sauren Bereich aber bis pH 3,1 immer nur hell gefärbt waren und erst ab pH 4,8 intensiver tingiert erschienen. Ich untersuchte daher in einem Reihenversuch die Rhizoidenfärbbarkeit im sauren Bereich, wobei ich als Zwischenstufen pH 2,04, 2,24, 2,56, 3,1, 3,9 und 4,8 verwendete. Folgende Tabelle zeigt die Grenzwerte für schwache, bzw. starke Färbung der Rhizoiden mit Brillantcresylblau.

Die Grenze zwischen schwacher und starker Färbung ist also bei den einzelnen Moosen nicht gleich, liegt aber durchschnittlich zwischen p_H 2,56 und p_H 4,38.

Bei Behandlung der schwachen Färbung mit $CaCl_2$ ist auch diese z. T. noch auswaschbar. Andererseits zeigt sich, daß p_H 3,46 nach Ent-

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

färbung etwa dem Farbton von p_H 2,56 in unbehandeltem Zustand entspricht. Es ergibt sich somit, daß die Färbung der Rhizoiden aus zwei Komponenten besteht, einer elektroadsorptiven, die der starken Anfärbung entspricht und durch $CaCl_2$ entfärbbar ist, und einer chemischen Niederschlagsfärbung, die als schwache Färbung erhalten bleibt.

Vergleicht man den Farbton der Rhizoiden und der Zellwände, so ist festzustellen, daß bezüglich der Intensität der Anfärbung vielfach

Rhizoiden von	schwache Färbung bis	starke Färbung ab
Aplozia riparia	p_H 2,56	p_H 3,1
Bazzania trilobata	3,1	3,40
Calypogeia fissa	3,1	3,46
Lophozia Mülleri	2,56	3,1—3,46
Marchantia polymorpha	3,95	4,38
Pellia Neesiana	3,66	3,95
Scapania nemorosa	3,1	3,46

kein Unterschied besteht. Ist dies aber der Fall, z. B. bei *Pellia Neesiana*, so sind die Rhizoiden stets kräftiger tingiert. Einen Unterschied im Farbton fand ich lediglich bei Färbung mit Toluidinblau p_H 3,1, bei dem die Rhizoiden hellblau, die Zellwände jedoch violett gefärbt waren.

Nach Färbung mit dem elektroneutralen, basischen Farbstoff Rhodamin B (vgl. STRUGGER 1949) sind die Rhizoiden stets hellviolett gefärbt, auch die Basalzellen heben sich durch stark gefärbte Zellwände und Zellflächen von den umgebenden Zellen ab. Längeres Auswaschen in dest. Wasser, wobei ich das Waschwasser wiederholt wechselte, bis es farblos blieb, bewirkt wohl eine Entfärbung der Rhizoiden, die aber nicht vollständig ist. Ein blaßrosa Farbton bleibt meist auch nach 24stündigem Auswaschen noch erhalten. Nur bei *Aplozia sphaerocarpa* und *Diplophyllum albicans* konnte ich eine völlige Entfärbung feststellen. Die Anwendung von 0,28 mol $CaCl_2$ nach der Färbung mit Rhodamin B bewirkt sofort rapides Ausblassen der Rhizoiden, doch bleibt auch in diesem Fall eine blaßrosa Färbung erhalten, z. B. bei den *Calypogeia*-Arten, *Lophozia Mülleri* und *Pellia Neesiana*. Gleiches Verhalten zeigen auch die Initialzellen. Da das praktisch undissozierte Rhodamin B nur chemische Niederschlagsfärbung bewirken kann, ist daraus zu schließen, daß es sich bei den Rhizoiden und Basalzellen um eine solche handelt.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Der Grund der raschen Farbstoffaufnahme durch die Rhizoiden liegt vielleicht in ihrer Aufgabe für das Moos, da sie neben der Befestigung am Substrat z. T. auch Nährstoffe zuzuführen haben (MÜLLER 1939).

3. Beobachtungen an *Pellia Neesiana* und *Diplophyllum albicans*

Das foliose Lebermoos *Pellia Neesiana* bildet bei Kultur schmale, zungenförmige Zuwüchse aus, die für die mikroskopische Untersuchung besser geeignet sind als der normalerweise stark gelappte Thallus. Ich gebe zunächst auszugsweise ein Protokoll einer Färbungsreihe mit Brillantcresylblau 1 : 10.000 wieder.

p_H 4,8: Die Zellwände am Thallusrand hellblau und an der Abrißstelle intensiv gefärbt, sonst farblos. Die Rhizoiden und Initialzellen sind lebhaft gefärbt. Die Spitzenzellen der Schleimpapillen haben durchwegs gefärbte Membranen.

p_H 7,45: Zellwandfärbung wie oben. In den Randzellen des Thallus findet sich blauer Tröpfchenniederschlag und diffuse Zellsaftfärbung. Die Schleimpapillen zeigen nur in den Spitzenzellen gefärbten Inhalt.

p_H 10,1: Zellwände farblos, bzw. nur sehr blaß gefärbt. Die Ölkörper vielfach blau. Beide Zellen der Schleimpapillen haben blaue Zellwände und Inhaltsfärbung, auch in dem Bereich des Thallus, wo dieser farblos ist.

Vergleicht man das Verhalten von *Pellia Neesiana* mit anderen Moosen, so ist am auffälligsten, daß ein Großteil der Zellwände in allen p_H-Bereichen farblos bleibt, während die Membranen der Rhizoiden die übliche starke Färbbarkeit aufweisen. Um dieses eigenartige Verhalten näher zu untersuchen, verletzte ich vorsichtig den Thallus mit einer spitzen Insektennadel, so daß nur sehr wenige Zellen verletzt wurden, und färbte sodann mit Brillantcresylblau (Abb. 1 c). Die Zellwände in Wundrandnähe waren zwei Zellreihen weit gefärbt, wenn mehrere Zellen durch den Stich verletzt worden waren. Wurde nur eine Zelle angestochen, so zeigten nur die benachbarten Zellen Membranfärbung. Die Zellen, deren Zellwände auf diese Weise gefärbt waren, ließen sich nicht plasmolysieren. Alle übrigen Zellen hatten farblose Membranen. Ich schnitt nun den Thallus mit einer scharfen Rasierklinge in schmale Streifen und färbte die Teilstücke. An den Schnitträndern färbten sich die Zellwände zwei bis drei Zellreihen weit intensiver an. Im Bereich der Mittelrippe des Thallus war der Farbstoff weiter vorgedrungen. Es zeigte sich, daß in beiden Fällen nur die Membranen in Wundrandnähe die übliche starke Färbbarkeit geschädigter Zellen besitzen, alle übrigen aber mit Ausnahme der am Thallusrand gelegenen keine Farbstoffaufnahme erkennen lassen.

Interessant ist das Verhalten der zweizelligen Schleimpapillen, deren Färbbarkeit schon von CZAJA 1936 erwähnt wird. Besonders die Mem-

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

bran der Spitzenzelle färbt sich in allen p_H-Bereichen deutlich an. Die Intensität der Färbung weist, wie bei den Rhizoiden, p_H-Abhängigkeit auf. Somit ist im Verhalten bei Vitalfärbung eine gewisse Parallelität zwischen Rhizoiden und Schleimpapillen gegeben. An den Einbuchtungen der Thallusspitze finden sich die Papillen in großer Zahl und man kann hier auch den ausgeschiedenen Schleim feststellen, der sich ebenfalls leicht anfärbt. Im stark sauren Bereich (p_H 2,04) sind die Schleimpapillen nur sehr blaß gefärbt, bei steigendem p_H nimmt die Färbung zu. Ab p_H 7,45 ist auch Inhaltsfärbung festzustellen (Abb. 1 d).

Bei Färbung mit Rhodamin B war das Ergebnis wie bei Brillantcresylblau. Die gefärbten Rhizoiden und Schleimpapillen ließen sich weder durch 24 stündiges Auswaschen in destilliertem Wasser noch durch $CaCl_2$-Lösung völlig entfärben. Bei Verwendung von 1 mol Traubenzucker sind nur die farblosen Zellen und solche mit diffus gefärbtem Zellsaft normal plasmolysierbar, während Zellen mit gefärbten Ölkörpern und hellroten Zellwänden keine Plasmolyse zeigen.

Um zu überprüfen, ob vielleicht eine stärkere Konzentration des Farbstoffes alle Zellmembranen färbt, verwendete ich Rhodamin B 1 : 500 und 1 : 333. Ich schnitt den Thallus in schmale Streifen und auch in diesen beiden Fällen färbten sich nur die Zellmembranen an den Rändern 3—4 Zellreihen weit, bzw. drang der Farbstoff im Bereich der Mittelrippe weiter vor.

Neben Brillantcresylblau und Rhodamin B verwendete ich auch Neutralviolett, Neutralrot, Thionin und Toluidinblau für die Färbungsversuche an *Pellia Neesiana* und konnte wiederholt dem Verhalten nach verschiedene Arten von Zellen unterscheiden: 1. Die Zellwände und der Zellinhalt sind völlig farblos und 1 mol TBZ bewirkt normale Plasmolyse. Dieses Verhalten zeigt ein Großteil der Zellen im jüngeren Thallusteil. — 2. An den Rändern des Thallus und entlang der Mittelrippe, besonders zahlreich aber im älteren Thallus liegen Zellen, deren Membranen gefärbt sind. Im Zellsaft befindet sich mehr oder weniger starker Farbniederschlag in Brown'scher Molekularbewegung. Die Ölkörper sind farblos und die Chloroplasten grün. Die Zellen lassen sich plasmolysieren. War die BMB nicht mehr erkennbar, so fehlte auch die Plasmolysierbarkeit. — 3. Unter den bei 2. erwähnten Zellen finden sich auch solche, deren Ölkörper gefärbt sind. — 4. Ferner konnte ich auch Zellen feststellen, deren Zellwände farblos waren und nur die Ölkörper eine deutlich erkennbare Färbung zeigten. Diese Zellen waren nur zum Teil plasmolysierbar. — 5. Im älteren Thallusteil waren die Zellen zum Großteil abgestorben und zeigten die bekannte intensive Membranfärbung toter Zellen sowie gefärbte Chloroplasten, Ölkörper und Zellsaft, soweit diese überhaupt noch vorhanden waren. Plasmolyse trat nicht ein.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Die Farblosigkeit, bzw. die Färbbarkeit der Ölkörper dürfte erkennen lassen, ob die Zelle noch vollkommen gesund ist oder bereits Schädigungen irgendwelcher Art aufweist. Somit sind gefärbte Ölkörper auch in noch plasmolysierbaren Zellen ein Hinweis, daß die Zelle nicht mehr ganz in Ordnung ist. Dabei zeigen sich verschiedene Übergänge von leichter Schädigung bis zur vollkommen nekriden Zelle.

Eine einmalige Beobachtung konnte ich bei einer Färbung mit Neutralrot p_H 4,8 machen. In den Zellen des älteren Thallusteiles lagen zahlreiche blauviolette Farbkörner, aber nicht wie üblich regellos verstreut, sondern wohlgeordnet kranzförmig um die einzelnen Chloroplasten (Abb. 1 e).

Ein interessantes Verhalten bei Vitalfärbung weist auch das Lebermoos *Diplophyllum albicans* auf. Die Blättchen dieses Mooses sind durch einen scharf begrenzten rippenartigen Längsstreifen in der Mitte gekennzeichnet, der 5—8 Zellen breit ist. Diese Zellen sind langgestreckt (60—70 μ) und besitzen gelbbraune Längswandverdickungen. Durch ihre Gestalt und Farbe unterscheiden sie sich von den übrigen Blattzellen, die klein und quadratisch sind. Es handelt sich hierbei um keine Blattrippe, wie sie zahlreichen Laubmoosen zukommt, bei Lebermoosen aber durchwegs fehlt, sondern nur um anders gestaltete Zellen. Bei Vitalfärbung zeigt dieser einschichtige Mittelstreifen ein von den übrigen Zellen abweichendes Verhalten (Abb. 1 f). Ein ähnliches Mittelrippenphänomen wurde von STRUGGER an *Elodea* entdeckt, und MENDER 1938 konnte auch an einem Laubmoos (*Bryum capillare*) ein besonderes Verhalten der Rippenzellen feststellen. Die Rhizoiden färben sich wie bei den anderen Moosen schnell und intensiv. Die Zellwände sind besonders an den Blatträndern stark gefärbt und lassen eine helle Mittellamelle und dunkle Verdickungsschichten unterscheiden. Nur die langgestreckten Mittelzellen sind in den jüngsten Blättern farblos, bzw. an den Rändern nur sehr blaß färbbar, so daß die Blättchen von einem hellen Streifen durchzogen werden. In den älteren Blättchen ist dieser Streifen gleich stark wie die übrige Blattfläche oder etwas dunkler gefärbt. Wird nun 0,33 mol $CaCl_2$ durchgesaugt, so tritt sofort starke Aufhellung der Rhizoiden und Zellwände auf. Nur die Zellwände des Mittelstreifens behalten ihre Farbe, so daß die Blätter nun einheitlich von einem dunklen Mittelstreifen durchzogen werden.

Dieses färberische Verhalten ergab sich sowohl bei Brillantcresylblau als auch bei Toluidinblau und Methylenblau. Ich verwendete dann auch Rhodamin B und erhielt nach 15 Minuten langem Auswaschen in mehrmals gewechseltem dest. Wasser folgendes Vitalfärbungsbild. Die Rhizoiden sind farblos, die Zellwände der Blättchen nur sehr blaß gefärbt. Die Membranen zeigen auch in diesem Fall abweichendes Ver-

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

halten, indem sie sich rotviolett färben und dadurch einen gefärbten Mittelstreifen bilden. Dieses Bild entspricht dem bei den anderen Farbstoffen nach Entfärbung mit $CaCl_2$ erhaltenen.

Zusammenfassung

Die chemische Untersuchung der Lebermoose zeigt, daß die Zellwand grundsätzlich den gleichen Aufbau wie die Membran höherer Pflanzen aufweist. Der von mir durchgeführte Zellulosenachweis mit Chlorzinkjod ergab, daß die Verdickungsschichten, sowie die Membran der Rhizoiden Violettfärbung zeigen, während die Mittellamelle farblos bleibt. Behandlung mit Kupferoxydammoniak bewirkt starke Quellung der Zellwände.

Die Vitalfärbung mit basischen Farbstoffen läßt bei mehreren Objekten (*Calypogeia*-Arten, *Lepidozia reptans, Lophozia barbata, Plagiochila asplenioides, Scapania nemorosa* u. a.) sehr deutlich eine Differenzierung der Membran in stets dunkel gefärbte Sekundärlamellen und eine dazwischen liegende Mittellamelle feststellen. Die Intensität der Anfärbung erweist sich p_H-abhängig, im stark sauren und stark alkalischen Bereich ist sie gering, zwischen p_H 4,8 und 7,1 gleichbleibend stark. Dabei mag Speicherkonkurrenz zwischen Zellmembran und Zellsaft wirksam sein, andererseits im Falle elektroadsorptiver Wandspeicherung die Annäherung an den „Entladungspunkt" zum Ausdruck kommen. Beim Durchsaugen von 0,33 mol $CaCl_2$ entfärben sich die Verdickungsschichten, während die Mittellamelle ihre Farbe behält und nur als dunkler schmaler Streifen zwischen den Sekundärlamellen liegt.

Die Rhizoiden färben sich sofort bei Kontakt mit der Farblösung. Im stark sauren Bereich sind sie nur hell gefärbt, der Übergang zur starken Färbung liegt fallweise verschieden, doch im Bereich zwischen p_H 2,56 und 4,37. Mit $CaCl_2$ sind die Rhizoiden nur teilweise entfärbbar. Der Großteil des Farbstoffes ist wohl nur locker elektroadsorptiv gebunden, daneben findet sich aber z. T. auch festere Bindung.

Pellia Neesiana zeigt elektive Färbbarkeit der Rhizoidmembranen und der Schleimpapillen, während sich die Zellwände des Thallus nur am Rande oder bei beschädigten Zellen färben. Gefärbte Ölkörper sind hier das Zeichen für beginnende Schädigung der Zelle. Die Wände der Zellen des Blattmittelnervs von *Diplophyllum albicans* färben sich besonders in jüngeren Blättchen nicht so stark wie die der übrigen, halten aber ihren Farbstoff beim Auswaschen mit $CaCl_2$ fest.

Literatur

(Hier nicht angeführte Schriften siehe bei PORZER 1952: 213—214)

BECKER W. A. 1936. Vitale Cytoplasma und Kernfärbungen (Sammelreferat). Protoplasma 26: 439.

©Verlag Ferdinand Berger & Söhne Ges.m.b.H., Horn, Austria, download unter www.biologiezentrum.at

Borris H. 1937 a. Beiträge zur Kenntnis der Wirkung von Elektrolyten auf die Färbung pflanzl. Zellmembranen. Protoplasma 28: 23.

— 1937 b. Die Abhängigkeit der Aufnahme und Speicherung basischer Farbstoffe durch Pflanzenzellen von inneren und äußeren Faktoren. Ber. dtsch. bot. Ges. 55: 584.

Brauner L. 1933. Zur Frage der postmortalen Farbstoffaufnahme von Pflanzenwänden. Flora 127: 190.

Czaja A. Th. 1936. Untersuchungen über den Membraneffekt des Absorptionsgewebes und über die Farbstoffaufnahme in die lebende Zelle. Planta 26 : 90.

Czapek Fr. 1899. Zur Chemie der Zellmembranen bei den Laub- und Lebermoosen. Flora 86: 361.

— 1913. Biochemie der Pflanzen.

Douin W. 1922. Le Sporophyt des Marchantieés. Rev. gén. Bot. 34: 321.

Drawert H. 1937 a. Das Verhalten einzelner Zellbestandteile fixierter pflanzlicher Gewebe gegen saure und basische Farbstoffe bei versch. Wasserstoffionenkonzentration. Flora 132: 91.

— 1937 b. Der Einfluß organischer Salze auf die Aufnahme und Abgabe von Farbstoffen durch die pflanzliche Zelle. Ber. dtsch. bot. Ges. 55: 380.

Gjokic 1895. Über die Beschaffenheit der Zellhäute bei den Moosen. Österr. bot. Z. 45: 330.

Kamerling 1897. Zur Biologie und Physiologie der Marchantiaceen. Flora 84: 1.

Kersting F. 1937. Über die Adsorption von Farbstoffen an Zellwänden und ihre Verdrängung durch die anorg. Salze. Ber. dtsch. bot. Ges. 55: 329.

Kinzel H. 1951. Beiträge zur Chemie und Physikochemie der Gallertbildungen von Süßwasseralgen. Dissertation, Wien.

— 1953. Desgl. Österr. bot. Z. 100: 25.

Lohmann 1903. Beiträge zur Chemie und Biologie der Lebermoose. Beih. bot. Zbl. 15: 215.

Mender G. 1938. Anatomie des Laubmooses *Bryum capillare*. Protoplasma 30: 373.

Müller K. 1905. Die chem. Zusammensetzung der Zellmembranen bei versch. Kryptogamen. Z. physiolog. Chemie 45: 265.

Porzer W. 1952. Vitalfärbungsstudien an Lebermoosen I. Phyton 4: 203.

Ruge G. 1893. Beiträge zur Kenntnis der Vegetationsorgane der Lebermoose. Flora 77: 279.

Stahl E. 1888. Pflanzen und Schnecken, eine biol. Studie über die Schutzmittel der Pflanzen gegen Schneckenfraß. Jena.

Stiegler A. 1950. Vitalfärbungen an Pflanzenzellen mit Cresylechtviolett. Protoplasma 39: 493.

Zwickel W. 1932. Studien über die Zellen der Lebermoose. Beih. bot. Zbl. I/49: 569.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn

Jahr/Year: 1953

Band/Volume: 4_4

Autor(en)/Author(s): Porzer Walter

Artikel/Article: Vitalfärbungsstudien an Lebermoosen. II. 263-274