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

Vitalfärbungsstudien an Lebermoosen I

Von

Walter PORZER

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien)

Mit 1 Tafel

Eingelangt am 30. November 1951

Seit ihrer ersten Anwendung durch PFEFFER 1886 hat sich die Vitalfärbung in der experimentellen Zellphysiologie und Protoplasmatik immer mehr als unentbehrliches Hilfsmittel erwiesen. Heute gehört diese Methode neben Plasmolyse, Zentrifugieren und Mikrochirurgie zu den wichtigsten Arbeitsbehelfen jedes Zellphysiologen. Ermöglicht doch gerade die Vitalfärbung in anschaulichster Weise den Eintritt und die Speicherung von Farbstoffen in lebenden Zellen zu studieren. Bezüglich der umfangreichen Literatur sei auf die neueren Darstellungen bei BROOKS-MOLDENHAUER 1941, GUILLIERMOND 1941, DANGEARD 1947, STRUGGER 1949 und die Arbeiten von DRAWERT 1940, 1941, 1948, und HÖFLER 1947, 1951 verwiesen.

Das Wesen der Vitalfärbung liegt kurz in folgendem: Ein pflanzliches Objekt wird in eine Farbstofflösung geeigneter Konzentration eingelegt. Soll es nun zu einer vitalen Färbung des lebenden Protoplasten kommen, so muß der Farbstoff durch die Zellmembran, die dabei selbst auch gefärbt werden kann, und die äußere Plasmagrenzschicht in das Zytoplasma und weiter durch den Tonoplasten in den Zellsaft eintreten können. Voraussetzung für eine vitale Färbung ist also die Intrabilität, bzw. Permeabilität der lebenden Zelle für den betreffenden Farbstoff, Der Eintritt des Farbstoffes in das Zellinnere allein würde aber auch nach erreichtem Konzentrationsausgleich noch keine sichtbare Anfärbung bewirken. In den mikroskopisch dünnen Schichten der Präparate erscheint auch eine stärker konzentrierte Farblösung farblos. Wenn man mit basischen Farbstoffen arbeitet, werden aber stets stark verdünnte Lösungen 1 : 5000 oder 1 : 10.000 verwendet. Der Farbstoff muß daher nach der Permeation auch noch gespeichert werden, um eine mikroskopisch sichtbare Vitalfärbung zu bewirken.

Zahlreiche Objekte sind für Vitalfärbungsstudien schon verwendet worden, ein besonders reizvolles und dankbares Untersuchungsmaterial aber, die Lebermoose, hat noch sehr selten Beachtung gefunden. Nur wenige Autoren haben mit vielen Objekten vergleichend gearbeitet und dabei auch Lebermoose verwendet. CZAJA 1935 beschreibt das Verhalten

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

von *Pellia Neesiana* und *Marchantia* bei Vitalfärbung mit Toluidinblau. KRESSIN 1935 und STRUGGER 1949 untersuchten die Färbungsverhältnisse bei *Lophocolea bidentata*. Auf Anregung von Professor K. HÖFLER habe ich diese Pflanzengruppe für meine Vitalfärbungsstudien als Objekt gewählt. Mit vorliegender Arbeit wird eine seit Jahren gepflegte Tradition des Pflanzenphysiologischen Institutes der Universität Wien aufrecht erhalten. Die einzellschichtigen Teile vieler Lebermoose dienten HÖFLER 1943 a, 1943 b, 1946 a, 1950 als besonders geeignetes Material zur Untersuchung der Austrocknungsfähigkeit des Protoplasmas, wie auch für vitale Fluoreszenzfärbungen (HÖFLER 1947). In eingehender Weise untersuchte PECKSIEDER 1948 die Permeabilität der Lebermoose, während eine umfangreiche Arbeit von WILL-RICHTER 1949 über die osmotischen Werte berichtet. In einer unveröffentlichten Dissertationsarbeit verwendete KRAUSS 1946 die Lebermoose für eine Vitalfärbungsstudie mit Neutralrot und einigen Fluoreszenzfarbstoffen (Akridinorange, Pyronin, Rhodamin B).

In all diesen Arbeiten kommt zum Ausdruck, daß die Lebermoose ein dankbares zellphysiologisches Objekt liefern. Im Gegensatz zu den Laubmoosen besitzen sie im allgemeinen keine den Durchtritt des Farbstoffes hindernde Kutikula (HUBER-HÖFLER 1930). Besonders gut eignen sich die foliosen Arten mit ihren aus einer einzigen Zellschicht bestehenden „Blättchen" zur Untersuchung, so daß sich Eingriffe chirurgischer Art, wie die Herstellung von Schnitten, erübrigen. Dadurch bleibt der natürliche Zustand der lebenden Zelle weitgehend unberührt. Infolge leichter Kultivierbarkeit stehen die Lebermoose jederzeit zur Verfügung und das Arbeiten mit ihnen ist jahreszeitlich nicht gebunden.

1. Methodik und Material

Zur Färbung verwendete ich ausschließlich basische Farbstoffe, die zum Großteil die Eigenschaft besitzen, sehr leicht, fast widerstandslos, durch das lebende Plasma zu permeieren, soweit sie in molekularer Form vorliegen. Nachstehende Übersicht bringt die von mir verwendeten Farbstoffe nach Verwandtschaften geordnet.

I. Azofarbstoffe:	Janusgrün.
II. Carboniumfarbstoffe:	Brillantgrün, Gentianaviolett, Pyronin, Rhodamin B.
III. Azinfarbstoffe:	Neutralrot, Neutralviolett, Safranin.
IV. Oxazinfarbstoffe:	Brillantcresylblau, Cresylechtviolett, Nilblau, Prune pure.
V. Thiazinfarbstoffe:	Thionin pur., Toluidinblau.

Die angeführten Farbstoffe zeigen (mit Ausnahme von Rhodamin B und Prune pure) die Eigenschaft, daß sie in saurer Lösung ganz oder zum Großteil ionisiert, d. h. zu elektrisch geladenen Ionen dissoziiert sind, in neutraler und alkalischer Lösung aber in Form undissoziierter Moleküle vorhanden sind

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

(vgl. RUHLAND 1908, IRWIN 1922, STRUGGER 1936, 1940, DRAWERT 1939, HÖFLER 1947, 1948, 1949, HÖFLER-PECKSIEDER 1947, WIESNER 1951).

Die Färbemethode führte ich in der bisher üblichen Art durch. Von den einzelnen Farbstoffen wurde eine Stammlösung 1 : 1000 in destilliertem Wasser hergestellt. Diese wurde dann auf die jeweils gewünschte Konzentration (im allgemeinen 1 : 10.000) verdünnt. Reihenversuche mit abgestufter Wasserstoffionenkonzentration führte ich mit Phosphatpufferung durch, dabei konnte ich auf die Verwendung sekundärer Phosphate verzichten, da fein abgestufte Reihen im Neutralbereich nicht zur Anwendung kamen.

p_H	n/10 HCl	KH_2PO_4	Na_3PO_4
2,04	9,5	0,5	—
2,24	6,5	3,5	—
2,56	3,5	6,5	—
3,1	1,0	9,0	—
3,46	0,5	9,5	—
3,66	0,35	9,65	—
3,95	0,2	9,8	—
4,8	—	10,0	—
6,0	—	9,5	0,5
6,35	—	9,0	1,0
7,1	—	7,0	3,0
7,45	—	6,0	4,0
10,1	—	4,0	6,0

Die Phosphotstammlösungen waren $^1/_{15}$ molar und gewichtsnormal hergestellt. Die farblose Pufferlösung bestand aus 1 Teil Puffergemisch + 9 Teile destill. Wasser und die gefärbte aus 1 Teil Farblösung 1 : 1000 + 1 Teil Puffergemisch + 8 Teile destill. Wasser. Für die Herstellung der Neutralrotlösung verwendete ich auch Wiener Wasserleitungswasser (p_H um 7,8). Das zu färbende Moosstämmchen wurde in die Farblösung eingelegt und nach zehn Minuten Färbedauer in destill. Wasser, bzw. in farblosem Puffergemisch ausgewaschen und dann mikroskopisch untersucht. Rhodamin B ist nach DRAWERT 1939 in weitem p_H-Bereich (p_H 2-11,5) undissoziiert, liegt also nur in Form elektrisch neutraler Moleküle vor. STRUGGER 1937, 1938 b stellte fest, daß Rhodamin B der ungiftigste Vitalfarbstoff ist, den die Zellphysiologie bis jetzt besitzt. Diesen Farbstoff habe ich in einer Lösung 1 : 1000 in destilliertem Wasser ohne Pufferung verwendet. Färben sich die Zellwände damit an, so handelt es sich um „chemische Niederschlagsfärbung" (DRAWERT), die mit $CaCl_2$ nicht auswaschbar ist (HÖFLER 1949, HÖFLER-STIEGLER 1947, HÖFLER-SCHINDLER 1951). Sofort nach Entnahme des Objektes aus dem Farbbad zeigt sich allgemein intensive rotlila Färbung, die aber zum Großteil nach gründlichem Auswaschen verschwindet. Elektroadsorptive Färbung kann nicht auftreten, da ja im Farbbad adsorbierbare Ionen fehlen. Auf Grund dieser Eigenschaften verwendete HÖFLER 1949 Farbstoffpaare, bestehend aus einem dissoziierten basischen

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

Farbstoff und Rhodamin B, um chemische Färbung als solche zu erfassen. WALDHEIM 1949 erzielte mit Rhodamin B interessante Differentialfärbungen von Gerbstoffidioblasten an *Carex*-Arten.

Das verwendete Material stammte größtenteils aus dem Wiener Wald bei Rekawinkel an der Westbahn (Niederösterreich), wo ich jederzeit frische Lebermoose sammeln konnte. Weitere Moose brachte ich von Exkursionen im Dachsteingebiet und von den Krimmler Wasserfällen mit. Auch wurde mir in liebenswürdiger Weise von Professor HÖFLER Material, das er 1948 in Golling (vgl. HERZOG und HÖFLER 1944) und 1949 in Gargellen im Montafon (Urgestein) gesammelt hatte, zur Verfügung gestellt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen erfolgten zum Großteil an mehr oder weniger lang kultivierten Moosen. Die Kultur erfolgte in üblicher Weise zum Schutz gegen Austrocknung in gut schließenden Glasdosen, die zwischen den Nordfenstern, bzw. im Kalthaus des Pflanzenphysiologischen Institutes aufgestellt waren. WILL-RICHTER hat bei ihren osmotischen Messungen zwischen frischem und kultiviertem Material genau unterschieden. Diese Unterscheidung schien in meinem Fall nicht nötig, da ich bei Färbungen an frischen und kultivierten Moosen keine auffallenden Unterschiede feststellen konnte. Andere Unterschiede treten wohl auf, wie Bleichwerden und das bekannte Auswachsen der Triebe bei Kultur in feuchtem Raum, wobei die Blättchen klein bleiben. Die zungenförmig gestalteten langen Zuwüchse des thallösen Mooses *Pellia Neesiana* eignen sich besonders gut zur mikroskopischen Untersuchung, während der stark gelappte Thallus ansonst nicht sehr günstig ist. Ich habe in den Hauptversuchsreihen nachfolgende Moose verwendet. Zur Bestimmung der Moose diente mir das Werk von MÜLLER 1912, 1939 und MACVICARS Handbook 1912.

Aneura palmata (HEDW.) DUM.
Aplozia riparia (TAYL.) DUM.
Aplozia sphaerocarpa (HOOK.) DUM.
Bazzania trilobata (LINDB.)
Blepharostoma trichophyllum (L.) DUM.
Calypogeia fissa (L.) RADDI.
Calypogeia Neesiana (MASS. et CAREST.)
Calypogeia trichomanis (L.) CORDA.
Cephalozia bicuspidata (L.) DUM.
Chiloscyphus pallescens (EHRH.) DUM.
Diplophyllum albicans (L.) DUM.
Lepidozia reptans (L.) DUM.
Lophozia barbata (SCHMID.) DUM.
Lophozia Mülleri (NEES.) DUM.
Marchantia polymorpha (L.).
Metzgeria conjugata (LINDB.)
Pellia epiphylla (L.) LINDB.
Pellia Neesiana (GOTTSCHE) LIMPR.
Plagiochila asplenioides (L.) DUM.
Radula complanata (L.) DUM.
Scapania nemorosa (DUM.).

Als besonders geeignete Objekte erwiesen sich die *Calypogeia*-Arten und *Scapania nemorosa*, auf die sich die meisten Versuche beziehen. Wenn sich an anderen keine abweichenden Ergebnisse feststellen ließen, werden sie nicht gesondert erwähnt.

2. Färbung der Lebermoose im Übersichtsbild

Betrachtet man Moosstämmchen, die mit den üblichen Farbstoffen (vgl. S. 204) der Konzentration 1 : 10.000 in destilliertem Wasser gefärbt wurden, bei schwacher Vergrößerung unter dem Mikroskop, so zeigt sich

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

ein im allgemeinen immer wiederkehrendes Bild. Tingiert erscheinen nur die Zellwände, Zellinhaltsfärbungen treten bei den in destilliertem Wasser hergestellten Farbbädern von schwach saurer Reaktion im allgemeinen nur in nekrotischen Zellen auf.

Bei Vitalfärbung an *Lophocolea bidentata* haben KRESSIN 1935 und STRUGGER 1949 einen auffallenden Unterschied zwischen den jungen noch wachsenden Spitzenblättern und den älteren Blättern festgestellt. Abb. 1 a veranschaulicht ein Stämmchen von *Calypogeia fissa* (aus Rekawinkel), gefärbt mit Brillantcresylblau 1 : 10.000. im Übersichtsbild.

A. Oberblättchen. Die noch zur Knospe gefalteten Blättchen sind meist völlig farblos oder nur ganz schwach gefärbt. Das erste Paar, der bereits ausgebreiteten, zeigt schwache und vorwiegend an den Rändern auftretende Färbung der Zellwände. Bei den folgenden Blättchen nimmt die Intensität der Anfärbung rasch zu, wobei der Unterschied zwischen den stärker gefärbten Zellwänden der Blattrandzellen und den etwas schwächer tingierten übrigen Zellen deutlich in Erscheinung tritt. Die älteren Blättchen sind dagegen in ihrer ganzen Fläche kräftig tingiert. Wo die Blättchen am Stämmchen aufsitzen, sind die Zellwände farblos oder nur schwach gefärbt. Neben dem durch verschiedene Entwicklungsstadien der Blättchen bedingten Altersgradienten läßt sich noch ein Gradient innerhalb jedes einzelnen Blättchens feststellen. Der Altersgradient selbst ist den von STRUGGER 1949 und seinen Mitarbeitern behandelten Gradienten bei Färbung von *Helodea*blättern ähnlich. Dort ist der junge an der Blattbasis gelegene Zuwachs schwerer oder nicht färbbar. Von der durch natürliche Gradienten bedingten Farblosigkeit gewisser Blatteile genau unterscheidbar ist die oft durch Luftblasen verursachte, die an ihrer kreisrunden Gestalt sofort erkennbar ist.

Über die Blättchen verstreut liegen bei *Calypogeia fissa, Lophozia Mülleri* u. a. oft einzeln oder in Gruppen beisammen nekride Zellen, die sich durch intensiv gefärbte Zellmembran und gefärbten Zellinhalt von den übrigen scharf abheben. Die Färbung dieser Zellwände klingt nach den umgebenden lebenden Zellen rasch keilförmig aus. Dabei lassen sich die verschiedensten Übergangsstadien des Färbebildes der lebenden Zellen zu dem der toten feststellen. An Hand von Plasmolyse und am Erhaltungszustand der Ölkörper sowie der Chloroplasten erkennt man leicht, ob die Zelle noch intakt oder schon nekrotisch ist. Ich fand dabei verschiedentlich die Nekrose-Stadien, wie sie von HÖFLER (1948: 591) bei Färbung mit Akridinorange beschrieben und abgebildet werden. Sehr häufig konnte ich Schrumpf-, Kranz- und Saumnekrosen feststellen. Der Inhalt nekrotischer Zellen ist stets in seiner Gesamtheit gefärbt. Vielfach sind die abgestorbenen Zellen der ältesten Blättchen vollkommen inhaltsleer. Ich konnte auch feststellen, daß sehr oft die

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

Spitzenzellen der Blättchen, wie z. B. bei *Calypogeia trichomanis* pathologische Inhaltsfärbungen aufwiesen und nicht plasmolysierbar waren, gleiches hat auch schon KRAUSS festgestellt.

B. Unterblättchen. Die an der Bauchseite der Stämmchen befindliche dritte Blattreihe, die Unterblättchen (Amphigastrien) sind bei manchen Moosen sehr deutlich ausgebildet und zeigen bei Färbung ein auffallendes Bild. Bis knapp unter die Stämmchenspitze zeichnen sich die Zellwände durch intensive Färbung aus, so daß sich die Unterblättchen vom meist farblosen Stämmchen mit scharfer Grenze abheben (Abb. 1 b).

STRUGGER 1949: 137 gibt ebenfalls für *Lophocolea bidentata* an, daß die Amphigastrien bezüglich der Farbstoffverteilung am ganzen Pflänzchen am stärksten gefärbt sind. Es scheint tatsächlich, daß die Unterblättchen ähnlich den Rhizoiden befähigt sind, den Farbstoff rasch aus der umgebenden Lösung aufzunehmen. STRUGGER schließt daran die Vermutung, daß diese Beobachtung für das Verständnis der physiologischen Funktion dieser Organe von Bedeutung sei.

C. Stämmchen. Das Stämmchen bleibt mit einigen Ausnahmen farblos und nur vereinzelt tritt fleckenweise Färbung der Zellwände auf. Vielleicht liegen hier leichte Verletzungen vor, wodurch das Eindringen des Farbstoffes durch die Kutikula rasch ermöglicht wird. Bei Färbung mit Brillantcresylblau zeigten *Cephalozia bicuspidata, Chiloscyphus pallescens, Scapania nemorosa* und *Radula complanata* am ganzen Stämmchen Membranfärbung, ebenso *Lepidozia reptans* und *Lophozia Mülleri* mit Neutralrot, Pyronin und Toluidinblau. An der Abrißstelle ist das Stämmchen stets mehrere Zellreihen weit stark tingiert. Ein interessantes Verhalten konnte ich auch bei *Aplozia sphaerocarpa* mit Rhodamin B (vgl. S. 205) feststellen. Nach halbstündigem Auswaschen in destill. Wasser hatten die Zellwände der Blättchen ihre ursprüngliche starke Anfärbung verloren und waren blaßrosa, während die Stämmchenmembranen ihre intensive Färbung behielten.

D. Rhizoiden. Die Rhizoiden zeichnen sich durch rasche und meist starke Färbbarkeit aus. An einzelnen Objekten *(Aneura palmata, Blepharostoma trichophyllum, Calypogeia fissa* und *trichomanis, Cephalozia bicuspidata, Lophozia Mülleri* und *Pellia Neesiana)* konnte ich folgende Beobachtungen machen. Am Stämmchen, dort wo die Unterblättchen ansetzen, befinden sich abwechselnd rhizoidentragende und rhizoidenfreie Zellen. Die Initialzellen der Rhizoiden sind nun bei Färbung, z. B. mit Brillantcresylblau in ihrer ganzen Fläche blau und zeigen starke Membranfärbung, während die umgebenden Stämmchenzellen ungefärbt bleiben. Dadurch wird ein schachbrettartiges Bild hervorgerufen (Abb. 1 c). *Pellia Neesiana*, die ich mit Neutralviolett gefärbt hatte, behandelte ich 24 Stunden mit 0,3 mol $CaCl_2$; selbst bei so

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

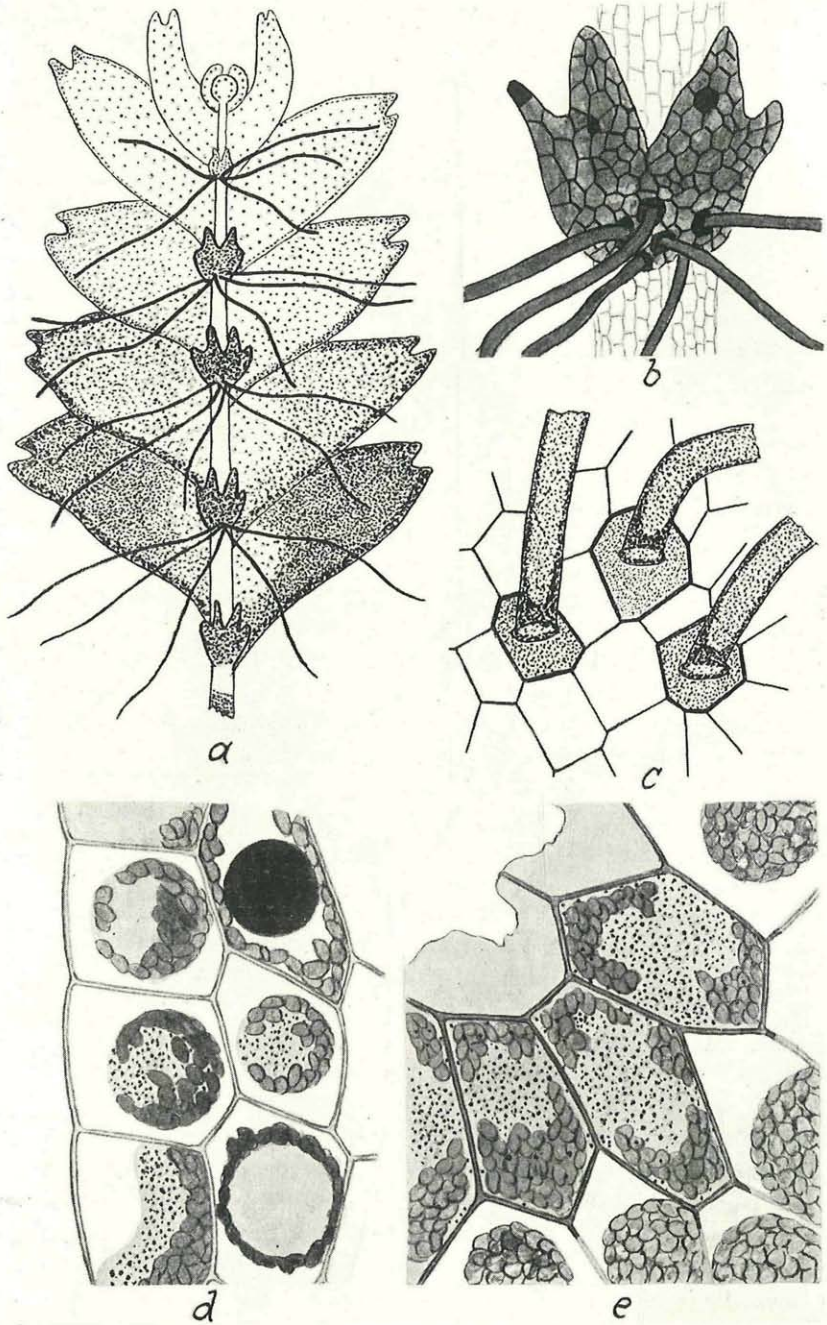


Abb. 1. *Calypogeia fissa*. — a: Übersichtbild eines mit Brillantcresylblau 1 : 10.000 gefärbten Stämmchens. — b: Unterblatt. — c: Initialzellen der Rhizoiden. — d: Brillantcresylblau p_H 10,1, verschiedene Arten beobachteter Zellfärbungen. — e: Stichverletzung, Gentianaviolett p_H 3,1. Die am Wundrand gelegenen Zellen zeigen Tröpfchenniederschlag, schwach diffuse Zellsaftfärbung und stark tingierte Zellwände.

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

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

lang dauernder Behandlung wurde die Membran der Initialzellen nicht entfärbt. Gleiches konnte ich auch bei *Blepharostoma tr.* feststellen, welches ich mit Toluidinblau und Rhodamin B gefärbt hatte.

3. Färbung des Zellinhaltes in seiner Abhängigkeit vom der Wasserstoffionenkonzentration

Wie bereits bekannt, kommt in Reihenversuchen mit basischem Farbstoffen die Färbung des Zellinhaltes vielfach nur zustande, wenn der p_H-Wert des Farbbades eine gewisse Schwelle überschreitet. Der Umschlagsbereich liegt von Farbe zu Farbe verschieden, z. B. für Brillantcresylblau und Neutralrot um p_H 7, für Toluidinblau aber um p_H 9—10. Zumal DRAWERT 1940 hat solche Schwellen für zahlreiche basische Hellfeldfarbstoffe ermittelt.

Soll ein Farbstoff in das Innere einer Zelle gelangen, muß er zuerst durch die Zellwand permeieren. Zwischen dieser und dem Zellinneren besteht aber unter gewissen Bedingungen Speicherkonkurrenz, d. h. die bei neutraler oder schwach saurer Lösung negativ geladenen Zellulosemembranen (HÖFLER 1946 b, 1949) haben das Bestreben, aus dem Farbbad die positiv geladenen Farbkationen elektroadsorptiv zu binden, während der Zellinhalt dagegen die Farbbasen- und Farbsalzmoleküle speichern will. Da die basischen Farbstoffe bei saurer Reaktion zum Großteil ionisiert, im alkalischen Bereich aber in Form undissoziierter Moleküle vorhanden sind und nur undissoziierte Moleküle, nicht aber Ionen das lebende Protoplasma durchdringen können (vgl. zuletzt PECKSIEDER 1950, HÖFLER u. SCHINDLER 1951), werden im sauren Bereich die Farbstoffe elektroadsorptiv an die Zellmembran gelagert, wogegen im alkalischen das Zellinnere, insbesonders die Vakuole gefärbt wird. Ob sich nun bei Vitalfärbungen mit p_H-Reihen die Membran oder der Zellinhalt färbt, ist einerseits von den Dissoziationsverhältnissen des Farbstoffes und andererseits von der Qualität und Quantität des Zellinhaltes an farbspeichernden Stoffen abhängig.

Diese bekannten Tatsachen konnte ich bei den Lebermoosen bestätigt finden. Ich arbeitete mit p_H-gestuften, phosphatgepufferten Farbreihen. Bei Inhaltsfärbung ist zwischen Vakuole, Chloroplasten und Ölkörper zu unterscheiden. Gefärbte Chloroplasten konnte ich in gesunden Zellen nie, gefärbte Ölkörper nur in Ausnahmefällen feststellen.

Zumal der Oxazinfarbstoff Brillantcresylblau hat sich mir für Inhaltsfärbungen gut bewährt, da die Diffusfärbung der Vakuole, bzw. auftretender Tröpfchenniederschlag sehr deutlich in Erscheinung tritt. Ich arbeitete mit *Aplozia riparia, Calypogeia fissa, Calypogeia trichomanis, Cephalozia bicuspidata, Lophozia barbata, Metzgeria conjugata, Plagiochila asplenioides, Scapania nemorosa.* Die Färbegrenze lag überall gleich zwischen p_H 6, 35 und p_H 7,1. Bei p_H 6, 35 fehlte noch

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

in allen Fällen die Zellsaftfärbung, während diese bei p_H 7,1 bereits eingetreten war.

Das Ergebnis für alle von mir verwendeten Farbstoffe ist in folgender Tabelle für das Moos *Calypogeia fissa* zusammengefaßt. Färbezeit war einheitlich 10 Minuten, dann wurde im gleichnamigen farblosen Puffer ausgewaschen und untersucht. Die angegebenen Werte, bei denen Inhaltsfärbungen festzustellen waren, beziehen sich nur auf gesunde Zellen. Bei nekrotischen, wo für die Farbionen kein Diffusionshindernis besteht, treten Tröpfchenniederschlag und Diffusfärbung naturgemäß bei weitaus niederem p_H auf. Diese Zellen lassen sich jedoch sofort an den bereits früher erwähnten Merkmalen von den gesunden unterscheiden.

	p_H	6,0	6,35	7,1	7,45	10,1
Brillantcresylblau	diff. Färbg.	—	—	+	+	+
	Tröpfchen	—	+	+	+	+
Cresylechtviolett	diff. Färbg.	—	—	—	—	+
	Tröpfchen	—	—	—	—	+
Gentianaviolett	diff. Färbg.	—	—	—	—	+
	Tröpfchen	—	—	+	+	+
Neutralrot	diff. Färbg.	—	—	+	+	+
	Tröpfchen	—	+	+	+	+
Neutralviolett	diff. Färbg.	—	—	+	+	+
	Tröpfchen	—	+	+	+	+
Prune pure	diff. Färbg.	—	—	—	—	—
	Tröpfchen	—	—	—	—	—
Pyronin	diff. Färbg.	—	—	—	—	—
	Tröpfchen	—	—	—	—	—
Thionin	diff. Färbg.	—	—	—	—	—
	Tröpfchen	—	—	—	—	—

Wie die Tabelle zeigt, liefern nicht alle verwendeten Farbstoffe Inhaltsfärbungen. Es ist auch hervorzuheben, daß die Färbeschwelle für Tröpfchen um 1—2 Stufen niederer liegt, als die für Diffusfärbung des Zellsaftes. Bezüglich des Auftretens der Farbtröpfchen konnte ich wiederholt die Feststellung machen, daß bei sofortiger Untersuchung nach kurzem Auswaschen noch keine Tröpfchen zu sehen waren, sondern diese erst allmählich nach 1—2 Minuten auftraten. Nach etwa 5 Minuten erfüllten sie in großer Menge das Zellinnere. In lebenden plasmolysierbaren Zellen zeigt der Farbniederschlag lebhafte Brown'sche Molekularbewegung und dadurch werden oft selbst die Ölkörperchen in Bewegung versetzt. In nekrotischen Zellen ist die B M B der Farbkörnchen geringer oder es läßt sich überhaupt keine mehr feststellen. Als Zwischenstadium

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

zwischen nekriden und normalen Zellen tritt häufig Tonoplastenplasmolyse auf. Die überdauernden Vakuolen liegen z. B. bei Färbung mit Brillantcresylblau als hell- bis dunkelblau gefärbte Kugeln inmitten der Zellen. Auftretender Tröpfchenniederschlag findet sich zunächst nur innerhalb des Tonoplasten, nach einiger Zeit lassen sich aber auch außerhalb desselben vereinzelt zwischen den Chloroplasten liegende Tröpfchen erkennen.

Im folgenden will ich kurz ein Färbebild (vgl. Abb. 1 d) von *Calypogeia fissa* mit Brillantcresylblau p_H 10,1 wiedergeben. Es ließen sich verschiedene Gruppen von Zellen unterscheiden. Der Großteil zeigte normale Plasmolyse. Dabei gab es nun Zellen, die nur diffuse Färbung aufwiesen, und solche, bei denen zahlreiche Tröpfchen in B M B zu beobachten waren. In den älteren Blättchen lagen in größeren Gruppen beisammen Zellen mit „Zerrplasmolyse" (SCHINDLER 1938), die sowohl diffus gefärbten Zellsaft, als auch Tröpfchenniederschlag hatten. Schließlich konnte ich noch bei Zellen mit Tonoplastenplasmolyse solche unterscheiden, bei denen in der Zellmitte der diffus gefärbte Tonoplast und die Chloroplasten an den Zellwänden gelagert waren, andere wieder hatten die Chloroplasten kranzförmig um den Tonoplasten herum angeordnet.

Vergleicht man die Farbe der Tröpfchen bei den einzelnen Farbstoffen, so zeigt sich, daß diese nicht nur bei den blauen (Brillantcresylblau, Methylenblau, Toluidinblau), sondern auch bei den roten, die die Zellwände rosa färben, wie Neutralrot, Neutralviolett und Rhodamin B, mit blauviolettem oder bläulichem Farbton gefärbt sind.

Folgender Versuch zeigt, daß die bei niederen p_H-Stufen auftretenden Inhaltsfärbungen durch irgendwelche Schädigung der Zelle bewirkt werden. Ich färbte *Calypogeia fissa* mit Gentianaviolett p_H 2,04 und 3,1, die Blättchen hatte ich durch Nadelstiche verletzt. Die um die Wundstelle gelegenen Zellen, die selbst keine sichtbare Verletzung erkennen ließen, waren bei p_H 2,04 in ihrer ganzen Fläche tief dunkelblau gefärbt und nicht plasmolysierbar. Bei p_H 3,1 (Abb. 1 e) enthielten diese Zellen zahlreichen blauen Tröpfchenniederschlag und schwach diffuse Zellsaftfärbung. Alle übrigen Zellen waren normal plasmolysierbar und zeigten nur Zellwandfärbung.

Im stärker alkalischen Milieu macht sich die Speicherkonkurrenz des Zellsaftes gegenüber der Membran bemerkbar, so daß die Zellwände nur sehr geringe Färbbarkeit aufweisen, bzw. farblos bleiben. Es zeigt sich aber, daß bei toten Zellen, in denen die Speicherkonkurrenz seitens der Vakuole ausgeschaltet ist, auch die Zellwände intensiv Farbstoff speichern.

Wie bereits erwähnt, ist Farbstoffaufnahme durch die Ölkörper nur in Ausnahmefällen festzustellen. KRAUSS 1946 ist es erstmalig ge-

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

lungen, elektive Färbung von Ölkörpern zu erzielen. Bei Färbung mit Neutralrot und Akridinorange erwiesen sich jene von *Alicularia scalaris* und *Aplozia riparia* färbbar. Bei *Aplozia riparia* konnte ich diese Beobachtung bestätigt finden und außerdem bei *Scapania nemorosa* sowohl mit Brillantcresylblau, als auch mit Neutralrot und Neutralviolett in den p_H Stufen 7,45 und 10,1 deutlich gefärbte Ölkörper erkennen. Auch *Chiloscyphus pallescens* zeigte ab p_H 7,45 mit den gleichen Farbstoffen Ölkörperfärbung. Bei *Pellia Neesiana* zeigt auftretende Ölkörperfärbung beginnende Schädigung der Zellen an. Bei allen übrigen von mir untersuchten Lebermoosen konnte ich eine Färbung der Ölkörper nicht erzielen.

Zusammenfassung

Mit basischen Farbstoffen gefärbte foliose Lebermoose lassen im Übersichtsbild deutlich eine Zunahme der Färbung von den meist völlig farblosen Blättchen der Knospe (z. B. *Chiloscyphus pallescens)* zu den älteren feststellen (Abb. 1 a). Neben diesem Altersgradienten tritt auch in jedem einzelnen Blättchen ein Gradient in Erscheinung, indem die Färbung vom Rand zur Mitte und Basis abnimmt. Werden Farbstoffe, in dest. Wasser gelöst, ohne Pufferung verwendet, so färben sich in gesunden Zellen nur die Membranen, in nekriden dagegen auch der Zellinhalt.

Die Zellwände der Amphigastrien und Rhizoiden zeichnen sich durch rasche und intensive Färbbarkeit aus (Abb. 1 b). Auffällig ist das Verhalten der Initialzellen der Rhizoiden, die bei den geprüften Moosen *(Blepharostoma trichophyllum, Calypogeia-Arten, Cephalozia bicuspidata* u. a.) stets stark tingiert erscheinen und sich dadurch von den umliegenden farblosen Zellen schachbrettartig abheben (Abb. 1 c).

An den Moosstämmchen sind die Zellwände mit wenigen Ausnahmen nur schwer färbbar. Vielleicht sind sie im Vergleich zu den Blättchen durch eine stärkere Kutikula gegen das Eintreten des Farbstoffes geschützt.

Wie bei anderen Zellobjekten ist das Auftreten der Zellsaftfärbung bei den Lebermoosen p_H abhängig. Für das Moos *Calypogeia fissa* liegt die Färbeschwelle bei Brillantcresylblau, Neutralrot und Neutralviolett um p_H 6,35, bei Gentianaviolett um p_H 7,1. Nekrotische Zellen sind am Färbe- und Plasmolysebild kenntlich (Abb. 1 d u. e). Mit Farbstoffen Prune pure, Pyronin und Thionin konnte keine Inhaltsfärbung erzielt werden. Die Farbspeicherung erfolgt diffus oder in Form von Tröpfchen, die Schwelle für Tröpfchen liegt um 1—2 p_H-Stufen niederer als für Diffusfärbung.

Tinktion der Ölkörper (vgl. KRAUSS) konnte bei *Aplozia riparia, Chiloscyphus pallescens* und *Scapania nemorosa,* beobachtet werden. Bei *Pellia Neesiana* tritt sie nur in deutlich geschädigten Zellen auf.

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

Literatur

BROOKS S. C. and MOLDENHAUER-BROOKS M. 1941. The permeability of living cells. Protoplasma-Monographien. 19, Berlin.

CZAJA A. TH. 1936. Der Membran- oder Poreneffekt des Absorptionsgewebes und seine physiolog. Bedeutung. Planta 24: 527.

DANGEARD P. 1947. Cytologie végétale et cytologie générale. Paris.

DRAWERT H. 1939. Zur Frage der Stoffaufnahme durch die pflanzliche Zelle. I. Versuche mit Rhodamin. Planta 29: 376.

— 1940. Desgl. II. Die Aufnahme bas. Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora 34: 159.

— 1941. Desgl. III. Die Aufnahme saurer Farbstoffe und das Permeabilitätsproblem. Flora 35: 21.

GUILLIERMOND A. und ATKINSON L. R. 1941. The cytoplasma of the plant cell.

HERZOG Th. und HÖFLER K. 1944. Kalkmoosgesellschaften um Golling. Hedwigia 82.

HÖFLER K. 1943 a. Über die Austrocknungsfähigkeit des Protoplasmas. Ber. dtsch. bot. Ges. 60: 94.

— 1943 b. Über die Austrocknungsgrenzen des Protoplasmas. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl.; Akad.-Anzeiger Nr. 12 (1942).

— 1946 a. Über Trockenhärtung und Härtungsgrenzen des Protoplasmas einiger Lebermoose. Akad. Wiss. Wien; math.-nat. Kl.; Akad.-Anzeiger Nr. 3 (1945).

— 1946 b. Über den isoelektr. Punkt natürlicher Zellulosemembranen und deren Färbbarkeit mit Fluorochromen. Anz. Akad. Wien Nr. 7.

— 1947. Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung. Mikroskopie 2: 13.

— 1948. Einige Nekrosen bei Färbungen mit Akridinorange. Sitzungsber. öst. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl. I/156.

— 1949 a. Neue Ergebnisse der Vital- und Fluoreszenzfärbung. Wiss. Mitt. pharm. Forschungsinst. 1 (4).

— 1949 b. Fluoreszenzmikroskopie und Zellphysiologie. Biologia generalis 19: 90.

— 1950. Über die Trockenhärtung des Protoplasmas. Ber. dtsch. bot. Ges. 63.

— und PECKSIEDER E. 1947. Fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen an höheren Pilzen. Österr. bot. Z. 94: 99.

— und SCHINDLER H. 1951. Vitalfärbung von Algenzellen mit Toluidinblaulösungen gestufter Wasserstoffionenkonzentrationen. Protoplasma 40: 137.

— und STIEGLER A. 1947. Cresylechtviolett als Vitalfarbstoff. Mikroskopie 2: 250.

HUBER B. und HÖFLER K. 1930. Die Wasserpermeabilität des Protoplasmas. Jb. wiss. Bot. 73: 351.

IRWIN M. 1922: The penetration of dyes as influenced by hydrogen ion concentration. Journ. Gen. Physiol. 5: 727.

KRAUSS J. 1946. Vitalfärbungsstudie an Lebermoosen mit Neutralrot und Fluoreszenzfarbstoffen. Diss. Wien.

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

KRESSIN G. 1935. Beiträge zur vergleichenden Protoplasmatik der Mooszelle. Diss. Greifswald.

MÜLLER K. 1912. Die Lebermoose; in RABENHORST, Kryptogamenflora, 8. Leipzig.

— 1939. Die Lebermoose; Ergänzungsband zu RABENHORSTS Kryptogamenflora. Leipzig.

PECKSIEDER E. M. 1948. Permeabilitätsstudien an Lebermoosen. Sitzber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl. Abt. I/156: 521.

— 1950. Zur Frage der Farbionenpermeabilität des Protoplasmas. Biologia Generalis. 19: 224.

PFEFFER W. 1886. Über die Aufnahme von Anilinfarben in lebenden Zellen. Unters. bot. Inst. Tübingen, 2: 179.

RUHLAND W. 1908. Beiträge zur Kenntnis der Permeabilität der Plasmahaut. Jb. wiss. Bot. 46: 1.

SCHINDLER H. 1938 a. Tötungsart und Absterbebild. I. Der Alkalitod der Pflanzenzelle. Protoplasma 30: 186.

— 1938 b. Desgl. II. Der Säuretod der Pflanzenzelle. Protoplasma 30: 547.

STRUGGER S. 1936. Beiträge zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma 26: 56.

— 1937. Weitere Untersuchungen über die Vitalfärbung der Plastiden mit Rhodaminen. Flora 131: 324.

— 1938. Die Vitalfärbung des Protoplasmas mit Rhodamin B und 6 G. Protoplasma 30: 85.

— 1940: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jenaische Z. Naturwiss. 73: 97.

— 1949. Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl.

WALDHEIM W. 1949. Differentialfärbung mit Rhodamin B. Mikroskopie 4 (1/2): 46.

WIESNER G. 1951. Untersuchungen über Vitalfärbungen von *Allium*-Zellen mit basischen Hellfeldfarbstoffen. Protoplasma 40: 405.

WILL-RICHTER G. 1949. Der osmotische Wert der Lebermoose. Sitzber. Österr. Akad. Wiss., math.-nat. Kl. I/158 (6): 431.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn

Jahr/Year: 1952

Band/Volume: 4_1_3

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

Artikel/Article: Vitalfärbungsstudien an Lebermoosen I. 203-214