Über die Plasmorrhysie nackter Protoplasten II

Von H. Pfeiffer, Bremen (Deutschland)

Eingegangen am 29. Juni 1932

In der vorangegangenen Mitteilung haben wir die in hypertonischen Medien bewirkte Kontraktion nackter Protoplasten zum Unterschiede von dem durch H. DE VRIES aufgestellten Begriffe der Plasmolyse umhüteter Zellen nach BALBIANI (1, S. 537) als *Plasmorrhysie* bezeichnet (9, S. 27). Die damals an pflanzlichen Beerenperikarpzellen und an menschlichen Speicheldrüsenzellen angestellten Untersuchungen haben das Ziel gehabt, die plasmorrhytische Kontraktion zu charakterisieren und ihre Variationsfähigkeit ohne völlig bestimmte Umschreibung der kausalen Bedingungen, ihre Reversibilität nach Einwirkung hypotonischer Lösungen (*Deplasmorrhysie*) und den Einfluß vorausgegangener Tanninbehandlung der Objekte zu untersuchen.

Dabei sind auch schon neue *Aufgaben* aufgetaucht, wie die Frage nach dem Einfluß der Konzentration hyper- und hypotonischer Lösungen einerseits und der C_H der Medien andererseits (9, S. 30), an deren Beantwortung aber erst soweit herangegangen ist, als diese Fragen in die Versuche zur messenden Behandlung der Plasmorrhysie hineinreichen. Weitere Ziele, so die Untersuchung des quellenden und entquellenden Einflusses bestimmter Salzionen (9, S. 33), der Wirkung von Anelektrolyten und Anästhetika (womöglich bei wechselnder C_H), sind sogar noch weniger in Betracht gezogen.

Vielmehr ist bei dieser *zweiten Mitteilung* vor allem die Beantwortung der vorläufig wichtigeren Frage nach der *quantitativen Erfassung der Erscheinung* (9, S. 33) zu fördern versucht worden, und ob auch die Versuche darüber noch nicht als abgeschlossen gelten dürfen, sind doch schon einige Möglichkeiten, die einen weiteren Ausbau lohnend erscheinen lassen, anzuführen (§§ 5–7).

Gleichzeitig ist das Bestreben darauf gerichtet gewesen, *weitere Objekte* der Untersuchung zugänglich zu machen. Während die vorangegangenen Beobachtungen vor allem an Material aus dem saftig zerfließenden Perikarpgewebe von Beeren, also an zwar fast das ganze Jahr vorhandenen Objekten angestellt worden sind, die aber im Verlaufe der normalen Histogenese sich ihrer Membran selbst entledigen, ist nun versucht worden, *pflanzliche Protoplasten experimentell ihrer Wand zu entblößen* (§ 1). Daneben sind wie in dem ersten Beitrage (9, S. 31 f.) auch wieder menschliche Speicheldrüsenzellen zur Untersuchung benutzt worden (§ 7).

Während nun die früher herangezogenen Objekte in der üblichen Weise bei durchfallendem Lichte mikroskopiert werden können, wobei sich dann allerdings für länger fortgesetzte Beobachtungen die *Technik der Durchströmung* des Präparats empfiehlt (§ 2), ist dieses Verfahren bei der Verwendung der neuen Objekte zweckmäßig durch Umstellung auf die *Technik der Auflichtmikroskopie*, wie sie insonderheit VONWILLER (14; 15) erarbeitet hat, zu ergänzen. In ihrer neueren Ausgestaltung ist diese Technik auch zur Lösung cytologischer und protoplasmatischer Probleme geeignet (12); doch bedarf es wegen ihrer bislang ziemlich seltenen Anwendung auf diesen Gebieten hier einiger kurzer Bemerkungen (§§ 3–4).

A. Die Beschaffung neuen Materials

1. Die *experimentelle Entblössung pflanzlicher Protoplasten* gelingt am einfachsten durch Zertrümmerung der Membran (6, S. 102). Oft ist auf solche Weise das dem geöffneten Lumen entschlüpfende Protoplasma, etwa bei Verwendung von *Siphon*-Zellen, in Form zahlreicher kleinerer oder größerer Tropfen gewonnen worden. Daß aber durch *Öffnen plasmolysierter Zellen höherer Pflanzen* auch ganze Protoplasten anscheinend ohne erhebliche Läsion zu erhalten sind, welche bei nachwirkender Einwirkung hypotonischer Lösungen aus der geöffneten Zelle herausschlüpfen, hat zuerst af KLERCKER (4, S. 465) gezeigt und ist seitdem mehrfach und zu verschiedenen Untersuchungszielen wiederholt worden.

So hat KÜSTER (in dem Festbande für W. ROUX) das Verfahren durch experimentelle Fusion benachbarter nackter Protoplasten zu einer Technik für die Darstellung doppelkerniger, abnorm großer Protoplasten ausgebaut (5, S. 1035; 6, S. 54), während W. SEIFRIZ unter Anwendung mikrodissessorischer (mikrurgischer) Verfahren die nackten, plasmolysierten Protoplasten oder Tonoplasten aus ihrem Wandgehäuse herausgezogen und neuerdings R. CHAMBERS und K. HÖFLER gewisse zuvor von CHAMBERS und P. REZNIKOFF vorgenommene mikrurgische Eingriffe auf die gleichen Objekte angewandt haben. Auf diese (hauptsächlich in Protoplasma Bd. 3 und 12 erschienenen) Untersuchungen in einem weiteren Beitrage dieser Serie zurückzukommen, wollen wir uns noch vorbehalten (vgl. aber auch hier schon: 3, S. 451 f.).

Die Methode af KLERCKERS (4, S. 465) besteht darin, daß Blattstücke oder, wie hier von uns vorgezogen, ganze Organe von außen her soweit plasmolysiert werden, daß sich die Protoplasten allseitig von der Wand ihrer Zellen abheben und zur Kugelform zusammenziehen, worauf die Gewebe zerschnitten oder die vorbehandelten Organe mit scharfen Einschnitten versehen werden. Dann werden zwar viele der Protoplasten vernichtet werden, aber viele andere bleiben von dem Schnitte unberührt, indem er nur die Zellwandung zertrümmert. Aus

den geöffneten Zellen kann man die infolge der plasmolytischen Vorbehandlung geschrumpften Protoplasten schon durch *sanften Druck* auf das Deckglas herausquetschen oder nach der von SEIFRIZ geübten Arbeitsweise *herausziehen*. Doch werden sie auch durch *Verdünnen* der vorher hypertonischen Lösung so leicht zum Ausschlüpfen gebracht, daß HUBER und HÖFLER (3, S. 454, 459) nur durch besondere Maßregeln ihr Verbleiben in den geöffneten Zellen ermöglicht haben.

B. Die mikroskopische Beobachtung (nebst Bemerkungen zur Technik der Auflicht-Cytoskopie)

2. Die mikroskopische Untersuchung der nackten Protoplasten kann in der üblichen Weise *im durchfallenden Lichte* erfolgen, nachdem viele von ihnen mittels lose aufgedrückten Pinsels auf das Deckgläschen der *Beobachtungskammer* gebracht worden sind. Als solche hat sich der *Durchfluss-Objektträger* von E. BUSCH (Rathenow) mehr noch als andere im Handel befindliche Kammern bewährt.⁺⁾

Jener Apparat (Fig. 1) besteht aus einer Metallplatte von Form und Größe der üblichen Objektträger und zeigt in der Mitte einen sehr flachen zylindrischen Behälter, dessen Boden von einem wasser- und gasdicht in die Metallplatte eingelassenen Glasfenster, dessen Decke aber von einem kreisförmigen Deckglas (Durchmesser 22 mm) gebildet wird, das durch einen abdichtenden Gummiring und einen mit Gewinde

Fig. 1. Der *Durchfluss-Objektträger* (E. BUSCH, Rathenow) in Projektion von oben und im Querschnitt.

⁺⁾ Der Firma E. BUSCH und insbesondere Herrn Dr. K. ALBRECHT möchte Verf. für die längere Überlassung einer Apparatur zu Versuchszwecken auch an dieser Stelle seinen *besonderen Dank* aussprechen.

versehenen, hohlzylinderischen Deckelring festgehalten wird, welcher durch einen passenden Schlüssel heraus- oder aufschraubbar ist. In die Kammer, welche durch Drehbewegung des Deckelringes entsprechend einer angebrachten Skala auf beliebige Tiefen bis zu maximal 0,5 mm senkrechtem Abstand variiert werden kann, mündet an den Schmalseiten des Objektträgers je eine Öffnung mit Schlauchansatz. Die Maße der Kammer und die Dicke ihres Boden- und Deckglases erlauben auch bei Verwendung stärkerer Trockenobjektive oder Immersionen die erforderliche Annäherung. Überaus bequem ist nach Herausnehmen des Deckglases daran die Anbringung der zu untersuchenden Kultur im hängenden Tropfen, und auch die Reinigung der Apparatur läßt sich nach Öffnen der Kammer mühelos in der sonst üblichen Weise mittels der von ZETTNOW angegebenen Flüssigkeit vornehmen (11, S. 210 f.).

Außerdem ist in steigendem Maße auch *im auffallenden Lichte* mikroskopiert worden, indem gerade diese Technik mehr als die bisher gebräuchlichere die Beobachtung *in vivo et in situ* ermöglicht und damit die von der neueren Protoplasmaforschung erhobene Forderung nach *Lebendbeobachtung* erfüllt (12, S. 558). Dazu werden die unverletzten Pflanzen direkt unter das Mikroskop gebracht (Fig. 2–3), wobei die neueren Mikroskopstative auch wohl eine Zerlegung des Instruments und u. U. die Anbringung allein des Tubus mit seiner optischen Ausrüstung an einem Einfach- oder Doppelsäulenstativ erlauben (12, S. 559).

3. Bei der Apparatur für *schräg auffallendes Licht*, wie sie in einer gewissen Vollkommenheit für ophthalmologische Aufgaben in der GULLSTRANDSchen Einrichtung (Spaltlampe und Hornhautmikroskop nach CZAPSKI oder GREENOUGH) geschaffen worden ist und weiterhin in den Vorrichtungen des alten LIEBERKÜHNspiegels (1738), des Auflicht-Dunkelfeldkondensors (F. HAUSER), Parabolspiegels (P. METZNER) und Schräglichtilluminators zur Verfügung steht, ergeben sich bei den in der Cytologie erforderlichen Objektiven kürzerer Brennweiten wegen des geringen Objektabstandes und der Behinderung durch die Objektivfassung technische Schwierigkeiten und schließlich Grenzen der Anwendbarkeit, die oft gerade bei den cytologisch wichtigen Vergrößerungen beginnen (15, S. 464). Das ganz besonders für diese Verhältnisse ausgebauten Verfahren *vertikaler Beleuchtung von oben* (15, S. 466f.) unter Ausnutzung des Objektivs gleichzeitig als Beleuchtungskondensor und Beobachtungssystem (sogen. Vertikalilluminatoren) ergibt wiederum vielfach sowohl in der Ausführung mit Planparallelglas als reflektierendes Element (BECK), als auch in jener mit total reflektierendem Prisma (NACHET) infolge mancherlei Reflexe am Tubus und an den Objektivlinsen ein teilweise verschleiertes Bild. So sind denn bei dem heutigen Stande der Auflichtmikroskopie und des Instrumentenbaues immer noch *beide Verfahren nebeneinander* erwünscht (12, S. 560).

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 2-3. Versuchsanordnung zu auflichtmikroskopischen Beobachtungen mit dem „Univertor“ und einem zerlegbaren Mikroskopstativ.

Von den beiden Reflexionselementen liefert das *Prisma* lichtstärkere Bilder, aber infolge des etwas verschiedenen Lichteinfalles zuweilen auch unliebsame Bildstörungen, während das *Planglas* ein milderes, gleichmäßiger verteiltes Bild erzeugt, also eine zwar lichtschwächere, aber genauere Abbildung ermöglicht. Es genügt daher bei stark reflektierenden Objekten in jeder Weise, während bei schwach reflektierenden vielfach das Prisma vorzuziehen ist. Stets aber bleibt es wünschenswert, daß beide Reflexionselemente an demselben Instrument vereinigt und auf einfachste Weise und ohne Störung der mikroskopischen Einstellung austauschbar sind (vgl. 15, S. 466).

Weitere Vervollkommnungen ergeben sich beim *Spaltopakilluminator* (15, S. 466) durch eine verschiebbare Konvexlinse zur Einstellung des Lichtbündels auf die Ebene des Objekts, durch gegeneinander auswechselbare Blenden zum Herausschneiden eines beliebig abzustufenden und parallel verschiebbaren Bandes aus dem Gesichtsfelde (*Spaltblende*) und zur ausschließlichen Beleuchtung eines beliebig zu verkleinern den punktförmigen Feldes (*Winkelblenden*).

Indem die Technik der Auflichtmikroskopie nicht die heute gebräuchlichere Anwendung durchfallenden Lichtes ersetzen, sondern nur *ergänzend neben sie treten* soll (15, S. 462; 12, S. 559), verdient vielleicht ein universales Instrument den Vorzug, das ohne Veränderung der mikroskopischen Einstellung sämtliche Beobachtungsweisen neben- und nacheinander erlaubt.^{*)} Eine solche Möglichkeit ist in vorzüglicher Weise in dem von E. BUSCH (Rathenow) gebauten „*Univertor*“ (10, S. 105 f.)^{**)} gegeben.

Diese Vorrichtung besitzt für die Anwendung *schrägen Auflichtes* (mit ausgezogenem Beleuchtungsstutzen) einen Ringspiegel im Stutzen und einen asphärischen Hohlspiegelring außerhalb des Strahlenganges des Objektivs, für die Benutzung *vertikalen Auflichtes* (mit eingedrücktem Stutzen) wie andere Vertikalilluminatoren die beiden auswechselbaren Reflexionselemente (Planglas und Prisma) und kann endlich zum Mikroskopieren mit *durchfallendem Lichte* benutzt werden, indem der Schiebestutzen eingedrückt und die Reflexionsvorrichtungen außer Tätigkeit gesetzt werden (10, S. 104 f.). Durch das vorhandene kleine Niedervoltglühlämpchen ist die praktische Handhabung sehr vereinfacht. Auch wird eine sehr große Reflexfreiheit bei hoher Beleuchtungsintensität erreicht und kann das Azimut von allseitiger bis zu einseitiger Beleuchtung verändert werden.

Seit kurzem liegen erste Berichte über einen neuen Vertikalilluminator von LEITZ (Wetzlar), den sogen. *Ultropak*, vor, der ähnlich wie eine von CHAPMAN und ALLDRIDGE (1924) vorgesehene Anordnung grundsätzlich das Prinzip der Beleuchtung außerhalb des Strahlenganges der Beobachtungsoptik verfolgt (vgl. die Beschreibung H. HEINES in Z. wiss. Mikrosk. 49, 456, 1932). Nachdem mir von der Firma die Einrichtung zur Erprobung ihrer Eignung für cytologische Aufgaben längere Zeit zur Verfügung gestellt gewesen ist (wofür auch an dieser Stelle herzlicher Dank ausgedrückt sei), bemerke ich, daß die hohe *Lichthelligkeit* der Bilder, ihre aus dem angewandten Beleuchtungsprinzip folgende große *Reflexfreiheit*, sowie die Anwend-

^{*)} Sofern auch im *durchfallenden Lichte* mikroskopiert werden soll, bleibt die Untersuchung allerdings auf vorbereitete Präparate statt auf den intakten Organismus beschränkt.

^{**)} Für die Ermöglichung einer *Erprobung* durch Überlassung einer vollständigen Einrichtung des zerlegbaren Stativs E und des Univertors mit sämtlichem Zubehör bis herab zu Objektführern, Widerstand u. a. Nebenapparaten (Fig. 2-3) ist Verf. der Firma und ganz besonders Herrn Dr. K. ALBRECHT zu *ausserordentlichem Danke* verbunden, den er hier nochmals ausdrücken möchte.

barkheit auch der *starken Immersionen* U-O 75×W und 90×W den *Ultropak* für die Auflichtcytoskopie in hervorragendem Maße empfehlen, auch wenn bei ihm im Gegensatz zum *Univertor* eine Umstellung auf die beiden Modi der Auflichtbeleuchtung und auf die Benutzung transmittierenden Lichtes nicht möglich ist.

4. Eine ausreichende mikroskopische Auflösung der Objekte mittels auffallenden Lichtes ist, wie häufig durch Untersuchungen auf den verschiedensten Gebieten hauptsächlich von VONWILLER und seinen Mitarbeitern V. DEMOLE, E. BORS u.a., aber auch durch alle eigenen Beobachtungen immer wieder belegt worden ist, vor allem abhängig von *geeigneter Verteilung* reflektierender Strukturelemente mikroskopischer und höherer Größenordnung in dem untersuchten Objekt (12, S. 562 f.). Daß sich im gleichen Sinne aber auch die *physikalische Natur der wirksamen Reflektoren* (vgl. VONWILLERS diesbezügliche Einteilung od. meinen Berliner Vortrag: 12) auswirkt, soll darum nicht übersehen werden. Die theoretische Analyse der Reflexionsverhältnisse lebender Objekte durch VONWILLER hat uns solcherart nicht allein das Zustandekommen des Bildes verstehen, sondern auch ungünstige Reflexionsbedingungen mit Erfolg überwinden gelehrt. So brauchen wir heute die auflichtmikroskopische Untersuchung nicht einzustellen, weil ein bestimmtes Objekt nicht geeignet erscheint, sondern können die Schwierigkeiten durch *Application künstlicher und geschickte Ausnutzung etwa vorkommender Bioreflektoren* überwinden (15, S. 464 f.).

Störungen infolge *über dem Objekt* befindlicher Reflektoren, die u. U. jegliche Beobachtung verhindern können, werden durch Vermeiden des Deckglases oder durch Auftragen einer sehr dünnen Lage derselben Immersionsflüssigkeit unter dasselbe, durch Drehen des Prismas oder des Planglases, durch Veränderung der Blende am Fenster des Beleuchtungsstutzens oder unter Verwendung einer besonderen Lichtquelle durch deren Abrücken, Änderung des Lichteinfalles o. dgl., beseitigt (12; vgl. auch 15, S. 465).

Bei Schwierigkeiten infolge starker *Reflexion der Aussenschicht* der Protoplasten ist vielleicht nur durch Anwendung geneigten Auflichtes weiterzukommen, doch sind Hindernisse dieser Kategorie erfreulicherweise anscheinend ziemlich selten (12).

Wenn eine *in geringer Tiefe im Objekt* gelegene Schicht als Reflektor wirkt, so daß sich die tiefer situierten Zellen der Untersuchung entziehen, so kann man mit VONWILLER (15, S. 471 f.) die vertikale Beleuchtung durch experimentelle Abschrägung des Lichteinfalles innerhalb der Gewebe modifizieren (*indirekte Beleuchtung*).

Ganz besonders bedeutsam aber wird an manchen der hier untersuchten Objekte eine andere Technik, welche ich in Anlehnung an die glänzenden Ergebnisse VONWILLERS zusammen mit VANNOTTI in der *Capillaroskopie* am lebenden Menschen (16, S. 1549 f.) unabhängig von ihrer Anwendung des gleichen Prinzips zur *Karyoskopie* an der lebenden menschlichen Haut (17, S. 527 f.) versucht habe. Es wird dazu ein feinpoliertes, ganz ebenes oder leicht nach oben gekrümmtes *Ag- oder Pt-Plättchen*, das womöglich an der Vorderseite etwas dünner sein soll,

möglichst flach (fast seitlich) in das Gewebe hineingeschoben. Schreitet man dann beim Mikroskopieren *vom Einführungsrande proximal abwärts*, so findet sich leicht die Zone, in welcher darüber situierte Schichten das spiegelnd reflektierte Licht genügend gedämpft haben.

Durch alle diese Maßnahmen glückt es, auch an sonst ungeeigneten Objekten die Vergrößerungen bis auf die cytologisch erforderlichen auszudehnen und wie sonst mikrurgische und chirurgische Eingriffe (15, S. 472 f., 473 f.) vorzunehmen.

C. Ansätze zu quantitativer Erfassung der plasmorrhytischen Formänderungen

5. Die in mehrfacher Hinsicht zu bemerkende *Parallelität zwischen der Plasmolyse umhüteter und der Plasmorrhhyse nackter Protoplasten* (9, S. 32 f.) legt den Gedanken nahe, für die quantitative Analyse der plasmorrhytischen Schrumpfung ähnliche Methoden zu entwickeln, wie sie in manchen Merkmalen der Plasmolyse, beispielsweise zur Messung der Viscosität durch die glückliche Pioniertätigkeit vor allem FR. WEBERS, gefunden worden sind. * Dabei scheint freilich die verschiedene *Form* plasmorrhysierter Protoplasten wegen ungenügender Charakterisierbarkeit vorläufig besser auszuscheiden. Untersuchungen in dieser Richtung sind aber auch deshalb schon früh aufgegeben worden, weil die Formbestimmung auch beim Plasmolyseprozeß wegen zu geringer Empfindlichkeit der Reaktion mindestens als alleiniges Verfahren heute wohl zumeist verlassen worden ist. Dort aber hat sich, in die neuere Protoplasmaforschung wiederum durch FR. WEBER (18, S. 623) eingeführt, die Ermittlung der *Plasmolyse-Zeit* (vom Zutritt des Plasmolytikums bis zum Erreichen konvexer Plasmolyse) oder der *Grenzplasmolyse-Zeit* (bis zum Eintritt der Grenzplasmolyse) schon verschiedentlich bewährt, so zur Ermittlung des Viscositätsminimums in der Zone um den isoelektrischen Punkt (8, S. 87,88; vgl. auch 7, S. 1584 f.) ^{*)}.

So ergibt sich das Ziel, analog der WEBERSchen Methode nunmehr eine solche der *Plasmorrhhyse-Zeit* zu entwickeln, sofern sich auf die Zeit bis zur Erreichung eines definierbaren Plasmorrhhysegrades bindende Schlüsse gründen lassen.

^{*)} Durch persönliche Mitteilung erfahre ich auf der Tagung der Dtsch. Botan. Ges. (Berlin, Pfingsten 1932) von Kollegen STRUGGER, daß die in dieser Weise angewandte Plasmolyse-Zeit-Methode auch schon einen wertvollen Aufschluß über die antibathe Beziehung zwischen *isoelektrischer Reaktion und Wachstumsverhalten* (vgl. 7, S. 1596) geliefert hat.

Während nun aber bei der WEBERSchen Methode in dem Erreichen der konvexen oder der Grenzplasmolyse (je nach der zur Anwendung kommenden Spezialform des Verfahrens) ein *fest begrenzter Zeitraum* (beginnend mit dem Zutritt des Plasmolytikums) sogleich gegeben ist, fehlt ein solches Merkmal bei der Plasmorrhhyse nackter Protoplasten.

Da könnte man nun zuerst die Geschwindigkeit der Volumänderungen bis zum Erreichen der vorher eigentümlichen Dimensionen beobachten. So haben denn auch schon manche Autoren gelegentlich aus raschem und perfektem Rückgang der plasmorrhytischen Schrumpfung auf geringe Festigkeit und hohes Ausdehnungsvermögen der plasmatischen Oberfläche, aus langsamen Volumänderungen aber (wobei bei den hier erprobten Objekten, zumal in angesäuertem Medium innere Plasmateile bruch-sackartig hervorquellen können) auf größere Starrheit geschlossen. Es muß leider unentschieden bleiben, ob und in welcher Weise derartige *Konsistenzunterschiede oberflächlicher Lagen* Rückschlüsse auf das physikalische Verhalten der *Gesamtprotoplasten* zulassen.

Dazu möchte vielleicht die quantitative *Bestimmung des Schrumpfungsgades* (in Prozenten des Ausgangsvolumens) auf mikrometrischem Wege noch besser geeignet sein. Hierzu seien einige Ergebnisse in Auswahl mitgeteilt, obgleich ein solches Verfahren durch die später mitzuteilenden Experimente noch ausgebaut werden kann (§ 6).

Läßt man einr 0,8 GM NaCl-Lösung auf die Außenepidermis der Zwiebelschuppe von *Allium Cepa* 1½ Std. einwirken und nimmt dann den Schnitt vor (§ 1), so ergibt die Deplasmorrhhyse der Protoplasten geöffneter Zellen nach Absaugen und Auswechseln der vorherigen NaCl-Lösung durch eine von 0,5 GM eine Größenzunahme der (zuvor gemessenen) geschrumpften Protoplasten beispielsweise um 50% nach 3–3½ Min. Verlängert man die *Dauer der Vorbehandlung* (erhöht man also wohl den Plasmolysegrad) auf vielleicht 2 (bzw. 2½) Std., so ergibt sich die gleiche 50%-ige Volumzunahme erst nach 6½–7 Min. (bzw. 7–7½) Min. Durch Verwendung einer gleich starken, aber aus KCl und CaCl₂ (9:1) *gemischten Lösung* wird die Deplasmorrhhyse-Zeit bis auf 3 Min. abgekürzt. Wird endlich der Schrumpfungsrückgang der 2 Std. mit 0,8 GM jenes Gemisches vorbehandelten Objekte nach Anbringen des Schnittes mit 10% *Saccharose*, welche durch Essigsäurezusatz auf eine C_H von 5·10⁻⁸ (pH 7,5) oder weniger angesäuert worden ist, so wird die 50%-ige Größenzunahme nach 4–4½, bei Ansäuerung bis auf eine C_H von 4·10⁻⁷ (pH 6,4) oder mehr nach 8–10 Min. erreicht.

In Versuchen mit den *an der Pflanze belassenen Blättern* von *Convallaria majalis*, bei denen nach Plasmolyse mittels 0,8 GM Fructose nachher in 0,6 (bzw. 0,5) GM deplasmorrhysiert worden ist, zeigt sich eine viel schnellere Volumsteigerung, sodaß eine 75%-ige Zunahme gegenüber dem Volumen des geschrumpften Protoplasten als Grenzwert angenommen werden muß, der je nach Alter der Blätter und ihrer Zellen oder andern noch nicht genügend erkannten Faktoren in 3–4 (bzw. 2½–3) Min. erreicht wird.

Bei andern *Objekten* und wechselnden osmotischen *Medien* werden wir uns also zweckmäßig nicht an die Bestimmung der 50%-igen Volumzunahme bei der Deplasmorrhhyse binden dürfen. Die *geringeren Schwellungsgrade* eignen sich allerdings sowohl wegen ihrer schwierigeren Bestimmbarkeit, als auch wegen bisweilen zu findender Unregelmäßigkeiten in der deplasmorrhytischen Schwellung wenig oder garnicht als Maßstab für die Formänderungen.

6. Gleicht nun die eben charakterisierte Methode der Bestimmung der *Deplasmorrhysie-Zeit* durchaus der von HUBER und HÖFLER (3, S. 370) angegebenen Ermittlung der „*Halbwertszeit*“ in der Deplasmolyse, in welcher die Hälfte der Endverkleinerung erreicht oder ein anderer fixer „*Diminutionsgrad*“ (3, S. 369) verglichen wird, so muß das Verfahren durch Annahme der plasmometrischen Technik HÖFLERS (1918) auch in dem von jenen Autoren dargelegten Sinne zur *kurvenmässigen Bestimmung der Plasmorrhysiegrad-Zeit-Werte* geeignet sein. Daß diese Erwartung voll berechtigt ist, beweisen ja schon gewisse ihrer Versuche mit Epidermiszellen von *Allium* (Außenlage der Zwiebelschuppen), in denen sie allerdings andere Ziele (Ermittlung von Permeationskonstanten) verfolgen und das Ausschlüpfen der Protoplasten wegen des Vergleiches jener in geschlossenen und in geöffneten Zellen möglichst auszuschließen trachten (3, S. 454, 459; s. auch § 1).

Unter der Voraussetzung, daß die Geschwindigkeit der deplasmorrhytischen Volumzunahme der Protoplasten in jedem Augenblick dem osmotischen Gradienten von der Außenlösung zum Plasmaintern proportional ist, werden wir also nach Ermittlung der Dimensionen des aus dem Zellwandgehäuse befreiten Protoplasten nur für möglichst viele Zeitpunkte die *Dimensionsänderungen* bestimmen, um daraus für jene Zeiten das *relative Volumen* des deplasmorrhysierten Körpers im Vergleich zu dem bei Versuchsbeginn zu finden (s. die Tab. u. Fig. 4).

Welche Vorsichtsmaßnahmen zur *Vermeidung von Fehlmessungen* über die tunlichste Konstanthaltung von Temperatur, chemischen, osmotischen, Aciditätsbedingungen usw. hinaus angewendet werden sollten, lehrt die Plasmometrie. Doch sind manche der Vorschriften bei auflichtmikroskopischer Untersuchung nicht gut durchführbar. Beispielsweise werden Verzögerungen in der Deplasmorrhysie kaum in völlig befriedigendem Ausmaße ausgeschlossen werden können. Daß im übrigen die Bestimmung der *Deplasmorrhysiegeschwindigkeit*, ob auch auf andere Permeationskonstanten als jene des plasmolytischen *Schrumpfungsgrades* basiert, vollauf berechtigt ist (praktisch sogar vielfach den Vorzug verdient), ist durch die reichen Erfahrungen HÖFLERS und seiner Mitarbeiter sicher erwiesen (vgl. 3, S. 470 f.; s. aber auch S. 480). Ihm verdanken wir auch eine mustergültige mathematische Behandlung des Versuchsmaterials (3, S. 361 f.), die hier daher nicht erst gebracht zu werden braucht.

Die vorausgesetzte einfache Beziehung der Volumänderung zum Konzentrationsgefälle gilt u.a. nur unter der Bedingung, daß sich das osmotisch wirksame Material der Zelle unverändert erhält und nur proportional des Volumrückganges konzentriert, nicht aber eine Hemmung oder Beschleunigung durch *Ana-* oder *Katatonose* eintritt. Anscheinend liegen freilich Störungen dieser Art, die mir theoretisch durchaus möglich erscheinen, weit unter der erreichbaren Fehlergrenze. Vorausgesetzt wird ferner das Ausbleiben von *Endosmosen* und *Exosmosen*; wesentliche Störungen in dieser Hinsicht sind nach den gegenwärtigen Erfahrungen *auch* bei den hier untersuchten Landpflanzen kaum zu erwarten.

Eine zuweilen erhebliche Unübersichtlichkeit erfahren die Messungsbefunde durch *individuelle Verschiedenheiten* der Protoplasten nicht allein nach ihrer Größe, sondern auch hinsichtlich ihres osmotischen und Quellungsverhaltens. Wie für andere indivi-

duelle Differenzen dürfte auch hier die von A. PÁAL entwickelte Beziehung Geltung haben, nach welcher unter *optimalen Bedingungen* die Variationen ein Minimum erreichen, mit der Verschlechterung der Untersuchungsbedingungen aber entsprechend anwachsen.

Fig. 4. Verlauf der deplasmorrhytischen Schwellung nackter *Allium*-Protoplasten: Vers. 23 (×—×) in reiner NaCl-Lösung; Vers. 29 (○- - - -○) in dem erwähnten Gemisch aus KCl und CaCl₂; Vers. 34 (○- - - -○) in Saccharose.

Trotz mancher heute noch nicht vermeidbarer Übelstände dürfte die Methode der ihr gestellten Aufgabe (s. Einleitung) gerecht werden, wie Versuche mit Lösungen verschiedenen Konzentrationsgrades zeigen (vgl. auch Fig. 4). Anscheinend ist bei diesen und andern Unterschieden das *Eingreifen von Quellungsphänomenen* in hervorragendem Maße beteiligt, wie nach älteren Angaben von W. PFEFFER (1897) und neueren von H. SCHADE auf klinischem, von H. KOTTE und vor allem H. WALTER

auf botanischem Gebiete auch zu erwarten ist. Da die Versuche aber noch fortgesetzt werden, mögen die Folgerungen über den Einfluß bestimmter Salzionen (s. Einleitung) auf die Erscheinung vorläufig noch zurückgestellt werden.

Tabelle

der prozentualen Deplasmorrhyseschwellung
von *Allium*-Protoplasten im Vergleich zu dem Volumen (100%) plasmolytischer
Schrumpfung (vgl. Fig. 4).

Nr	Versuchs-Modus :			Zeit nach einsetzender Deplasmorrhysie in Min.												
	Dauer der Vorbehandlung in Std.	C ₁	Me-dium	C ₂	$\frac{1}{2}$	1	1 $\frac{1}{2}$	2	2 $\frac{1}{2}$	3	3 $\frac{1}{2}$	4	4 $\frac{1}{2}$	5	6	7
23	2	0,8 GM	NaCl	0,5 GM	—	108	115	124,5	—	136,5	—	147	—	150	—	—
29	5	0,8 GM	KCl + CaCl ₂	0,5 GM	—	106,5	—	113	—	122,5	—	134,5	—	141	—	152
34	1 $\frac{1}{2}$	1,2 GM	Saccharose	0,95 GM	101,5	—	105	—	107,5	110	111	—	114	—	116,5	—

Nr	Versuchs-Modus:				Zeit nach einsetzender Deplasmorrhhyse in Min.											
	Dauer der Vorbehandlung in Std.	C ₁	Medium	C ₂	8	9	10	11	12	13	14	15	18	20	21	24
23	2	0,8 GM	NaCl	0,5 GM	—	—	—	160	160,5	162	—	163	163,5	—	165	—
29	5	0,8 GM	KCl+CaCl ₂	0,5 GM	154	156,5	160	—	—	—	164	—	—	167	—	167
34	1 $\frac{1}{2}$	1,2 GM	Saccharose	0,95 GM	—	118,5	—	121	—	—	121,5	—	122	122,5	—	—

7. Wenngleich es nach allen unsern Erfahrungen der Plasmometrie berechtigt ist (§ 6), statt der Plasmorrhhyse den umgekehrten Prozeß der Größenzunahme der nackten Protoplasten vergleichend und messend zu untersuchen, so haben sich die Bemühungen doch auch darauf gerichtet, die *plasmorrhytische Schrumpfung* ebenfalls vergleichender Analyse näherzuführen. Indem dabei die *BROWNSche Bewegung (BB)* als Indicator Verwendung gefunden hat, schließen sich die Versuche an die früheren Beobachtungen an menschlichen *Speichelzellen* (9, S. 31 f.) an.

Wenn die in der vorangegangenen Mitteilung (9, S. 31) und auch von SCHADE und WEILER (13, S. 46 f.) vertretene Anschauung, daß die BB von einer H-Hyperionie oder von osmotischer Hypotonie abhängt, richtig ist, so könnte die *Sistierung der BB* als Folge plasmorrhytischer Hypertonie unter Berücksichtigung des zeitlichen Eintrittes oder der Geschwindigkeit der Reaktion ein angenähertes Maß ergeben. Das hat sich in der Tat gezeigt. Es genügt, dem Präparat Leitungswasser zuzusetzen, um die BB hervorzurufen und dann nach Absaugen des Mediums schnell die Salzlösung zutreten zu lassen. Je nach der Concentration des hypertonischen Mediums ist alsdann eine frühere oder spätere Einstellung der BB zu bemerken. So schwierig die morphologischen Verhältnisse ohne sehr langwierige Übung und Erfahrung auch zu vergleichen sind, so laufen doch offenbar plasmorrhytische Kontraktion und Sistierung der BB völlig symbath.

Wenn SCHADE (13, S. 54 f.) und PFEIFFER (9, S. 28) bei entsprechender *Ansäuerung* einer stark hypertonischen Tyrodelösung (Δ 0,87) mit Acid. uricum puriss. (C_H $2,5 \cdot 10^{-2}$) eine beträchtliche Quellung und gleichzeitig BB feststellen, so ergibt sich aus der vollkommenen Übereinstimmung mit den Befunden bei osmotischer Hypotonie gleichfalls die Berechtigung für die Annahme, daß in die untersuchten Prozesse Quellungsphänomene hineinragen (§ 6). Die recht beträchtliche H-Hyperionie schließt in solchen Fällen die Plasmorrhhyse trotz Hypertonie des Mediums aus (*deplasmorrhytischer Säureeinfluss*).

Wir dürfen hier nicht unterlassen, auf eine noch ungeklärt gebliebene Unstimmigkeit gegenüber Befunden VAN HERWERDENS hinzuweisen, nach denen *Frosch-Leukocyten* bei Übertragen in 0,1% Essigsäure (in 0,9% NaCl) ihre amöboide Fortbewegung und die BB einstellen, während beim Auswaschen mit der reinen NaCl-Lösung beide erneut einsetzen.

Wie es bei der Heranziehung der BB gewöhnlich geschieht,^{+) so} begnügen wir uns mit der Angabe der *Lebhaftigkeit oder Trägheit, Beschleunigung oder Verzögerung und Einleitung oder Beendigung* der Bewegung. Die wenigen wirklich messenden Verfahren haben aber die Kenntnis des Partikelradius zur Voraussetzung und sind daher in

^{+) Den zahlreichen auf ähnliche Schätzungen basierten Angaben—zur Untersuchung des Viscositätsgrades beispielsweise aus neuerer Zeit jene von P. RUSSO, M. J. HOGUE, R. GROSS, E. LEBLOND, W. M. BAYLISS, W. W. LEPESCHKIN, J. CHIFFLOT und C. GAUTIER, W. SEIFRIZ, F. J. BRINLEY u.v.a.—stehen an Messungen neben den Versuchen von L. G. M. BECKING HAAS, H. v. D. SANDE BAKHUYSEN und H. HOTTELLING eigentlich nur noch die überaus wichtigen Untersuchungen von J. PEKAREK gegenüber, der unter Anwendung der R. FÜRTHschen *Methode der mittleren, doppelseitigen Erstpassagezeiten* der in BB befindlichen Teilchen die absolute Viscosität auch von Protoplasten gemessen hat.}

dieser Form auf unser Objekt nicht übertragbar. Wenn wir freilich für die Viscosität des Plasmas einen Wert als bekannt einsetzen dürften, so könnte die in der letzten Note erwähnte Methode von R. FÜRTH bei Benutzung der Diffusionskammer nach FÜRTH und E. ULLMANN (2, S. 820) und des Diffusionsmikroskops nach J. GICKLHORN und A. NISTLER (2, S. 825 f.) recht wohl zur Ermittlung der *Dimension der schwingenden Teilchen* benutzt werden (2, S. 816 f.), doch ist nicht ersichtlich, welchen Vorteil ein solches Ergebnis für die hier angestellten Untersuchungen haben sollte. Aus den angegebenen Gründen sind auch schon *andere Versuche* auf ihre Ausbaufähigkeit zu Messungszwecken bei der Plasmorrhhyse untersucht worden. Indem hier aber noch keine befriedigenden Resultate erlangt worden sind, mögen ein paar kurze Andeutungen über diese noch weiter zu verfolgenden Erscheinungen die vorliegende Mitteilung beschließen.

Wie man eine Volumzunahme von Protoplasten auch wohl als eine $\pm$ direkte Wirkung erniedrigter *Oberflächenspannung* der plasmatischen Außenfläche betrachten kann, so möchte die plasmorrhhytische Kontraktion zugleich als Folge erhöhter Oberflächenspannung zu deuten sein. So läßt sich durch Überführen der Speichelzellen in 1% Saponin. pur. albiss. (stalagmometrische Tropfenzahl 59) eine anfangs (2 Std.) merkbare, dann (nach 4, 8, 24 Std.) um je rund die Hälfte der jeweils vorherigen Steigerung zurückgehende Volumzunahme, in so geringen Grenzen sie sich auch hält, erkennen, während 1% Natriumglykocolat (Tropfenzahl 95) zu diesem Versuche ungeeignet ist. Ob aber auch G. LEPEHNE (Verhdl. Dtsch. Ges. inn. Med.—Wiesbaden 1922) bei Funktionsstörungen der Leber durch Messung der Oberflächenspannung mittels der HAYKRAFT-Reaktion (7, S. 1583) klinisch brauchbare Vergleichswerte für den Gallensäuregehalt der Sera zu ermitteln vermochte, so ist doch bekannt, daß für gallensaure Salze und Saponine die *Wirkung auf die Oberflächenspannung und auf physiologische Erscheinungen nicht immer proportional* sind (F. BOAS, L. KOFLER, u.a.). Daher sind die Versuche zur Entwicklung eines messenden Verfahrens für die Deplasmorrhhyse in dieser Richtung vorläufig aufgegeben worden.

Ausgezeichnete Aussichten scheinen aber für Bestimmungen der *Loslösungszeit* (nach vorheriger gleicher Anheftungszeit) und für messende Versuche der *Klebrigkeit* (stickiness) und des *Haftvermögens* (adhesiveness) an Fremdkörpern unter Heranziehung etwa der *Abwaschmethode* von W. BARIKINE oder des *Strömungsverfahrens* nach W. O. FENN zu bestehen. Indem diese Methoden aber noch der näheren Ausarbeitung und der besseren Anpassung an die von uns verfolgten Ziele bedürfen, sei eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse mit ihnen einstweilen zurückgestellt.

Zusammenfassung

Die Fortsetzung der Plasmorrhhyse- und Deplasmorrhhyseuntersuchungen ist weiterhin teilweise an den schon früher herangezogenen *menschlichen Speichelzellen*, daneben aber an experimentell nach der Methode af KLERCKERS entblößten *Protoplasten pflanzlicher Abkunft* (Zwiebelschuppen von *Allium*, Blätter von Arten von *Allium*, *Convallaria*, *Iris*, *Orchis*, *Agave* und *Sedum*) vorgenommen worden. Die mikroskopischen Beobachtungen sind bei den Speichelzellen allein, bei den pflanzlichen Objekten teilweise *im durchfallenden Lichte* (unter Verwendung eines als *Durchströmungskammer* dienenden Durchfluß-Objekträgers) geschehen und in den letzteren

Fällen durch ständiges *auflichtmikroskopisches Arbeiten* mit dem neuen Illuminator „Univertor“ (BUSCH) ergänzt worden. Außer den Bemerkungen zur af KLERCKERschen Methode und zu den Einrichtungen zur Durchströmung des Präparats und zur Auflichtcytoskopie, die eine Untersuchung der Objekte *in vivo et in situ* ermöglichen soll, bringen die einführenden Kapitel Betrachtungen zum Ausbau der auflichtmikroskopischen Technik in der Cytologie (entscheidender Wert der *natürlichen und Bioreflektoren* der Objekte).

Im *zweiten Teile* werden dann vor allem Versuche besprochen, die eine *quantitative Erfassung der Plasmorrhysse und Deplasmorrhysse* anbahnen helfen sollen. Wegen der Verwandtschaft der Plasmorrhysse nackter mit der Plasmolyse umhäueter Protoplasten wird zuerst in Anlehnung an ein Verfahren FR. WEBERS ein solches zur *Verknüpfung von Plasmorrhyssegrad* (in Prozent) *mit Einwirkungszeit* des Mediums versucht. Die Ähnlichkeit dieser Methode mit plasmometrischen Bestimmungen der „Halbwertszeit“ durch K. HÖFLER führt dann zur Erprobung *mikrometrischer Ermittlungen der Volumänderungen gegen die Zeit* (in Min.). Erstreben diese beiden Versuchsreihen (an den botanischen Objekten) ein quantitatives Eindringen in die Deplasmorrhysse (wobei freilich zugleich die Erfassung plasmorrhytischer Formänderungen zum letzten Ziel gesetzt worden ist), so sind die an den Speichelzellen angestellten Versuche, *die BB nach ihrer Lebhaftigkeit oder Trägheit, Beschleunigung oder Verzögerung und Einleitung oder Beendigung* als Indicator plasmatischer Zustandsänderungen zu verwenden, auf die Analyse der plasmorrhytischen Schrumpfung selbst gerichtet. Außer über den Stand dieser Bemühungen werden schließlich Erfahrungen mit einigen erst kürzlich begonnenen Versuchen über Methoden mitgeteilt, die wegen ihrer teilweise erfreulichen Aussichten noch weiter zu verfolgen bleiben.

Literatur

1. Balbiani, E. G., Études sur l'action des sels sur les Infusoires, Arch. Anat. micr. 2: 518-600 (1898, ersch. 1899).
2. Fürth, R., Methoden zur Bestimmung der elektrischen Struktur kolloider Stoffe insbesondere der Biokolloide. In: E. Abderhalden, Handb. biol. Arbeitsmeth., (III), B: 775-857 (1929).
3. Huber, Br. und Höfler, K., Die Wasserpermeabilität des Protoplasmas, Jahrb. wiss. Bot. 73: 351-511 (1930).
4. Klercker, J. af, Eine Methode zur Isolierung lebender Protoplasten, Öfvers. Vet.-Akad. Förhdl. 1892: 463-474.
5. Küster, E., Experimentelle Physiologie der Pflanzenzelle. In: E. Abderhalden, Handb. biol. Arbeitsmeth., (XI), 1: 961-1058 (1924).
6. — Pathologie der Pflanzenzelle I. (Protopl. Monogr. 3.) Berlin (Gebr. Borntraeger) 1929.
7. Pfeiffer, H., Der isoelektrische Punkt (IEP) von Protoplasten und seine Ermittlung. In: E. Abderhalden, Handb. biol. Arbeitsmeth., (V), 2½: 1563-1596 (1929).
8. — Kleine Beiträge zur Bestimmung des IEP von Protoplasten III, Protoplasma 14: 83-90 (1931).
9. — Über die Plasmorrhysse nackter Protoplasten in hypertonen Medien I, Cytologia 3: 26-35 (1931).
10. — Der neue Universal-Vertikalilluminator „Univertor“ der E. Busch A.-G., Z. wiss. Mikrosk. 49: 103-107 (1932).
11. — Zur Technik der CO₂-Umströmung lebender Zellen und Gewebe, ibid. 49: 208-216 (1932).
12. — Die Plasm- und Karyoskopie im auffallenden Lichte in ihrer Bedeutung für die botanische Cytologie und Protoplasmaforschung, Verhdl. Dtsch. Bot. Ges.—Berlin 1932, ausführlich in: Protoplasma 17: 558-570 (1933).

13. **Schade, H., und Weiler, L.,** Beiträge zur Kenntnis des Protoplasmaverhaltens menschlicher Zellen bei physiko-chemischer Beeinflussung, *Protoplasma* 3: 43–67 (1928).
 14. **Vonwiller, P.,** Histologische Methoden und Ergebnisse der Mikroskopie im auffallenden Lichte. In: **E. Abderhalden, Handb. biol. Arbeitsmeth.,** (V), 2: 1033–1054 (1927).
 15. — **Lebenduntersuchungen im auffallenden Lichte.** In: **T. Péterfi, Meth. wiss. Biol.** 1: 460–474 (1928).
 16. — und **Vannotti, A.,** Die Capillarskopie mit starken Vergrößerungen. In: **E. Abderhalden, Handb. biol. Arbeitsmeth.,** (V), 2/2: 1529–1562 (1929).
 17. — — **Neue Wege der Gewebelehre IV,** *Z. Anat. u. Entw.gesch.* 95: 512–530 (1931).
 18. **Weber, Fr.,** Plasmolyse-Zeit-Methode, *Protoplasma* 5: 622–624 (1929).
-