

DAS VERHALTEN DER BLATTZELLEN
VON *HALOPHILA STIPULACEA* GEGEN
VITALFLUOROCHROME

v o n

TH. DIANNELIDIS, I. TSEKOS und S. HARITONIDIS

DAS VERHALTEN DER BLATTZELLEN
VON *HALOPHILA STIPULACEA* GEGEN
VITALFLUOROCROME

V O N

TH. DIANNELIDIS, I. TSEKOS und S. HARITONIDIS

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Thessaloniki)

EINLEITUNG

LILIENSTERN (1935), RUGE (1940), STRUGGER (1949) und PERNER (1949/50) beobachteten an *Helodea* - Arten Färbegradienten mit kationischen und anionischen Farbstoffen. Mit kationischen Farbstoffen färbte sich elektiv die Dauerzone, während mit anionischen Farbstoffen die Streckungs- und Meristemzone. Nach PERNER (1949/50) soll das vorgenannte Verhalten auf dem jeweiligen elektrischen Zustand des Zytoplasmas und des Zellsaftes der Zellen von Dauer-, Streckungs- und Meristemzone beruhen.

DIANNELIDIS (1963) beobachtete an *Halophila* - Blatt mit Neutralrot eine Nichtfärbbarkeit der Basalzellen einerseits und ein Mosaikbild in den Zellen des Blattstiels andererseits und vermutet, daß dieses Verhalten auf dem physiologischen Zustand, der Permeabilität und der elektrischen Ladung der Zelle beruhen muß.

DIANNELIDIS (1963) wies nach Vitalfärbung mit kationischen Hellfeldfarbstoffen den «vollen» Charakter der Zellsäfte von *Halophila stipulacea* nach und zwar aus der Vitalfarbreaktion (KANZEL und BOLAY 1961) kam zu dem Schluß, daß die Zellsäfte von *Halophila stipulacea* eines «flavonoiden» Charakters sein dürften. Mit Pyronin konnte DIANNELIDIS (1963) eine Vitalfärbung nur der Rippenzellen erst nach längerer Zeit (5 Tage) erzielen und mit den anderen kationischen Farbstoffen brauchte er eine Färbezeit von mehr als 20 Min.

Halophila stipulacea stellt ein günstiges Objekt für protoplasmatische Untersuchungen dar (DIANNELIDIS 1951). Sie besitzt ähnliche Blattstruktur zu den *Helodea* - Arten — anatomisch betrachtet —, und im Gegensatz zu diesen befindet sich unter marinen Lebensverhältnissen.

Die Fluorochromfärbung ist heute die leistungsfähigste Form der Vitalfärbung. Sie hat große methodische Vorteile vor der Hellfeldfärbung. Da sie im UV - Licht schon bei starker Verdünnung sichtbar wird, kann man mit so niedrigen Konzentrationen oder Färbezeiten arbeiten, daß die lebenden Zellen ganz oder fast ganz ungeschädigt bleiben. Vor allem bringt der chemisch einheitliche Farbstoff verschiedene Teile der Zelle oder des Gewebes zum Leuchten in verschiedenen Farben, und solche Fluoreszenz - Metachromasie ist meist bunter, farbenprächtiger, kontrastreicher als die mit Hellfeldfarbstoffen (Diachromen) bewirkte.

Aus den obengenannten Gründen sind wir zu der vorliegenden Arbeit angeregt.

Im Folgenden wurden dieselben Ausdrücke, wie bei den Arbeiten von DIANNELIDIS (1951, 1963) verwendet.

Die Untersuchung wurde im Botanischen Institut der Universität Thessaloniki durchgeführt. Das Material wurde aus einer Tiefe von 8 bis 10 m in Rhodos¹ gesammelt und an demselben Tage mit dem Flugzeug nach Thessaloniki gebracht.

Die Färbeweise war die übliche (DIANNELIDIS 1951, 1963, TSEKOS 1965, 1967). Die angewandten Farbstoffkonzentrationen waren immer 1/10.000. Die Lebenstätigkeit der Zellen konnte durch die Plasmaströmung in den hyalin durchsichtigen Blattzähnen und durch Plasmolyse mit 2fach konzentriertem Seewasser oder mit 2 Mol./Liter Glycerin- und Harnstofflösung in Seewasser kontrolliert werden.

Als Fluoreszenzmikroskop stand das Photomikroskop der Firma C. Zeiss (Oberkochen) zur Verfügung. Als Erregerfilter dienten BG 12 und BG 38 und als Ocularsperrfilter die durch die Nummern 50 und 53 bezeichneten Filter. Die Absorptionsspektren sind mit PMQ II (C. Zeiss) aufgenommen worden.

Als Farbstoffe wurden die kationischen Farbstoffe Neutralrot, Rhodamin B der Firma Gröbler, Akridinorange, Nilblauschlorid Toluidinblau O, Brillantkresylblau der Firma Merck, Auramin O und Pyronin der Firma Chroma verwendet.

I. FÄRBEVERSUCHE

1. *Akridinorange*

Junge Blätter (20 min. Färbezeit, pH 8,4): Alle Blattzellen weisen

1. Dem Direktor der Station des Ozeanographischen Instituts in Rhodos, Herrn Dr. M. IOANNOU und seinen Mitarbeitern danken wir herzlich für die Hilfe bei der Sammlung des Materials.

eine homogene Grünfluoreszenz auf. Nur bei einigen Blatzzähnen und Randzellen bestehen zweierlei Entmischungstropfen. Entmischungstropfen, die gelbbraun gefärbt sind und kupferrot fluoreszieren und solche, die einen sehr schwachen gelben Farbton zeigen und gelbgrün bis gelb fluoreszieren. Meistens bestehen nebeneinander homogene Grünfluoreszenz und Entmischungstropfen.

In der Nähe von geschädigten Stellen zeigen die Zellen immer rot fluoreszierende Entmischungstropfen. Die Chloroplasten sammeln sich um den Zellkern (Systrophe) und sind dunkel im Fluoreszenzlicht.

Ausgewachsene Blätter: An der Blattbasis tritt eine Mosaikfärbung auf; einige Zellen zeigen Zellsaftfärbung, während die übrigen ungefärbt bleiben. Alle Zellen der apikalen Zone weisen Zellsaftfärbung auf. Die Chloroplasten der apikalen Zone sind dunkel, während die der basalen Zone eine blutrote Fluoreszenz aufweisen.

Bei längerer Färbedauer (8 Std.) zeigen sowohl die jungen als auch die alten Zellen gelbbraun gefärbte Entmischungstropfen, die kupferrot fluorochromieren. Bei zahlreichen Feldzellen bestehen nebeneinander homogene Grünfluoreszenz und Entmischungstropfen. Am Blattstiel besteht eine Ausnahme; einige Zellen haben Entmischungstropfen, die übrigen homogene Grünfluoreszenz. Es ist Grünfluoreszenz der Zellkerne einiger Randzellen und Blatzzähne zu beobachten.

NH₄OH - Reaktion: Wenn man NH₄OH (n/200) auf mit Akridinorange gefärbte Zellen einwirken läßt, dann verschwindet die homogene Grünfluoreszenz und die Entmischungstropfen wandeln sich in geschichtete Kugeln. Jetzt fluoreszieren die Entmischungskugeln schwach. Augenblicklich tritt eine intensive, grüne Zytoplasma- und Zellkern-Fluorochromierung auf.

2. Neutralrot

Junge und alte Blätter: Nach einer 35 min. Färbezeit kommen rotviolett gefärbte Entmischungstropfen und eine diffuse auch rotviolette Zellsaftfärbung vor. Die Basalzellen färben sich nicht. Am Blattstiel herrscht ein Mosaikbild; es gibt diffus gefärbte Zellen, Zellen mit Entmischungstropfen und ungefärbte Zellen. Die diffus gefärbten Zellen fluoreszieren rot. Die hellrotviolett gefärbten Entmischungstropfen weisen eine rote Fluoreszenz auf, die dunkelrotviolett gefärbten sind dunkel.

Nach einer 160 min. Färbezeit zeigen die Blatzzähne und die Mittelrippenzellen gleichzeitig Entmischungstropfen und diffuse Färbung. Die in der Nähe der Mittelrippe liegenden Feldzellen weisen die stärkste diffuse Zellsaftfärbung in Vergleich zu den übrigen Blattzellen auf. Die

an der Basis liegenden Feldzellen färben sich nicht. Der Blattstiel zeigt dasselbe Verhalten wie vorher.

Nach einem längeren Aufenthalt in der Farblösung (17 1/2 Std.) zeigen alle Zellen rot gefärbte Entmischungstropfen. Die Blattzähne, und einige Rand- und Feldzellen, die am Rand des Blattes liegen, weisen Sphaerokristalle auf (vgl. KINZEL und BOLAY 1961). Diffuse Färbung mit gleichzeitigem Vorkommen von Entmischungstropfen besteht nur in den Mittelrippenzellen. Merkwürdigerweise färben sich bei einem Blatt die Stielzellen nicht. Die diffus gefärbten Zellsäfte leuchten rot, während die Entmischungstropfen und die Sphaerokristalle im Fluoreszenzlicht dunkel sind. Die Zellwände fluoreszieren braungelb. Die Kutikula weist eine schwache goldbraune Fluoreszenz auf.

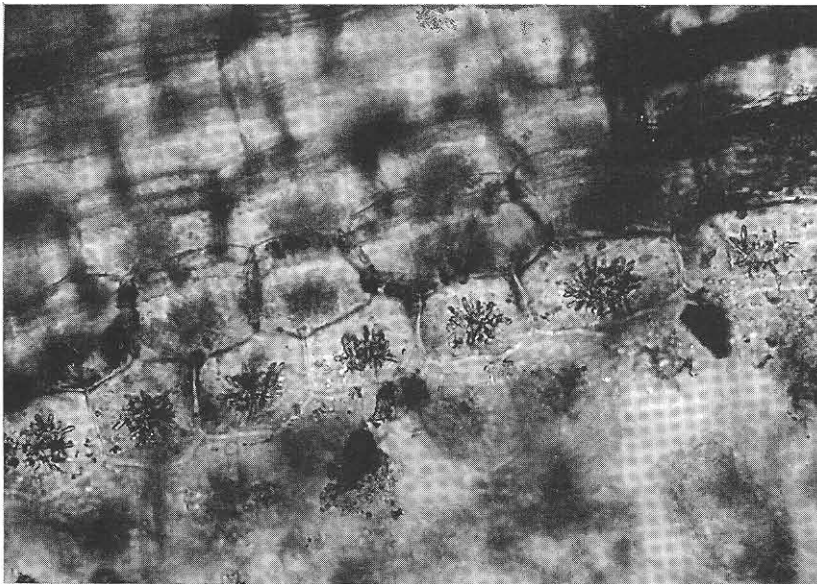
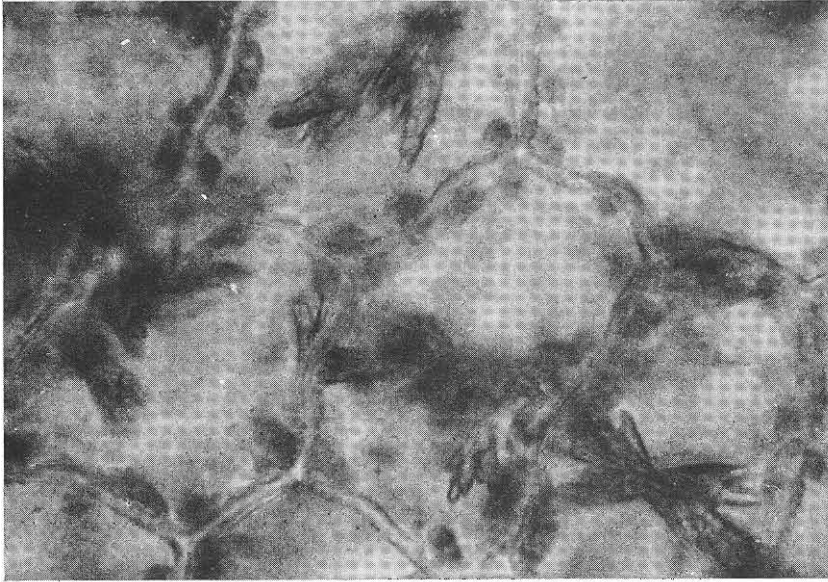
NH₄OH - Reaktion: Die Entmischungstropfen werden augenblicklich aufgelöst und es entsteht eine diffuse Färbung. Gleichzeitig kommt eine intensive goldgelbe Fluoreszenz des Plasmas und des Zellkernes und eine gelbbraune der Zellwand vor. Die gelbbraune Zellwand - Fluorochromierung ist hauptsächlich in den Randzellen und in der Nähe zu diesen liegenden Feldzellen deutlich zu beobachten. Wenn man reines Seewasser im Präparat durchsaugt, findet die entgegengesetzte Erscheinung statt. D.h. die diffuse Zellsaftfärbung nimmt stark ab bis zum völligen Verschwinden, während gleichzeitig in jedem Zellsaft zahlreiche Entmischungstropfen entstehen, die sich allmählich vergrößern. Die Zellwand - Fluorochromierung bleibt unveränderlich.

3. Auramin O

Junge Blätter (75 min. Färbezeit): Bei allen Blattzellen kommen Entmischungstropfen mit intensiver goldgrünlichlicher Fluoreszenz vor. In gewissen Blattzähne und Randzellen ist eine homogene olivgrüne Fluoreszenz zu erkennen, während die inneren Blattzellen, wenn sie fluoreszieren, homogene goldgelbe Fluoreszenz aufweisen. Bei zahlreichen Zellen bestehen nebeneinander homogene Fluoreszenz und Entmischungstropfen. Die Mittelrippenzellen zeigen immer Entmischungstropfen.

Mittelalte Blätter (14 Std. Färbezeit): In allen Blattzellen, ohne Ausnahme, sind stark gelbgefärbte Entmischungstropfen mit einer grellen, goldgelben Fluoreszenz zu sehen. Bei manchen Blattzähnen wurde Grünfluoreszenz der Zellkerne beobachtet. Die Chloroplasten fluoreszieren blutrot. Die Protoplasmaströmung der Blattzähne ist verzögert. Die Kutikula ist grün gefärbt.

Ausgewachsene Blätter (25 min. Färbezeit): Nur bei den Blattzäh-



ΑΒΒ. 1 UND 2. *Halophila stipulacea*: Blatt. Grünlicher Niederschlag in Form von Kristallbündeln nach Einwirkung mit gesättigter, wässriger $Ba(OH)_2$ - Lösung.

nen und bei manchen an diese grenzende Zellen erscheint eine homogene braungelbe Fluoreszenz, während im Hellfeld keine Färbung zu beobachten ist.

NH₄OH - Reaktion: Die goldgelbe bzw. goldgelbgrünliche Fluoreszenz der Entmischungstropfen verschwindet und eine intensive grüngelbe Zellkern- und Plasmafluoreszenz kommt vor.

4. *Rhodamin B*

Junge Blätter (2¹/₂ Std. Färbezeit): Es ist keine Färbung festzustellen. Im Fluoreszenzlicht ist eine homogene braungelbe Zellsaft-Fluoreszenz der Blattzähne und der Randzellen zu sehen, die abnimmt, wenn man vom Rand zu der Mittelrippenzone übergeht. Goldgelbe Plasma-, Zellkern- und Chondriosomen-Fluoreszenz der Blattzähne. Die Chloroplasten bleiben dunkel.

Nur nach einem längeren Aufenthalt in der Farblösung (40 Std.) konnte eine schwache rotviolette Zellsaftfärbung und eine intensive homogene goldbraune Fluoreszenz beobachtet werden. Dieses Verhalten beruht sehr wahrscheinlich auf dem physiologischen Zustand, der Permeabilität und der elektrischen Ladung der Zellen, was einen Einfluß auf die Schwankung der Speicherungsfähigkeit der Zellen haben soll (WEBER 1930, STRUGGER 1949, DIANNELIDIS 1963).

Ausgewachsene Blätter (50 min. Färbezeit): Keine Färbung. Im Fluoreszenzlicht besteht eine homogene braune bis braungelbe Zellsaftfluoreszenz. Diese Fluoreszenz ist nur in den Zellsäften der Blattzähne, der Randzellen und in jenen Feldzellen, die in der Nähe von Randzellen liegen, zu beobachten. Goldgelbe Chondriosomen-Fluoreszenz der Blattzähne, wo die Plasmaströmung sehr deutlich in Erscheinung tritt, während die Sphärosomen fluoreszenzfrei sind. Die Kutikula fluoresziert goldgelb, die Zellwände sind dunkel.

5. *Pyronin*

Junge und alte Blätter: Nach einem kurzen Aufenthalt in der Farblösung wurde keine Färbung oder Fluoreszenz beobachtet. Nur nach einer längeren Färbezeit (40 Std.) erscheint in den Blattzähnen eine homogene braune Zellsaftfluoreszenz ohne Einfluß auf die Vitalität der Zellen, wie aus der Plasmaströmung hervorgeht.

6. *Nilblauchlorid*

Nach einer 50 min. Färbezeit wurden blaugrüne Entmischungstropfen in den Blattzähnen, den Randzellen und in manchen Mittelrippen-

zellen beobachtet. Die übrigen Blattzellen bleiben ungefärbt. Bei den Blattzähnen sind blaugüne Entmischungstropfen innerhalb des Plasmas zu erkennen. Sie werden in der Strömung des Protoplasmas verschleppt.

Nach einer 15 ½ Std. Färbezeit erscheinen in allen Zellen der jungen Blätter, außer manchen Basalzellen, blaugüne bis himmelblaue Entmischungstropfen. In ausgewachsenen Blättern weist der Stiel gefärbte und nicht gefärbte Zellen auf (Mosaikfärbung). Bei einigen Randzellen besteht diffuse himmelblaue Zellsaftfärbung. An den Blattzähnen sind die Entmischungstropfen schwarzblau. Eine Wässerung (30 Std.) der gefärbten Blätter hat die Änderung des Farbtones der Tropfen vom Schwarzblau zum Grünblau zur Folge.

NH₄OH - Reaktion: Die Entmischungstropfen werden verkleinert, eine diffuse himmelblaue Zellsaftfärbung beginnt vorzukommen, die eine schwache grüngraue Fluoreszenz zeigt. Wenn man reines Seewasser im Präparat durchsaugt, treten eine diffuse Färbung und zahlreiche Entmischungstropfen in jedem Zellsaft in Erscheinung; am Anfang waren eine oder zwei große Entmischungstropfen in jedem Zellsaft zu sehen.

II. HISTOCHEMISCHE VERSUCHE

Es wurden alle mikrochemischen Reaktionen zum Nachweis von Flavonolen und Gerbstoffen verwendet (vgl. auch BOLAY 1960, TSEKOS 1967), wie aus der Tabelle 1 hervorgeht.

Tab. 1. Ergebnisse aus den histochemischen Versuchen

<i>Reagentien</i>	<i>Blattzellen</i>
Ammoniak	—
Bariumhydroxyd	Kristallbündel (grünlich gefärbt)
Eisenchlorid (III)	—
Ammonmolybdat	—
Natriumwolframat	—
p - Dimethylaminobenzaldehyd	—
Koffein	—
Vanillin - Salzsäure	rotviolette Färbung
Vanillin - Schwefelsäure	—

Man erreicht positive Ergebnisse beim Einfluß von gesättigter,

wäßriger Bariumhydroxyd - Lösung. Wie aus den Abb. 1 und 2 zu entnehmen ist, entsteht ein grünlicher Niederschlag von Kristallbündeln.

Bariumhydroxyd ist nach DE STEVENS und NORD (1955 und die dort angegebene Literatur) ein Reagens auf Kaffeesäure. Hier soll Kaffeesäure oder nahe verwandte Verbindungen vorliegen (ROSENTHALER 1937). Positive Ergebnisse gibt auch Vanillin - Salzsäure (Tabelle 1). Diese Reaktion sei aber ganz allgemein den Phenolen und Ketonen zuzuschreiben (vgl. BOLAY 1960 und die dort angegebene Literatur). Es ist nicht auszuschließen, daß hier noch farblose Pseudobasen der Anthocyanine und der Flavonoglycosite, wie bei einigen submersen Wasserpflanzen der Fall ist (REZNIK und NEUHÄUSEL 1959), vorhanden sind.

III. ABSORPTIONSSPEKTREN

Die Absorptionsspektren der Farbstoffe Akridinorange, Brillantkresylblau, Toluidinblau und Neutralrot in dest. Wasser und in Kaffeesäure - Lösung (in dest. Wasser) sind aufgenommen worden (Abb. 3).

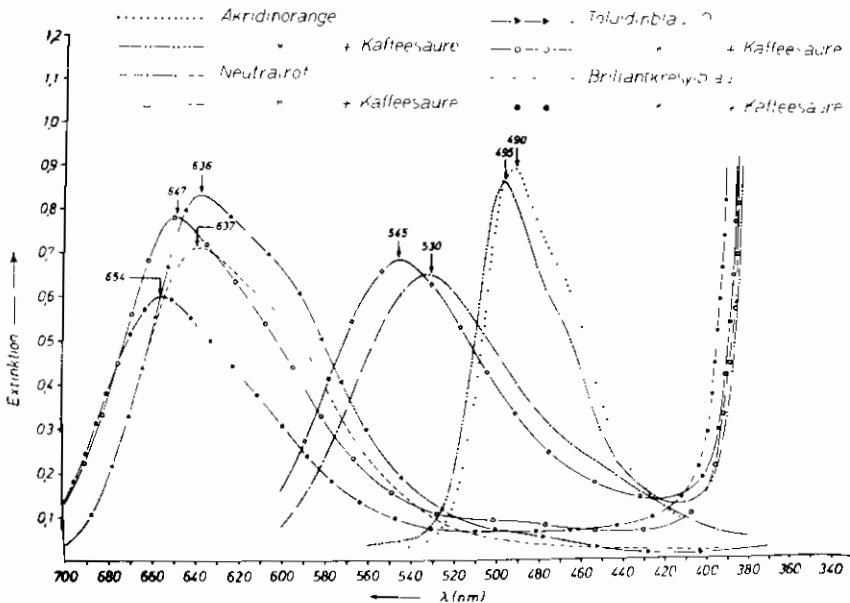


ABB. 3. Absorptionsspektren einiger kationischen Farbstoffe in dest. Wasser und in wäßriger Kaffeesäure - Lösung (in beiden Fällen Farbstoffkonzentration 1/200.000).

Bei allen Farbstoffen in der Kaffeesäure - Lösung verschiebt sich das

Absorptionsmaximum nach dem langwelligen Spektralbereich (V-Bande, negative Metachromasie; vgl. KINZEL 1960, TSEKOS 1969).

Die Tatsache, daß die Lage der Absorptionsmaxima in Kaffeesäure-Lösung unabhängig vom pH-Wert ist, deutet darauf hin, daß eine Komplexbildung zwischen den kationischen Farbstoffen und der Kaffeesäure vorliegt.

IV. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die Farbtöne der homogenen Zellsaftfluoreszenz nach Vitalfärbung mit den angewandten Farbstoffen

Akridinorange	: grün
Neutralrot	: rot
Auramin O	: braungelb, olivgrün, goldgelb
Rhodamin B	: braun, braungelb
Pyronin	: braun

entsprechen der negativen Metachromasie (HÖFLER 1947, 1948, STRUGGER 1949, TOTH 1952, HÖFLER und SCHINDLER 1955, BURIAN 1962, TSEKOS 1967). D.h. sie deuten auf die Entstehung einer Komplexbildung zwischen den kationischen Farbstoffen und gewissen Vakuolensubstanzen hin. Die Fluoreszenzfarben der Entmischungstropfen (grün bis grüngelb mit Akridinorange, rot mit Neutralrot, goldgelbgrün mit Auramin O) sollen auch auf einer salzartigen Komplexbildung zwischen den Farbkationen und zelleigenen Substanzen beruhen. Vielmals bestehen aber noch andere Fluoreszenzfarben der Entmischungstropfen (z. B. kupferrot mit Akridinorange, grell goldgelb mit Auramin O, keine Fluoreszenz mit Neutralrot). Aus den vorgenannten Farbtönen geht hervor, daß an der Oberfläche der Entmischungstropfen, die eine Komplexbildung darstellen, sekundär Farbkationen der kationischen Farbstoffen adsorbiert worden sind. Deswegen sind die Fluoreszenzfarben des Komplexes mit denen der adsorbierten Farbkationen bedeckt.

Die Behandlung der gefärbten Blätter mit verdünnter Ammoniaklösung (n/200) zeigt deutlich, daß die letztgenannte Erscheinung tatsächlich stattfindet. Die Entmischungstropfen werden aufgelöst oder wandeln sich in geschichtete Kugeln um, die nun ganz schwach fluoreszieren (z. B. Akridinorange, Auramin O); das Plasma und die Zellkerne beginnen intensiv zu fluoreszieren (grün mit Akridinorange, goldgelb mit Neutralrot, grün bis grüngelb mit Auramin O), während der Zellsaft eine diffuse Färbung aufweist. Verdünnte Ammoniaklösungen permeie-

ren sehr leicht durch das lebende Plasma, ohne daß die Zellen getötet werden. So werden die vordem sauren Zellsäfte alkalisch und die eingefangenen wasserlöslichen, lipophoben Kationen wandeln sich in permeierfähige, lipophile Moleküle, die rapid exosmieren können und vom Plasma und Zellkern werden sie nach dem Lipoidlöslichkeitmechanismus angereichert.

Die Ammoniaklösung übt keinen Einfluß auf die Komplexbildung aus, sondern auf den Färbungsbilder. Wenn man die mit Ammoniaklösung behandelten Präparate in reinem Seewasser nachbadet, so erhält man folgendes: Die Plasma- und Zellkernfluoreszenz wird erloscht, die Entmischungstropfen kommen wieder vor. Dieses Phänomen ist reversibel. Die bisherigen physikalisch-chemischen Angaben gestatten uns keine direkten Schlüsse über diese Erscheinungen zu ziehen (vgl. auch KINZEL und BOLAY 1961).

Die histochemischen Untersuchungen und die spektralphotometrischen Messungen deuten auf das Vorhandensein von Kaffeesäure oder zu ihr nahe verwandte Verbindungen (Zimtsäurederivate) in den Vakuolen der Blattzellen von *Halophila stipulacea* hin, die für den «vollen» Charakter des Zellsaftes verantwortlich sind. Es ist nicht auszuschließen, daß auch Flavonglykoside in den Vakuolen von *Halophila stipulacea* bestehen können. Die gewonnenen Absorptionskurven der Farbstofflösungen in Kaffeesäure stimmen mit dem Verhalten der Zellsäfte von *Halophila stipulacea* gegen kationische Farbstoffe völlig überein.

Aus dem oben Dargestellten geht hervor, daß die Speicherstoffe¹ von *Halophila stipulacea* ganz allgemein gehören zu der Flavonglykoside - Gerbstoffgruppe, im Gegensatz zu denen der Rhodophyceen (TSEKOS 1965, 1968a,b).

Dies ist in bester Übereinstimmung mit den Angaben einerseits von KINZEL (1959), BOCK (1964) und TSEKOS (1969), die in Modellversuchen gezeigt haben, daß die zur negativen Metachromasie verantwortlichen Substanzen phenolische OH-Gruppen tragen, andererseits von DRAWERT (1956, S. 277); er hebt hervor, daß eine Anreicherung auf Grund chemischer Bindung wohl besonders für die kationischen Farbstoffe beim Vorliegen von Phenolabkömmlingen im Zellsaft zutrifft.

Aus den angeführten Versuchen geht hervor, daß bei *Halophila stipulacea* keine elektive Färbung mit den kationischen Farbstoffen besteht, wie sie ausgesprochen mit dem Alter in den Blattzellen von

1. Die Kaffeesäure stellt eine Vorstufe von Quercetin dar (Rauen 1964).

Helodea verkommt (STRUGGER 1934, 1949, PERNER 1949/50, KINZEL und PISCHINGER 1962). Das unterschiedliche Verhalten zwischen den Blattzellen von *Helodea* und *Halophila* gegen Vitalfarbstoffe soll, abgesehen von Permeabilitätshemmungen im Protoplasma und in der Zellwand (STRUGGER 1934, 1949, GUNDERMANN, WERGIN und HESS 1937, DRAWERT 1938, PERNER 1949/50), erstens auf dem Vorkommen oder nicht im Zellsaft farbstoffbindender Substanzen und zweitens auf dem pH - Wert des Zellsaftes beruhen.

Die Tatsache, daß sich sowohl bei den jungen als auch bei den ausgewachsenen Blättern von *Halophila stipulacea* alle Zellsäfte des Blattes mit Akridinorange und Auramin O ohne Ausnahme färben, muß auf dem Vorliegen von Speicherstoffen in allen Zellsäften des Blattes zurückgeführt werden, d.h. auf seinen vollen Charakter.

Das Ausbleiben einer Färbung in den Zellen von *Halophila stipulacea* mit Neutralrot, Rhodamin B und Pyronin (DIANNELIDIS 1963) bedeutet nicht, daß sie für diese Farbstoffe impermeabel sein müssen, sondern, daß die Farbstoffkonzentration sehr niedrig ist und deshalb nicht sichtbar (KINZEL 1954, KINZEL und PISCHINGER 1962). Daß diese Auffassung richtig ist, ergibt sich aus der Tatsache, daß dort, wo keine Färbung mit Akridinorange, Rhodamin B und Pyronin (DIANNELIDIS 1963) unter dem Tageslichtmikroskop beobachtet wurde, eine Fluoreszenz unter dem Fluoreszenzmikroskop zu erkennen ist.

Das unterschiedliche Verhalten mancher Zellen des Blattes von *Halophila stipulacea* muß auf Permeabilitätshemmungen zurückgeführt werden, die einerseits auf dem lebenden Protoplasma und andererseits auf der Zellwand, der Kutikula sowie auch auf der Schwankung der Menge von Speicherstoffen beruhen.

Nach Nilblaulchlorid - Färbung treten Entmischungstropfen im Zytoplasma auf, was darauf hindeutet, daß Speicherstoffe nicht nur in den Zellsäften, sondern auch innerhalb des Plasmas vorhanden sind (vgl. HÖFLER 1961, TSEKOS 1967); die Speicherstoffe innerhalb des Plasmas sind sehr wahrscheinlich dergleichen Kategorie wie die Speicherstoffe der Zellsäfte, d.h. es handelt sich um Zimtsäurederivate (vgl. BLANK 1958, S. 320).

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde das Verhalten der Blattzellen von *Halophila stipulacea* sowohl gegen kationische Vitalfluorochrome als auch gegen verschiedene Reagentien untersucht.

1) Die Fluoreszenzfarben der Zellsäfte (grün mit Akridinorange, rot mit Neutralrot, braungelb, olivgrün oder goldgelb mit Auramin O, braun oder braungelb mit Rhodamin B und braun mit Pylonin) deuten auf ihren «vollen» Charakter hin, was mit den Angaben von DIANNELIDIS (1963) übereinstimmt.

2) Das Auftreten grünen Niederschlags in Form von Kristallbündeln bei allen Zellsäften der Blattzellen von *Halophila stipulacea* nach Einwirkung gesättigter, wäßriger $Ba(OH)_2$ -Lösung beruht sehr wahrscheinlich auf dem Vorliegen von Zimtsäurederivaten, die für den «vollen» Charakter der Zellsäfte verantwortlich sind.

3) Aus den Absorptionsspektren der untersuchten kationischen Farbstoffe in Kaffeesäure geht hervor, daß die Kaffeesäure eine negative Metachromasie bedingt, was mit den Versuchen *in vivo* in bester Übereinstimmung steht.

4) Die Fluoreszenzfarben des Zytoplasmas und der Zellkerne (grün mit Akridinorange, goldgelb mit Neutralrot, grün oder grüngelb mit Auramin O) sind damit zu erklären, daß die lipoidlöslichen Farbbasemoleküle der untersuchten Vitalfluorochrome in den Plasma- und Zellkernlipoiden angereichert sind.

5) Das Auftreten von Entmischungstropfen im Plasmaraum deutet auf das Vorhandensein von Zimtsäurederivaten innerhalb des Plasmas hin.

6) Im Gegensatz zu den Rhodophyceen und in Übereinstimmung mit den Landanthophyten enthält *Halophila stipulacea* Speicherstoffe, die zu der Flavonglykosite - Gerbstoffgruppe gehören.

ΠΕΡΙΛΗΨΙΣ

Ἐρευνηθήη ἡ συμπεριφορὰ τῶν κυττάρων τῶν φύλλων τῆς *Halophila stipulacea* τόσον ἔναντι vital κατιονικῶν φθοριζουσῶν χρωστικῶν οὐσιῶν ὅσον καὶ ἔναντι διαφόρων χημικῶν ἀντιδραστηρίων διὰ τὸν ἐντοπισμὸν καὶ ἀνεύρεσιν τῶν ἀποταμειυτικῶν οὐσιῶν τῶν χυμοτοπίων. Εὐρέθησαν τὰ ἀκόλουθα:

1) Τὰ χρώματα φθορισμοῦ τῶν χυμοτοπίων (πράσινον μὲ τὸ πορτοκαλλόχρουν ἀκριδίνης, ἐρυθρὸν μὲ τὸ οὐδέτερον ἐρυθρὸν, φαιοκίτρινον μὲ τὴν ραδαμίνην Β καὶ φαιὸν μὲ τὴν πυρονίνην) δηλοῦν τὸν «πλήρη» χαρακτῆρα αὐτῶν, πρᾶγμα τὸ ὁποῖον συμφωνεῖ ἀπολύτως πρὸς τὰ δεδομένα τοῦ DIANNELIDIS (1963).

2) Ἡ ἐμφάνισις δεσμίδων ὑποπρασίνων κρυστάλλων εἰς ἅπαντα τὰ χυμοτοπία τῶν κυττάρων τῶν φύλλων τῆς *Halophila stipulacea* κατὸ πιν ἐπιδράσεως κεκαρεσμένου διαλύματος Βα(OH)₂ κατὰ πᾶσαν πιθανότητα ὀφείλεται εἰς τὴν ὑπαρξίν παραγῶγων κινναμωμικοῦ ὀξέος (καφεϊκὸν ὀξύ, χλωρογενικὸν ὀξύ), τὰ ὁποῖα εἶναι ὑπεύθυνα διὰ τὸν «πλήρη» χαρακτῆρα τῶν χυμοτοπίων.

3) Τὸ καφεϊκὸν ὀξύ, ὡς δεικνύεται ἐκ φασμάτων ἀπορροφήσεως μιγμάτων αὐτοῦ μετὰ κατιονικῶν χρωστικῶν οὐσιῶν, ὀρίζει ἀρνητικὴν μεταχρωμασίαν. Ἡ συμπεριφορὰ αὕτη εἶναι ὁμοία πρὸς τὴν συμπεριφορὰν τῶν χυμοτοπίων τῆς *Halophila stipulacea* ἔναντι τῶν κατιονικῶν φθοριζουσῶν χρωστικῶν οὐσιῶν.

4) Τὰ χρώματα φθορισμοῦ τοῦ πλάσματος καὶ τῶν πυρήνων (πράσινον μὲ τὸ πορτοκαλλόχρουν ἀκριδίνης, χρυσοκίτρινον μὲ τὸ οὐδέτερον ἐρυθρὸν, πράσινον ἕως πρασινοκίτρινον μὲ τὴν ἀουραμίνην 0) δηλοῦν τὴν ἀποταμίευσιν τῶν λιποφίλων μορίων τῶν ἐν λόγῳ χρωστικῶν οὐσιῶν ὑπὸ τῶν λιποειδῶν τοῦ πλάσματος καὶ τῶν πυρήνων.

5) Ἡ ἐμφάνισις ἀπομεικτικῶν σταγόνων ἐντὸς τοῦ κυτοπλάσματος δηλοῖ τὴν ὑπαρξίν παραγῶγων κινναμωμικοῦ ὀξέος ἐντὸς αὐτοῦ.

6) Ἐν ἀντιθέσει πρὸς τὰ Ροδοφύκη καὶ ἐν συμφωνίᾳ πρὸς τὰ χερσαία ἀνόφυτα ἡ *Halophila stipulacea* περιέχει ἀποταμειυτικὰς οὐσίας, αἱ ὁποῖαι ἀνήκουν εἰς τὴν ὁμάδα τῶν φλαβονογλυκοζιτῶν — δεψικῶν οὐσιῶν.

L I T E R A T U R

- BLANK, F., 1958: Anthocyanins, flavones, xanthenes. In Handbuch der Pflanzenphysiologie X; 300.
- BOCK, U., 1964: Untersuchungen zum Mechanismus der Vakuolenfärbung pflanzlicher Zellen mit basischen Farbstoffen. Flora. 154,99.
- BOLAY, E., 1960: Die Vitalfärbung voller Zellsäfte und ihre cytochemische Interpretation. S. ber. Öst. Akad. Wiss. math.-naturw. Kl. Abt. I, 169, 271.
- BURIAN, K., 1962: Vitalfärbungen an Epidermiszellen von *Platanthera bifolia* mit Tolnidinblau und Pyronin. Protoplasma 55, 156.
- DE STEVENS UND F. NORD., 1955: Natural Phenylpropane Derivatives. In «Moderne Methoden der Pflanzenanalyse» hrsg. v. Paech und Tracey, Springer-Verlag, Bd. III.
- DIANNELIDIS, TH., 1951: Zur protoplasmatischen Anatomie des Blattes von *Halophila stipulacea*. Phytion 3, 29.
- , 1963: Das Verhalten der Blattzellen von *Halophila stipulacea* gegen basische Hellfeldfarbstoffe. Protoplasma 57, 260.
- DRAWERT, H., 1938: Protoplasmatische Anatomie des fixierten *Helodea*-Blattes. Protoplasma 29, 206.
- , 1956: Die Aufnahme der Farbstoffe. Vitalfärbung. In «Handbuch der Pflanzenphysiologie» (hrsg. v. W. Ruhland).
- GUNDERMANN, J., W. WERGIN UND K. HESS, 1937: Über die Natur und das Vorkommen der Primärsäure in den Zellwänden der pflanzlichen Gewebe. Ber. dtsh. chem. Ges. 70. 517.
- HÖFLER, K., 1947: Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Permeabilität und Stoffspeicherung? Mikroskopie 2, 13.
- HÖFLER, K., 1948: Einige Nekrosen bei Färbung mit Akridinorange. S. ber. Öst. Akad. Wiss., math.-naturw. Kl., Abt. I, 156, 585.
- , 1961: Vitalfärbestudien an Florideen. Pubbl. staz. Zool. Napoli 32, 109.
- , UND H. SCHINDER, 1955: Volle und leere Zellsäfte bei Algen. Protoplasma 45,173.
- KINZEL, H., 1959: Metachromatische Eigenschaften basischer Vitalfarbstoffe (Eine Studie zum cytochemischen Aspekt der Vitalfärbung). Protoplasma 50, 1.
- , UND E. BOLAY, 1961: Über die diagnostische Bedeutung der Entmischungs- und Fällungsformen bei Vitalfärbung von Pflanzenzellen. Protoplasma, 54, 179.
- , UND I. PISCHINGER, 1962: Vitalfärbversuche zur Lokalisation sekundärer Inhaltsstoffe bei *Helodea canadensis*. Protoplasma 55, 555.
- LILIENSTERN, M., 1935: Altersunterschiede von Zellen einiger Wasserpflanzen in Bezug auf ihr Reduktionsvermögen. Protoplasma 23, 86.

- PERNER, E. S., 1949 - 50: Die intravitale Fluorochromierung junger Blätter von *Helodea densa*. Protoplasma 39, 400.
- RAUEN, H. M., 1964: Biochemisches Taschenbuch. I. Teil. Springer - Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg.
- REZNIK, H., UND R. NEUHÄUSEL, 1959: Farblose Anthocyanine bei submersen Wasserpflanzen. Z. Bot. 47, 471.
- ROSENTHALER, L., 1937: zit. bei de Stevens und Nord, Natural Phenylpropane Derivatives in «Moderne Methoden der Pflanzenanalyse» hrsg. v. Paech und Tracey, Springer - Verlag 1955.
- RUGE, U., 1940: Kritische zell- und entwicklungsphysiologische Untersuchungen an den Blattzähnen von *Helodea densa*. Flora 34, 311.
- STRUGGER, S., 1934: Beiträge zur Physiologie des Wachstums. I. Zur protoplasmaphysiologischen Kausalanalyse des Streckungswachstums. Jb. wiss. Bot. 79, 406.
- , 1949: Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. 2. Aufl. Springer - Verlag. Berlin - Göttingen - Heidelberg.
- TOTH, A., 1952: Neutralrotfärbung im Fluoreszenzlicht. Protoplasma 41, 103.
- ΤΣΕΚΟΣ, Ι., 1965: Έρευνα διά φθορίζουσών χρωστικών ούσιων επί τινων θαλασσίων Ροδοφυκών. Διατριβή. Θεσσαλονίκη 1965.
- , 1967: Η συμπεριφορά τών κυττάρων τών φύλλων τού *Cotyledon umbilicus L.* έναντι vital βασικών φθορίζουσών χρωστικών ούσιων. Έπισημονική Έπετηρίς τής Φυσικομαθηματικής Σχολής τού Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης X, 107.
- , 1968a: Vital- und Fluoreszenzfarbestudien an Rhodophyceenzellen. Protoplasma 66,241.
- , 1968b: Synärese des Zellsaftes bei *Polysiphonia secunda* (Ag.) Zanard. nach Einwirkung kationischer Vitalfarbstoffe und nach Behandlung mit HCl. Flora, Abt. A, 159, 26.
- , 1969: Mikrospektralphotometrische Untersuchungen zum Speichermechanismus des amploteren Oxazinfarbstoffs Prune pure durch die lebende pflanzliche Zelle. Protoplasma 67, 249.
- WEBER, FR., 1930: Vakuolenkontraktion vital gefärbter *Elodea* - Zellen. Protoplasma 9, 106.