Universität Wien, Institut für Pflanzenphysiologie, Abteilung Zellphysiologie und Protoplasmatik

## Die Plasmolytisch-Volumetrische Methode Höflers Eine kritische Beurteilung

Von G. SCHEBERLE

(Vorgelegt in der Sitzung am 11. Oktober 1990 durch das w. M. K. BURIAN)

## Zusammenfassung

Die von HÖFLER (1918a) ausgeführte Dissertation "Eine Plasmolytisch-Volumetrische Methode zur Bestimmung des Osmotischen Wertes von Pflanzenzellen" wird einer kritischen Untersuchung unterzogen.

Die angestellten Versuche werden nachvollzogen, statistisch ausgewertet und mit den 1918 veröffentlichten Ergebnissen verglichen.

Im Gegensatz zu den 1918 geschilderten Versuchen wird der Zeitpunkt festgestellt, von dem an plasmolytisches Gleichgewicht herrscht, dann die Genauigkeit der plasmolytisch-volumetrischen Methode (PVM) statistisch untersucht.

Verschiedene, von HÖFLER errechnete Formeln zur Ermittlung des Plasmolysegrades werden verglichen.

Der Einfluß des Protoplasmakorrekturfaktors (HÖFLER, 1918a) auf die osmotischen Werte (OW) plasmareicher Zellen wird geprüft.

In den Stufenversuchen wird die "Proportionalität im Grad der Plasmolyse" (HÖFLER, 1918a) untersucht.

Die Ergebnisse werden statistisch ausgewertet (Chi-Quadrat-Test, t-Test, WILCOXON-Test, FRIEDMAN-Test, Test von WILCOX und WILCOXON).

Unter Berücksichtigung des Protoplasmakorrekturfaktors werden die OW zentrifugierter und nicht zentrifugierter Spirogyrazellen verglichen.

Die Ergebnisse HÖFLERs werden eigenen, an Einzelzellen gewonnenen Resultaten gegenübergestellt.

An den Ergebnissen HÖFLERs, nicht aber an der Plasmolytisch-Volumetrischen Methode (PVM) selbst, wird Kritik geübt.

## Einleitung

Vor rund 70 Jahren wurde die Plasmolytisch-Volumetrische Methode von HÖFLER entwickelt und 1918 in den Sitzungsberichten der Österreichischen Akademie der Wissenschaften veröffentlicht. Die dabei abgeleiteten Formeln dienten als Grundlage für zahlreiche weitere Untersuchungen, z. B. für die Berechnung von Wasser- und Stoffpermeabilität pflanzlicher Protoplasten.

Nach der Plasmolytisch-Volumetrischen Methode (PVM) können die osmotischen Werte jener Zellen, deren Zellwand einen definierten geometrischen Körper umschließen, berechnet werden, indem man das Verhältnis zwischen dem Volumen des plasmolysierten Protoplasten – nachdem sich das plasmolytische Gleichgewicht eingestellt hat – und dem Volumen des von der Zellwand umschlossenen Raumes mit der Konzentration des Plasmolytikums, das die Plasmolyse bewirkt hatte, multipliziert.

Mathematisch formuliert:

$$\frac{\mathrm{Vp}}{\mathrm{Vz}} \times \mathrm{C} = \mathrm{O} (1.0)$$

wobei: Vp das Volumen des Protoplasten

Vz das Innenvolumen der Żellwand

C die Konzentration des Plasmolytikums und

O den unbekannten osmotischen Grundwert darstellen.

Für das Verhältnis Vp: Vz führt HÖFLER den Begriff Plasmolysegrad G ein. Dieser läßt sich für zylindrisch geformte Zellen, deren plasmolysierte Protoplasten exakt halbkugelförmigen Menisken entsprechen, nach der folgenden Formel berechnen.



Abb. 1: Bestimmung des Plasmolysegrades (aus HÖFLER, 1920)

Bei Protoplasten, deren Menisken nicht halbkugelförmig sind, muß die Meniskushöhe m mit einem Meniskusfaktor Γ multipliziert werden:

$$\frac{Vp}{Vz} = \frac{l-2\Gamma m}{h}$$
 wobei  $\Gamma = \frac{1}{2} - \frac{1}{6} \left(\frac{m}{r}\right)^2$ ,  $r = \frac{b}{2}$  (1.2)

Zum Unterschied zur Grenzplasmolytischen Methode (DE VRIES, 1877a, b) können bei der Plasmolytisch-Volumetrischen Methode Lösungen verschieden starker Konzentration zur Bestimmung des Plasmolysegrades und damit auch des osmotischen Wertes verwendet werden.

Es besteht eine Abhängigkeit zwischen Plasmolysegrad G und verwendeter Konzentration C des Plasmolytikums: Durch Multiplikation von G und C ergibt sich der osmotische Wert OW, allgemein also:  $C_1 \times G_1 = C_2 \times G_2 = ... = C_i \times G_i$ 

Das Grundprinzip der Plasmometrischen Methode ist die vereinfachende Annahme, daß der gesamte Protoplast bei der Plasmolyse sein Volumen umgekehrt proportional zur Außenkonzentration verkleinert, tatsächlich aber verkleinert sich nur die Vakuole. Bei der Berechnung des osmotischen Wertes von Zellen mit hohem plasmatischen Anteil bzw. von in hoch konzentrierten Lösungen plasmolysierten Zellen erhält man einen zu hohen osmotischen Wert.

Die Abweichung des gefundenen vom wahren osmotischen Wert ist direkt proportional: 1. dem Volumsanteil des Protoplamas am Zellsaft-

raum und

2. der osmotischen Konzentrationsdifferenz zwischen Plasmolytikum und Zellsaft.

Basierend auf einer Formel zur Berechnung des Proportionalitätsfaktors (HÖFLER, 1918a), kann der wahre osmotische Wert O<sub>wahr</sub> aus der folgenden Beziehung ermittelt werden:

Owahr = 
$$\frac{(O_{c2} - O_{c1})C_2 - (C_2 - C_1)O_{c2}}{O_{c2} - O_{c1} - C_2 + C_1}$$
(1.3)

Dabei ist  $O_{ci}$  der in der Konzentration  $C_i$  ermittelte, scheinbare osmotische Wert.

Diese, an einer viel zu geringen Zahl von Probanden abgeleiteten mathematischen Beziehungen wurden in den folgenden 70 Jahren nie auf ihre Genauigkeit und Allgemeingültigkeit untersucht, dienen aber auch heute noch der Bestimmung von Wasser- und Stoffpermeabilität von Pflanzenzellen sowie der Beschreibung von Plasmolyse und Deplasmolyseverhalten (LEE-STADELMANN & STADELMANN, 1989, PALTA & LEE-STADELMANN, 1983).

In einer am Institut für Pflanzenphysiologie durchgeführten Diplomarbeit wurden die 1918 beschriebenen Versuche in weitaus größerem Umfang nachvollzogen und einer statistischen Auswertung zugeführt. Im Gegensatz zu den Experimenten HÖFLERs wurde für jedes der Versuchsobjekte zuerst der Zeitraum, in dem plasmolytisches Gleichgewicht herrscht, festgestellt – ist doch die Messung der Plasmolysegrade nur in diesem Abschnitt zulässig. Weiters wurde ein Vergleich zwischen der Plasmolytisch-Volumetrischen Methode (PVM) und der Grenzplasmolytischen Methode (GPM) einerseits, und der unter 1.1 und 1.2 gegebenen Formeln zur Berechnung des Plasmolysegrades andererseits, angestellt. Besonderes Interesse galt der Proportionalität der aus verschiedenen Konzentrationen ermittelten osmotischen Werte vor und nach einer durchgeführten Protoplasmakorrektur sowie den Zentrifugenversuchen.

Hierbei wurde versucht, den "Nichtlösenden Raum", RESÜHR (1935, p. 339), der für die mangelhafte Proportionalität der Plasmolysegrade verantwortlich zu machen, durch Zentrifugieren zu minimieren. Nach dieser, von LEPESCHKIN (1909, 1927) vorgeschlagenen Prozedur müßte eine Übereinstimmung der Plasmolysegrade bzw. osmotischen Werte eintreten.

Es war zu prüfen, inwieweit die statistische Auswertung die Ergebnisse HÖFLERs bestätigen konnte.

Sämtliche Messungen wurden einmal an zu Versuchsbeginn ausgewählten Zellen ("Einzelzellversuche"), ein andermal an zufällig gewählten, stets neuen Zellen eines Schnittes (Algenfadens) ("Zufallsstichprobe") durchgeführt. Um eine repräsentative Stichprobe zu erhalten, betrug die Zahl der untersuchten Zellen meist 50–100, bei Einzelzellversuchen mindestens 20.

## Material und Methodik

Neben den von DE VRIES (1884a, b) geforderten Eigenschaften sind für die Auswertung nach der Plasmolytisch-Volumetrischen Methode folgende Anforderungen an die Versuchsobjekte zu stellen:

- Die zu untersuchenden Zellen müssen geometrischen Körpern entsprechen.
- In hypertonischen Lösungen müssen sich die Protoplasten an den Querwänden von der Zellwand loslösen und möglichst runde Menisken bilden.
- Die plasmolysierten Protoplasten sollten sich von den Querwänden, nicht aber von den Längswänden der Zellwand losgelöst und abgerundet haben (Konvexplasmolyse). Krampfige Plasmolyse läßt auf hohe Viskosität des Plasmas oder plasmolytisches Ungleichgewicht zwischen der Konzentration des Zellsaftes und der (noch hypertonischen) Außenlösung schließen.
- Ein angefertigtes Präparat sollte möglichst dünn sein, um eine gute Auflösung zu erzielen, (ideal bei abpräparierten Epidermen), muß aber im Falle von Gewebeschnitten noch so dick sein, daß sowohl oberhalb als auch unterhalb der untersuchten Zellage sich noch eine intakte Zellschicht befindet.

- Die untersuchten Zellen sollen möglichst gleichmäßig in Form und Größe sein, gleichen physiologischen Zustand und gleiches Alter aufweisen. Besonders die beiden letzten Bedingungen sind am Dauergewebe einer höheren Pflanze, dessen Zellen mehr oder weniger gleichzeitig entstanden sind, leichter nachzuprüfen als z. B. an Algen. Dort sind jüngere von älteren Zellen bzw. teilungsbereite von vegetativen Zellen mitunter nur in der Größe der Vakuole zu unterscheiden, die sich ja indirekt wieder auf den osmotischen Wert auswirkt.
- Weiters ist eine nicht zu hohe Wandhaftung des Protoplasmas zu fordern, so daß die bei der Plasmolyse auftretenden Voluminaänderungen nicht verzögert oder behindert werden.

Als Versuchsmaterial dienten äquatorial gelegene Innenepidermiszellen der Schuppenblätter von Allium cepa, präpariert nach STRUGGER (1931, 1949) und GERDENITSCH (1984), Stengelepidermiszellen von Lamium maculatum, Grundgewebszellen von Campanula rapunculoides und Blechnum spicant sowie vegetative Zellen von Spirogyra und Zygnema. Weiters wurden abaxiale, über der Blattmittelrippe gelegene Epidermiszellen von Tradescantia discolor untersucht, die bereits HÖFLER (1918a) in seinen Stufenversuchen verwendete. Die Schnitte wurden präpariert und für einige Stunden auf Aqua dest. gelegt, um den Präparationsschock (STRUGGER, l. c.) abklingen zu lassen. Danach wurden die Objekte in Werth'sche Kammern (WERTH, 1961) eingeschlossen und Plasmolytika (Glucose, Saccharose, KNO3 sowie ein Gemisch aus KCl und CaCl<sub>2</sub> im Verhältnis 9:1) bekannter Konzentration (bestimmt mit Hilfe eines 3MO Osmometers, Advanced Instruments) durchgepumpt. Von allen Reagentien wurden Konzentrationsreihen hergestellt, im Kühlschrank aufbewahrt und 2 Stunden vor Versuchsbeginn ins Labor gestellt, wo sie Raumtemperatur annahmen. Der Abstand benachbarter Konzentrationen betrug 0,025 osmol bei Versuchen mit Zufallsstichproben, 0,01 osmol bei Einzelzellversuchen.

Die Plasmolyse konnte unter dem Mikroskop (Zetopan, Reichert) beobachtet, mit Hilfe eines Fotoaufsatzes (Wild Photoautomat MPS45) auf Schwarzweiß-Negativmaterial (Fortepan 40, Kodak-Tmax 100) festgehalten und durch einen speziell adaptierten Projektionsapparat (Prado Universal, Leitz) einer späteren Auswertung zugänglich gemacht werden.

## Ergebnisse

## Plasmolytisches Gleichgewicht (PLGGW)

Darunter soll der Gleichgewichtszustand zwischen dem plasmolysierten Protoplasten und der plasmolysierenden Außenlösung verstanden werden, in welchem sich der erreichte Plasmolysegrad G und somit auch der osmotische Wert der Zelle nicht mehr ändert.

In einer graphischen Darstellung, in der der osmotische Wert auf der Y-Achse und die Plasmolysezeit auf der X-Achse aufgetragen werden,



Abb. 2.1 Plasmolyseverlauf in einem nichtpermeierenden Plasmolytikum

entspricht dieser Zeitraum dem Kurvenabschnitt, der parallel zur Zeitachse verläuft. In Abb. 2.1 tritt dieser Zustand nach 50 Minuten ein.

Steigt die Kurve mit zunehmender Dauer wieder an, so muß angenommen werden, daß zumindest die äußere Plasmamembran permeabel geworden ist. Die Messung des Plasmolysegrades muß daher vor Beginn der Permeation vorgenommen werden.

Für alle untersuchten Objekte wurden Kurven erstellt, aus denen das Plasmolyseverhalten der Protoplasten in verschiedenen Konzentrationen ersichtlich ist.

Konzentration 1 betrug bei Blechnum, Spirogyra und Zygnema 0,5 osmol, bei Allium, Lamium und Tradescantia 0,65 osmol, und bei Campanula 0,7 osmol. Die zweite Konzentrationsstufe war bei Blechnum, Spirogyra und Zygnema 0,7 osmol, bei Allium, Lamium und Tradescantia 0,85 osmol und bei Campanula 0,9 osmol.

In Tab. 1 ist jeweils der Zeitpunkt, an dem die Messung frühestens erfolgen kann, für die einzelnen Objekte und Plasmolytika angegeben.

In allen weiteren Versuchen dienten diese Darstellungen als Grundlage.

Folgende Schlüsse wurden aus den angestellten Versuchen gezogen:

1. Das Plasmolytische Gleichgewicht (PLGGW) stellt sich verschieden rasch ein, abhängig von den Eigenschaften der Zellen eines Gewebes und dem verwendeten Plasmolytikum. Plasmareichere Zellen erreichen das PLGGW später als plasmaärmere Zellen.

		Glu	cose			Sacch	arose			K	NO <sub>1</sub>			KCl/	CaCl	
	Kon trati	zen- on 1	Kon trati	on 2	Kon trati	izen- on 1	Kon trati	izen- on 2	Kon trati	zen- on 1	Konz	en- on 2	Kon trati	zen- on 1	Kon trati	zen- on 2
	x	n	x	n	x	n	x	n	x	n	x	n	x		x	n
Allium	60	19	55	22	45	13	35	12	30	18	30	12	35	24	40	17
Lamium	50	15	42	17	40	10	30	11	20	10	25-65!	14	25	19	25	15
Campanula	47	16	50	19	35	14	40	19	20	13	26	10	37	12	25	14
Blechnum	40	19	35	19	32	12	35	14	48	14	25	10	30	14	30	10
Tradescantia	54	14	49	13	49	11	47	12	35	10	31	11	30	10	24	11
Spirogyra	37	24	35	21	36	19	35	17	24	16	25	18	26	14	25	19
Zygnema	41	18	36	14	39	16	32	13	26	14	21	12	33	13	34	14

Tab. 1: Gemittelte Plasmolysezeit  $\bar{x}$  in Minuten, nach der sich das plasmolytische Gleichgewicht in Anelektrolyt- bzw. Elektrolytlösungen unterschiedlicher Konzentration einstellte. Beobachtet wurden jeweils n Zellen. Angaben zu den verwendeten Konzentrationen im Text.

2. Die Wahl des Plasmolytikums beeinflußt sowohl die Eintrittsgeschwindigkeit als auch die Dauer des PLGGWs: In höher konzentrierten Lösungen stellt sich das PLGGW früher ein als in weniger stark hypertonischen Lösungen.

3. Elektrolytlösungen rufen rascher perfekte Plasmolyse hervor als Anelektrolyte. Permeation erfolgt nach relativ kurzer Zeit (oft schon innerhalb der ersten beiden Stunden), was bei den später angestellten Stufenversuchen beachtet werden muß.

Die osmotischen Werte, ermittelt in Zuckerlösungen, bleiben häufig über mehrere Tage konstant. Perfekte Plasmolyse tritt mitunter erst nach einer Stunde ein; Permeation konnte innerhalb der ersten sechs Stunden nicht beobachtet werden, im beobachteten Zeitraum auch keine Exosmose.

4. Die Konzentration des Plasmolytikums hat in den meisten Fällen Einfluß auf die Plasmolysezeit: So erreichten Zellen von Allium, Lamium, Blechnum, Zygnema und Tradescantia, die in stärker hypertonischer *Glucose*lösung plasmolysiert worden waren, das plasmolytische Gleichgewicht früher als die in schwächer hypertonischer Lösung plasmolysierten Zellen. Zellen von Campanula erreichten das Gleichgewicht etwas später als in Konzentration 1, die Zellen von Spirogyra plasmolysierten in beiden Konzentrationen gleich rasch.

In Saccharoselösungen verhielt es sich anders: Zellen von Campanula, Blechnum, Tradescantia, Spirogyra und Zygnema erreichten das PLGGW in der schwächer hypertonischen Lösung früher als in der stärker hypertonischen, Zellen von Allium und Lamium hingegen später. Mit Ausnahme der Spirogyrazellen wurde das PLGGW in der schwächeren Glucosekonzentration später erreicht als in der isotonischen Saccharoselösung. In der stärker konzentrierten Saccharoselösung erreichten Lamium, Campanula und Zygnema das Gleichgewicht rascher als in der isotonischen Saccharoselösung, Allium und Tradescantia später, Spirogyra gleich rasch. Auffallend rasch traten die Zellen von Zygnema in den Gleichgewichtszustand.

Sowohl in *Glucose-* als auch in *Saccharose*lösung zeigten manche Zellen im Gleichgewicht leichte Schwankungen um den osmotischen Wert, der sich aber während der gesamten Versuchsdauer (4 Stunden) nicht änderte. Diese Schwankungen besaßen eine Größenordnung von 0,005–0,02 osmol und waren an allen Objekten zu beobachten.

In den *Elektrolytlösungen* wurde das plasmolytische Gleichgewicht mit Ausnahme von Blechnum in KNO<sub>3</sub> von den Zellen aller Objekte rascher erreicht als in den vergleichbaren Anelektrolytlösungen, mitunter schon nach 25 Minuten. Nach durchschnittlich 2 Stunden stiegen die osmotischen Werte in der schwächer hypertonischen Konzentration an, danach nahmen die osmotischen Potentiale einen neuen, gegenüber dem vorhergehenden höheren, aber stabilen Wert an (Allium, Lamium, Campanula, Blechnum, Spirogyra in KCl/CaCl<sub>2</sub>, Blechnum in KNO<sub>3</sub>) oder stiegen nach starken Schwankungen weiter an (Allium, Campanula, Spirogyra, Zygnema in KNO<sub>3</sub>, Campanula in KCl/CaCl<sub>2(Konz.1)</sub>):

In den stärker hypertonischen Konzentrationen beider *Elektrolyt*lösungen konnte ebenfalls eine Erhöhung des osmotischen Wertes beobachtet werden, jedoch erfolgte der Anstieg bereits nach 1–1,5 Stunden, die Schwankungen nach dem Anstieg sind zum Teil größer (z. B. Lamium in KNO<sub>3</sub>).

Daß speziell Plasmolyse in stark hypertonischer Lösung keinesfalls unschädlich ist (cf. ALBACH, 1931), zeigten Versuche mit Zygnema und Tradescantia, in deren Verlauf mehrere Zellen nach ca. 2 Stunden abstarben. Dieser Aspekt ist besonders im Zusammenhang mit den HÖFLERschen Stufenversuchen interessant, die über mehrere Stunden geführt wurden und in den KNO<sub>3</sub> als Plasmolytikum eingesetzt wurde.

## "Grundformel" (1.1.) und "Meniskusformel" (1.2.)

Als Plasmolytika dienten Saccharose (jeweils 1 osmol über dem grenzplasmolytisch ermittelten Wert) und KNO<sub>3</sub> (jeweils 0,35 osmol hypertonisch). KCl/CaCl<sub>2</sub>-Mischlösungen kamen nicht zur Anwendung, da diese ideal halbkugelig geformte Menisken hervorrufen. Die Plasmolysegrade bzw. die daraus resultierenden osmotischen Werte wurden einmal mit Hilfe der unter 1.1. gegebenen Grundformel, und ein zweites Mal nach der Meniskusformel (1.2.), die die Abweichung der Menisken von der idealen Halbkugelform berücksichtigt, berechnet.

Die auf beide Arten bestimmten osmotischen Werte einer Zelle wurden sowohl in Einzelzellversuchen als auch in statistischen Versuchen einander gegenübergestellt und verglichen (WILCOXON-Test).

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, lagen die nach der Grundformel errechneten osmotischen Werte stets etwas tiefer als die nach der Meniskusformel bestimmten. Jedoch zeigten lediglich die Schnitte von Campanula Signifikanz auf einem Wahrscheinlichkeitsniveau von 95 % (WILCOXON-Test), wobei △OW eine Größenordnung von 1–2 Hundertstel Osmol besaß.

In allen anderen Objekten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den nach beiden Formeln errechneten osmotischen Werten festgestellt werden.

In den weiteren Versuchen wurde daher die einfachere "Grundformel" zur Berechnung der osmotischen Potentiale herangezogen.

## Vergleich von PVM und GPM

Zufallsstichproben:

Bei den grenzplasmolytischen Versuchen standen Konzentrationen im Abstand von 0,01 osmol zur Verfügung. Der maximale Fehler betrug daher 0,005 osmol.

Die Konzentration der bei der PVM verwendeten Plasmolytika wurde stets so gewählt, daß sie etwa 0,35 osmol über jener Konzentration

		Saccharose			KNO3					
Objekt	OW	STD; n	OW	STD; n	$\triangle OW$	OW	STD; n	OW	STD; n	$\triangle OW$
	"Grui	nach ndformel"	"Menis	hach kusformel"		naci Grundfc,	ormel"	nacı Meniskus,	n formel"	
Allium	0,460	0,084; 70	0,463	0,084; 70	0,003	0,433	0,063; 50	0,437	0,064; 50	0,004
	0,438	0,062; 65	0,442	0,063; 65	0,004	0,451	0,052; 60	0,455	0,053; 60	0,004
	0,447	0,065; 50	0,451	0,066; 50	0,004	0,439	0,060; 50	0,444	0,061; 50	0,005
	0,421	0,032; 50	0,424	0,032; 50	0,003	0,448	0,031; 49	0,452	0,031; 49	0,004
Lamium	0,440	0,026; 56	0,444	0,028; 56	0,004	0,432	0,024; 50	0,450	0,024; 50	0,008
	0,438	0,036; 60	0,440	0,040; 60	0,002	0,449	0,036; 55	0,453	0,038; 55	0,004
	0,467	0,049; 50	0,469	0,052; 50	0,002	0,426	0,048; 60	0,431	0,049; 60	0,005
	0,426	0,038; 50	0,430	0,040; 50	0,004	0,431	0,027; 50	0,437	0,027; 50	0,006
Campanula	0,449	0,035; 82	0,456	0,039; 82	0,007	0,511	0,074; 60	0,524	0,076; 60	0,013
	0,511	0,042; 70	0,517	0,043; 70	0,006	0,487	0,063; 50	0,493	0,066; 50	0,006
	0,468	0,064; 50	0,474	0,062; 50	0,006	0,493	0,059; 50	0,502	0,060; 50	0,009
	0,532	0,051; 50	0,543	0,053; 50	0,011	0,519	0,062; 65	0,526	0,063; 65	0,007
Blechnum	0,492	0,061; 57	0,494	0,061; 57	0,002	0,510	0,029; 47	0,512	0,031; 47	0,002
	0,374	0,049; 50	0,380	0,050; 50	0,006	0,498	0,047; 55	0,503	0,049; 55	0,005
	0,468	0,064; 50	0,474	0,062; 50	0,006	0,493	0,059; 50	0,502	0,060; 50	0,009
	0,532	0,051; 50	0,543	0,053; 50	0,011	0,519	0,062; 65	0,526	0,063; 65	0,007
Spirogyra	0,459	0,047; 71	0,462	0,048; 71	0,003	0,398	0,029; 60	0,401	0,029; 60	0,003
	0,398	0,031; 60	0,400	0,032; 60	0,002	0,411	0,037; 65	0,416	0,038; 65	0,005
	0,421	0,038; 50	0,427	0,038; 50	0,006	0,415	0,018; 45	0,418	0,018; 45	0,003
	0,407	0,051; 75	0,411	0,052; 75	0,004	0,422	0,043; 70	0,426	0,043; 70	0,004
Zygnema	0,437	0,036; 68	0,443	0,037; 68	0,006	0,413	0,062; 50	0,416	0,062; 50	0,003
	0,397	0,042; 50	0,402	0,042; 50	0,005	0,438	0,071; 60	0,441	0,071; 60	0,003
	0,404	0,072; 70	0,406	0,071; 70	0,002	0,446	0,059; 55	0,450	0,060; 55	0,004
	0,420	0,039; 50	0,427	0,040; 50	0,007	0,421	0,068; 65	0,424	0,068; 65	0,003

Tab. 2: Vergleich der osmotischen Werte berechnet nach Formel 1.1. und 1.2.: n: Anzahl der untersuchten Zellen, STD: Standardabweichung, △ OW: Differenz der an denselben Zellen errechneten osmotischen Werte. Signifikanz nach WILCOXON (95 %) durch gekennzeichnet.

			Sa	ccharose					KC	Cl/CaCl <sub>2</sub>		
Objekt	MO	± STD; n	* OW	± STD; n	₩O	: STD;	* OW	± STD; n	- MO	± STD; n	¥ OW	- STD;
		nach GPM		nach PVM			-0	nach 3PM	I	nach VM		
Allium	0,445	0,010; 80	0,412	0,004; 72	0,033	0,006	0,445	0,026; 82	0,405	0,012; 78	** 0,040	0,014
	0,463	0,013; 76	0,441	0,011;71	0,022	0,002	0,441	0,019; 76	0,412	0,018; 70	0,029	0,001
	0,453	0,019; 74	0,436	0,021; 90	0,017	0,002	0,397	0,031; 69	0,389	0,024; 73	0,010	0,003
	0,441	0,022; 69	0,432	0,019; 74	0,009	0,003	0,462	0,023; 74	0,448	0,034; 78	0,014	0,011
Lamium	0,465	0,020; 79	0,448	0,012; 80	0,017	0,008	0,470	0,022; 67	0,445	0,014; 84	0,025	0,008
	0,451	0,013; 81	0,441	0,024; 74	0,010	0,011	0,483	0,014; 61	0,462	0,019; 69	0,021	0,005
	0,448	0,022; 78	0,437	0,021; 80	0,011	0,001	0,447	0,029; 73	0,429	0,033; 71	0,018	0,004
	0,473	0,012; 84	0,459	0,019; 80	0,014	0,007	0,431	0,024; 59	0,422	0,029; 64	0,009	0,005
Campanula	0,535	0,095; 59!	0,480	0,020; 67	0,055	0,075	0,582	0,031; 78!	0,478	0,027; 76!	** 0,104	0,004!
ſ	0,541	0,084; 61	0,502	0,024; 65	0,039	0,060	0,571	0,054; 69	0,548	0,024; 72	0,023	0,030
	0,489	0,031; 55	0,481	0,019; 52	0,008	0,012	0,534	0,036; 82	0,502	0,036; 75	0,032	0,000
	0,542	0,059; 49	0,511	0,034; 50	0,031	0,025	0,529	0,048; 64	0,486	0,045; 61	0,043	0,003
Blechnum	0,425	0,012; 63	0,411	0,008; 73	0,014	0,004	0,380	0,018; 74	0,357	0,009; 74	0,023	0,009
	0,419	0,017; 59	0,402	0,010; 64	0,017	0,007	0,422	0,022; 63	0,409	0,011; 61	0,013	0,011
	0,423	0,021; 71	0,409	0,013; 74	0,014	0,008	0,446	0,017; 71	0,431	0,023; 70	0,015	0,006
	0,426	0,018; 68	0,415	0,019; 71	0,011	0,001	0,399	0,029; 65	0,374	0,018; 67	0,025	0,011
Spirogyra	0,335	0,039; 79	0,327	0,026; 86	0,008	0,013	0,340	0,014; 69	0,331	0,009; 72	0,009	0,005
	0,341	0,021; 61	0,329	0,019; 65	0,012	0,002	0,356	0,019; 58	0,340	0,013; 60	0,016	0,006
	0,374	0,041;69	0,356	0,037; 70	0,018	0,004	0,326	0,012; 72	0,321	0,024; 70	0,007	0,012
	0,329	0,018; 76	0,318	0,021; 71	0,011	0,003	0,343	0,023; 61	0,323	0,030; 65	0,020	0,007
Zygnema	0,399	0,018; 84	0,378	0,004; 79	0,021	0,014	0,395	0,028; 74	0,369	0,016; 69	0,026	0,012
	0,381	0,024; 81	0,369	0,008; 74	0,012	0,016	0,370	0,031; 69	0,352	0,011; 72	0,018	0,020
	0,406	0,009; 74	0,384	0,012; 76	0,022	0,003	0,351	0,013; 75	0,337	0,027; 75	0,014	0,014
	0,412	0,031; 69	0,404	0,021; 71	0,008	0,010	0,402	0,104; 67!	0,388	0,082; 68	0,014	0,022
Tab. 3: Verglei	ch von C	Srenzplasmo	lytischer	(GPM) und l	Plasmolytis	sch-Volume	etrischer A	Aethode (PV.	M) zur B	estimmung	des osmotis	chen Wertes
nach beiden M	ethoden	gemucucu v erhaltenen E	Trgebniss	$COW \pm ST$	، سر د عرب ، م D. Signifik:	anz auf 5 %	untersucii 6-Niveau	durch gel	una aer kennzeicl	Absolutben inet.	age der Lun	terenzen uer

lagen, die eben noch Grenzplasmolyse hervorgerufen hatte. Dabei wurde der Plasmolysegrad nach der aus Tab. 1 ermittelten Zeit gemessen.

Untersucht wurden stets benachbarte Schnitte desselben Organs einer Pflanze. Einige Ergebnisse sind in Tab. 3 (Seite 121) wiedergegeben.

Es zeigte sich, daß die nach der GPM bestimmten OW stets höher ausfielen als die plasmometrisch bestimmten, wobei die Differenzen eine Größenordnung von einigen Hundertstel Osmol (0,01–0,03) betrugen.

Auch die Standardabweichung der grenzplasmolytisch ermittelten OW waren meist etwas größer. Die Wahl des Plasmolytikums (Elektrolyt oder Anelektrolyt) scheint darauf keinen Einfluß zu haben.

Ist die Streuung der grenzplasmolytisch ermittelten OW hoch, so liegen die volumetrisch bestimmten OW in derselben Größenordnung. Daraus resultiert, daß die Differenz der Standardabweichungen einen kleinen Betrag (einige Tausendstel) annimmt.

Eine Ausnahme stellen die Zellen von Campanula dar, deren OW und Standardabweichungen je nach der angewendeten Methode stärker streuten ( $\triangle$  OW 0,03–0,01 osmol). Jedoch zeigt sich auch innerhalb dieser Versuchsreihe, daß dieses Phänomen nicht in allen Schnitten angetroffen werden muß (z. B. Saccharose, Schnitt 3).

Daher wurden stets nur die Zellen *eines* Schnittes (eines Zellfadens) in einem Datensatz zusammengefaßt.

## Einzelzellversuche:

Die aus der Auswertung der Zufallsstichproben gezogenen Schlüsse wurden in den Einzelzellversuchen bestätigt.

Die Größenordnung der Differenz der OW (△ OW) ist hier jedoch um eine Zehnerpotenz kleiner (0,005–0,02 osmol) als die der Zufallsstichproben.

In Saccharoselösungen fanden sich die geringsten Unterschiede bei Innenepidermiszellen von Allium (0,008 osmol) und Grundgewebszellen von Blechnum (0,008 osmol), auch die Standardabweichungen der gemittelten OW waren bei diesen Objekten am geringsten (0,006 osmol).

Große Differenzen ergaben sich hingegen bei Campanula und Zygnema, wobei auch die Standardabweichungen der gemittelten Differenzen bei Campanula am größten waren (Tab. 4a und b).

Bei allen anderen Objekten fanden sich nur geringe Unterschiede.

Die Standardabweichung der Campanulazellen ist gering, die Standardabweichung der Differenzen hingegen hoch, was auf den Besitz eines ziemlich einheitlichen OW, aber große Unterschiede in der Viskosität des Plasmas hinweist. Ähnlich verhielten sich die Zellen von Allium.

In KCl/CaCl<sub>2</sub>-Mischlösung waren die Differenzen der OW sowie der Standardabweichungen bei Blechnum und Tradescantia kleiner als in den Saccharoselösungen. Die grenzplasmolytisch bestimmten OW der

Objekt	Zelle Nr.	OW nach GPM	OW nach PVM	$\triangle OW$	OW ± STD nach GPM	OW ± STD nach PVM	$\triangle$ OW
Allium	1 2* 3 4 5 6* 7 8 9	0,45 0,43 0,45 0,41 0,43 0,47! 0,45! 0,40 0,45!	0,441 0,429 0,432 0,399 0,421 0,466 0,438 0,398 0,398 0,447	0,009 0,001 0,013 0,011 0,009 0,004 0,012 0,002 0,003	0,438 ± 0,022	0,430 ± 0,022	0,008 ± 0,006
Lamium	1 2 3* 4 5 6* 7 8 9	0,48 0,45 0,43! 0,46 0,46 0,46 0,42 0,45! 0,46	0,461 0,433 0,429 0,425 0,447 0,459 0,412 0,437 0,447	0,019 0,017 0,001 0,005 0,013 0,001 0,008 0,013 0,013	0,449 ± 0,019	0,439 ± 0,016	0,010 ± 0,007
Campanula	1* 2 3* 4* 5 6 7 8 9 10	0,60! 0,55 0,53 0,52 0,57 0,54 0,53 0,53! 0,53! 0,52! 0,53	0,532 0,529 0,498 0,547 0,521 0,513 0,522 0,509 0,511	0,068 0,021 0,031 0,023 0,019 0,017 0,008 0,011 0,019	0,542 ± 0,025	0,517 ± 0,017	0,025 ± 0,017
Blechnum	1* 2 3 4* 5* 6 7 8 9	0,49! 0,51! 0,46 0,53 0,40 0,37 0,47 0,40 0,43!	0,488 0,504 0,447 0,510 0,390 0,364 0,458 0,397 0,426	0,002 0,006 0,013 0,020 0,010 0,006 0,012 0,003 0,004	0,451 ± 0,055	0,443 ± 0,052	0,008 ± 0,006
Tradescantia	1* 2 3 4* 5 6 7 8* 9 10	0,21 0,21 0,22 0,21! 0,24 0,23 0,22! 0,24! 0,24! 0,24	0,200 0,201 0,213 0,209 0,236 0,222 0,217 0,241 0,231 0,214	0,010 0,009 0,007 0,001 0,005 0,008 0,003 -0,001 0,009 0,036	0,227 ± 0,015	0,218 ± 0,014	0,009 ± 0,010
Spirogyra	1 2 3 4 5* 6 7* 8 9	0,34 0,30 0,32 0,33 0,34 0,31 0,31 0,33 0,32	0,324 0,291 0,300 0,311 0,334 0,296 0,308 0,320 0,299	0,016 0,009 0,020 0,019 0,006 0,014 0,002 0,010 0,021	0,322 ± 0,014	0,309 ± 0,014	0,013 ± 0,007

Tab 4a: Vergleich von Grenzplasmolytischer Methode (GPM) und Plasmolytisch-Volumetrischer Methode (PVM) an Einzelzellen.  $\triangle$  OW: Differenz zwischen den nach beiden Methoden ermittelten osmotischen Werten einer Zelle. Plasmolytikum: Saccharose.

Objekt	Zelle Nr.	OW nach GPM	OW nach PVM	∆OW	OW ± STD nach GPM	OW ± STD nach PVM	$\triangle OW$
Allium	1 2 3* 4 5* 6 7 8 9 10	0,45 0,43 0,45 0,44 0,44 0,44 0,41 0,42 0,42 0,42 0,43	0,443 0,421 0,426 0,433 0,440 0,431 0,402 0,411 0,419 0,423	0,007 0,009 0,024 0,007 0,000 0,009 0,008 0,009 0,001 0,007	0,433 ± 0,013	0,425 ± 0,013	0,008 ± 0,006
Lamium	1 2* 3 4* 5 6 7* 8 9*	0,45 0,44 0,45 0,45 0,44 0,44 0,46 0,44 0,45	0,444 0,439 0,447 0,450 0,431 0,436 0,448 0,432 0,438	0,006 0,001 0,003 0,009 0,009 0,004 0,012 0,008 0,012	0,447 ± 0,007	0,441 ± 0,007	0,006 ± 0,005
Campanula	1 2 3 4* 5* 6 7 8* 9* 10	0,52 0,51 0,51 0,56 0,58 0,53 0,52 0,57 0,57 0,56	0,502 0,498 0,499 0,511 0,537 0,521 0,506 0,528 0,536 0,544	0,018 0,012 0,011 0,049 0,043 0,009 0,014 0,042 0,034 0,016	0,543 ± 0,028	0,518 ± 0,017	0,025 ± 0,015
Tradescantia	1* 2 3 4 5 6 7 8* 9* 10*	0,20 0,21 0,22 0,23 0,23 0,22 0,21 0,23 0,22 0,22	0,199 0,203 0,211 0,226 0,226 0,219 0,208 0,217 0,221 0,217	0,001 0,007 0,009 0,004 0,011 0,007 0,002 0,013 0,001 0,003	0,219 ± 0,010	0,213 ± 0,008	0,006 ± 0,004
Blechnum	1 2 3 4* 5* 6 7* 8 9	0,45 0,44 0,43 0,44 0,43 0,43 0,43 0,43 0,42 0,43	0,446 0,431 0,438 0,429 0,440 0,428 0,413 0,419 0,426	0,004 0,009 0,002 0,001 0,000 0,002 0,017 0,001 0,004	0,434 ± 0,009	0,430 ± 0,010	0,004 ± 0,005
Spirogyra	1 2 3 4* 5 6 7* 8 9 10	0,32 0,32 0,32 0,31 0,33 0,35 0,33 0,33 0,32 0,33	0,299 0,306 0,311 0,308 0,324 0,327 0,312 0,312 0,316 0,319	0,021 0,014 0,009 0,002 0,006 0,019 0,003 0,018 0,004 0,011	0,326 ± 0,011	0,315 ± 0,010	0,011 ± 0,007

Tab 4b: Vergleich von Grenzplasmolytischer Methode (GPM) und Plasmolytisch-Volumetrischer Methode (PVM) an Einzelzellen.  $\triangle$  OW: Differenz zwischen den nach beiden Methoden ermittelten osmotischen Werten einer Zelle. Plasmolytikum: KCl/CaCl<sub>2</sub>-Mischlösung.

Campanulazellen lagen auch in diesen Versuchsreihen viel höher als die plasmometrisch bestimmten.

Die Daten aller anderen untersuchten Objekte sind den Ergebnissen aus den Saccharoseversuchen sehr ähnlich.

## Stufenversuche, Proportionalität

Hier wurden die Zellen eines Schnittes (Algenfadens) in verschieden stark konzentrierten Lösungen plasmolysiert und nach dem Zufallsprinzip (Zufallsstichprobe) jeweils etwa 30 Zellen vermessen.

Außerdem wurden in Einzelzellversuchen bestimmte Zellen (etwa 15–20) eines Gewebes während der gesamten Versuchsdauer beobachtet und die Änderung der Plasmolysegrade in Abhängigkeit von der gewählten Konzentration festgehalten. So wie in den von HÖFLER angestellten Stufenversuchen wurden auch hier Saccharose- und KNO<sub>3</sub>-Lösungen verwendet, um die Ergebnisse HÖFLERs direkt mit den eigenen vergleichen zu können.

Plasmolysiert man eine plasmareiche Zelle in verschieden starken Konzentrationen eines Plasmolytikums, so wird der aus der höheren Konzentration errechnete Wert etwas höher ausfallen als der in der schwächer hypertonischen Lösung ermittelte, weil das Plasma die Kontraktion behindert.

Die hier erhaltenen Ergebnisse erfahren deshalb eine "Protoplasmakorrektur"; in den Tabellen 3.5–3.6 sind die OW unter Berücksichtigung dieser Korrektur ("K") neben den nicht korrigierten Werten eingetragen.

Unter der Annahme völliger Semipermeabilität müßten nach dieser Korrektur die OW einer Zelle in allen Konzentrationen gleich bleiben. Eine Permeation des Plasmolytikums ist aus der Veränderung des OW ersichtlich.

Als Bezugsgrößen (C<sub>1</sub>, O<sub>c1</sub> in Formel 1.3.) dienten bei der Berechnung jeweils die schwächsten verwendeten Konzentrationen, da der Fehler, der sich aus der Permeation ergibt, mit der Höhe der Konzentration der Außenlösung wächst.

Sowohl in den Einzelzellversuchen als auch in den Versuchen mit zufällig gewählten Zellen zeigte sich, daß die Protoplastenvolumina in den verschieden konzentrierten Zuckerlösungen eher proportional waren als in den Elektrolytlösungen. Die OW in mäßig hypertonischen Glucoselösungen waren ± mäßig proportional, lediglich in sehr starken Lösungen (ab 1,4 osmol) traten Abweichungen auf. In den Saccharoseversuchen erschienen die OW trotz Korrektur in manchen Fällen zu hoch. In KNO<sub>3</sub> konnten fast immer Schwankungen der K-Werte beobachtet werden, die aus den verschiedenen Konzentrationen errechneten OW waren nicht proportional.

In K/Ca-Mischlösungen waren die korrigierten OW der mäßig stark plasmolysierten Zellen proportional, die in stark hypertonischen Lösungen eingebrachten Zellen aber nicht.

	OW	OW	OW	OW	ow	ow	OW	ow
Zelle	in	in	in	in	in	in	in	in
Nr.	0,633	0,749	0,869	0,803	0,749	0,660	0,633	0,869
1	0,421	0,429 0,405	0,434 0,409	0,430 0,409	0,436 0,390	0,430 0,315	0,443 0,633!	0,456 0,384
2	0,407	0,411 0,399	0,417 0,397	0,415 0,396	0,428 0,357	0,413 0,342	0,431 0,633!	0,431 0,381
3	0,412	0,416 0,404	0,421 0,403	0,423 0,397	0,425 0,384	0,420 0,319	0,440	0,439 0,383
4	0,403	0,407 0,395	0,419 0,386	0,416 0,384	0,419 0,366	0,417 0,156	0,427	0,424 0,381
<u>0</u> 5	0,398	0,410 0,371	0,418 0,376	0,413 0,375	0,413 0,363	0,409 0,236	0,416	0,432 0,358
	0,418	0,426 0,402	0,430 0,406	0,428 0,405	0,431 0,391	0,426 0,327	0,436	0,446 0,389
	0,412	0,417 0,402	0,422 0,402	0,420 0,401	0,422 0,391	0,418 0,349	0,432	0,448 0,372
8	0,408	0,414 0,396	0,420 0,396	0,419 0,392	0,419 0,384	0,415 0,329	0,433	0,444 0,368
9	0,413	0,418 0,403	0,426 0,400	0,423 0,399	0,424 0,390	0,421 0,320	0,450	0,464 0,352
10	0,409	0,421 0,383	0,423 0,395	0,422 0,390	0,426 0,371	0,415 0,345	0,441	0,458 0,360
Nr.	in	in	in	in	in	in	in	in
	0,666	0,874	0,965	1,262	1,047	0,965	0,930	0,874
1	0,413	0,414 0,412	0,415 0,412	0,416 0,412	0,415 0,412	0,415 0,412	0,415 0,412	0,415 0,412
2	0,399	0,400 0,398	0,400 0,398	0,401 0,398	0,400 0,398	0,400 0,398	0,400 0,398	0,400 0,398
8 3	0,407	0,409 0,404	0,410 0,404	0,413 0,404	0,411 0,404	0,411 0,404	0,410 0,404	0,409 0,404
<b>J</b> ag 4	0,422	0,423 0,421	0,423 0,421	0,424 0,421	0,423 0,421	0,423 0,421	0,423 0,421	0,423 0,421
5	0,416	0,418 0,414	0,419 0,414	0,422 0,414	0,420 0,414	0,420 0,414	0,420 0,413	0,419 0,414
6 Zai	0,411	0,411 0,410	0,412 0,410	0,413 0,410	0,412 0,410	0,412 0,410	0,412 0,410	0,412 0,410
7	0,398	0,399 0,397	0,399 0,397	0,400 0,397	0,399 0,397	0,399 0,397	0,399 0,397	0,399 0,397
8	0,402	0,403 0,401	0,403 0,401	0,404 0,401	0,403 0,401	0,403 0,401	0,403 0,401	0,406 0,401

Tab. 5: Stufenversuch: Allium cepa in KNO3 und Saccharose. Konzentrationsangabe in Osmol.Unkorrigierte OW links, korrigierte Werte rechts in jeder Spalte angegeben.

[	OW	OW	OW	OW	OW	OW	OW	OW
Zelle	in	in	in	in	in	in	in	in
Nr.	0,633	0,749	0,869	0,968	1,027	0,868	0,869	0,749
		K	K	ĸ	K	K	К	К
1	0,519	0,519	0,520 0,519	0,522 0,518	0,526 0,517	0,524 0,517	0,521 0,518	0,520 0,518
2	0,498	0,500 0,496	0,504 0,495	0,507 0,494	0,512 0,493	0,510 0,493	0,507 0,493	0,504 0,491
3	0,507	0,509 0,505	0,510 0,505	0,512 0,505	0,516 0,504	0,514 0,504	0,512 0,504	0,511 0,503
<u> </u>	0,507	0,509 0,505	0,510 0,505	0,512 0,505	0,516 0,504	0,504 0,482	0,500 0,482	0,497 0,478
	0,500	0,506 0,493	0,509 0,495	0,513 0,495	0,520 0,493	0,517 0,493	0,515 0,491	0,513 0,483
× 6	0,503	0,504 0,502	0,506 0,501	0,507 0,502	0,512 0,500	0,509 0,501	0,507 0,501	0,505 0,501
7	0,512	0,514 0,510	0,515 0,510	0,516 0,511	0,520 0,509	0,517 0,510	0,516 0,510	0,513 0,511
8	0,520	0,520	0,522 0,519	0,524 0,519	0,527 0,518	0,527 0,518	0,527 0,517	0,524 0,516
9	0,508	0,510 0,506	0,512 0,506	0,513 0,506	0,515 0,506	0,513 0,506	0,512 0,506	0,508
10	0,502	0,510 0,492	0,511 0,497	0,514 0,497	0,516 0,497	0,515 0,497	0,514 0,495	0,512 0,490
Nr.	in	in	in	in	in	in	in	in
	0,610	0,715	0,804	0,987	1,043	1,260	0,987	0,804
		K	К	К	K	К	K	K
1	0,522	0,523 0,521	0,522 0,521	0,528 0,521	0,531 0,521	0,536 0,521	0,528 0,521	0,526 0,521
ບ 2	0,518	0,520 0,516	0,521 0,516	0,524 0,516	0,526 0,516	0,531 0,516	0,524 0,516	0,521 0,516
ပို 3	0,512	0,514 0,510	0,516 0,510	0,519 0,510	0,520 0,510	0,523 0,510	0,519 0,510	0,516 0,510
eų 4	0,519	0,521 0,517	0,523 0,517	0,526 0,517	0,528 0,517	0,532 0,517	0,526 0,517	0,523 0,517
ູ ຊ <u></u> 5	0,510	0,511 0,509	0,512 0,509	0,514 0,509	0,516 0,509	0,518 0,509	0,514 0,509	0,512 0,509
<sup>ه</sup> (	0,498	0,500 0,496	0,502 0,496	0,505 0,496	0,507 0,496	0,510 0,496	0,505 0,496	0,503 0,496
7	0,503	0,505 0,501	0,506 0,501	0,507 0,501	0,510 0,501	0,514 0,501	0,507 0,501	0,506 0,501
8	0,507	0,508 0,506	0,510 0,506	0,511 0,506	0,512 0,506	0,515 0,506	0,511 0,506	0,510 0,506

Tab. 6: Stufenversuch: Campanula in KNO3 und Saccharose. Konzentration in Osmol. K: Osmotische Werte nach Protoplasmakorrektur.

Weiters zeigte sich, daß benachbarte Schnitte eines Organs ganz unterschiedlich reagierten: So waren die Differenzen der OW, die aus der niedrigsten und der höchsten Konzentrationsstufe errechnet wurden, in den einzelnen Schnitten von verschiedener Größenordnung, auch in der Resistenz gegenüber stark hypertonischen Konzentrationen unterschieden sich die Schnitte einer Pflanze. Die Differenzen der korrigierten Werte K waren ca. eine Zehnerpotenz kleiner als die nicht korrigierten OW.

In den Einzelzellversuchen konnte weiters festgestellt werden, daß nach stufenweiser Plasmolyse in immer stärker hypertonischen Elektrolytlösungen (KNO<sub>3</sub>) eine stufenweise *Deplasmolyse* etwas höhere OW ergab als bei der vorangegangenen Plasmolyse.

In den Saccharoselösungen hingegen stiegen zwar die nicht korrigierten Werte, die K-Werte blieben aber völlig konstant.

Daraus muß unter Kenntnis der Daten aus Tab. 1 geschlossen werden, daß die Permeation des Plasmolytikums für die fehlende Proportionalität verantwortlich zu machen ist.

## Zentrifugenversuche

Wenn sich nach Berücksichtigung des Protoplasmakorrekturfaktors der OW plasmareicher Zellen von dem zuvor eruierten OW dieser Zellen unterscheidet, und nicht das Plasmolytikum die Ursache dieser Erscheinung ist, muß der "Nichtlösende Raum" die Kontraktion des Protoplasten in einem Maß behindern, das mit der Protoplasmakorrektur nicht ausgeglichen werden kann.

Nach LEPESCHKIN (l. c.) läßt sich das Volumen dieses "Nichtlösenden Raumes" durch Zentrifugation minimieren.

Der gemittelte OW zentrifugierter Zellen müßte sich dann signifikant (t-Test) von den gemittelten OW nicht zentrifugierter, aber sonst völlig gleich behandelter Kontrollzellen unterscheiden.

Überaus wichtig ist es, die Bestimmung der OW kurze Zeit nach dem Zentrifugieren vorzunehmen, da die hervorgerufenen Phänomene reversibel sind (LEPESCHKIN, 1927). Zu den Versuchen wurden vegetative Zellen von Spirogyra herangezogen. Vorversuche zeigten, daß sich gleich große Zellen in bezug auf ihre OW innerhalb *eines* Fadens überaus ähnlich waren.

Ausgesuchte Zellfäden wurden unter dem Stereomikroskop geteilt, jeweils eine Hälfte in ein mit Standortswasser gefülltes Zentrifugenröhrchen übergeführt und anschließend 10–15 Minuten bei 1300 U/m zentrifugiert. Die andere Hälfte wurde, ebenfalls in Standortswasser, in ein kleines Schälchen eingebracht (Kontrolle). Die OW der zentrifugier-

Tafel 1: Stufenversuch: Allium cepa in KNO3

gequollene Plasmakappen. Konzentrationen (in Osmol): Abb. a: 0,97, b: 0,99, c: 0,97, d: 0,87, e: 0,66, Die Länge des Balkens entspricht 100  $\mu$ m (gilt für Abb. a-e).



Tafel 2: Stufenversuch: Allium cepa in KNO<sub>3</sub>: Abb. a: Bereits in der ersten Konzentrationsstufe haben sich Plasmasegel ausgebildet, die die Vakuole durchziehen. Diese erfahren im Laufe des Stufenversuches Formveränderungen (*Abb. b, c*), woraus ermessen werden kann, welch großen Spannungen die Zelle während des Plasmolysevorgangs ausgesetzt ist. *Abb. d, e:* Tonoplastenbildung. Konzentrationsangaben in Osmol: Abb. a: 0,66, b: 0,97, c: 0,99, d: 0,87, e: 0,66. Die Länge des Balkens entspricht 100  $\mu$ m (gilt für Abb. a–e).



©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at



#### Tafel 3:

*Abb. a*: Spirogyra sp. zentrifugiert (1300 U/min.), plasmolysiert in 1,125 osmol. Saccharose: Die Chromatophoren haben ihre Schraubenform verloren. Die hohe Konzentration bewirkte die starke Ausbildung Hechtscher Fäden.

Abb. b, c: Spirogyra sp. zentrifugiert, plasmolysiert in 1,125 osmol. KCl/CaCl<sub>2</sub>. Die Protoplasten kurzer Zellen nehmen bikonvexe Gestalt an, die längerer neigen zur Ausbildung von Teilprotoplasten, die durch "leere" oder organellenführende Plasmastränge miteinander verbunden sind.

Abb. d: Spirogyra sp.: Kontrolle, in 1,125 osmol. KCl/CaCl<sub>2</sub>: Kurze Zellen plasmolysieren bikonvex, längere bilden Teilprotoplasten; die verbindenden Plasmastränge werden vom Chloroplasten durchzogen.

*Abb. e:* In der Nähe neu entstehender Zellwände ist die Plasmaviskosität erhöht: Die Chloroplasten haben sich bereits geteilt, die zentripetale Zellwandbildung ist deutlich erkennbar (Pfeile).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

ten Zellen in einer schwachen und einer stark hypertonischen Konzentration wurden ermittelt, danach mit dem Kontrollmaterial ein Stufenversuch durchgeführt, wobei die stärkste und schwächste hypertonische Lösung jeweils der im Zentrifugenversuch verwendeten entsprach.

Es zeigte sich, daß die unkorrigierten OW des Stufenversuchs in der schwach hypertonischen Konzentration (0,584 osmol) sehr ähnlich waren (t-Test auf 95 % Niveau nicht signifikant), hingegen unterschieden sich die in beiden Versuchsreihen erhaltenen Daten in der stark hypertonischen Lösung (1,495 osmol) signifikant.

Die gemittelten OW lagen stets tiefer als die aus dem Kontrollansatz.

Durch die Vorbehandlung in der Zentrifuge verkleinerte sich das Protoplastenvolumen bei der Plasmolyse also stärker als in nicht zentrifugiertem Zustand. Die korrigierten OW mancher zentrifugierter Zellen waren proportional, andere dennoch erhöht. Bei den Zellen des Kontrollansatzes war Proportionalität nicht gegeben.

## Diskussion

## 1. Plasmolytisches Gleichgewicht

Die in Tab. 1 zusammengestellten Ergebnisse stimmen gut mit den in der Literatur gemachten Angaben überein: BUHMANN (1935) maß an Rhoeozellen, die sie in einer Saccharoselösung plasmolysieren ließ, 60 Minuten bis zum Gleichgewichtszustand. Der Plasmolysegrad änderte sich während der folgenden Stunden nicht mehr. Die von mir untersuchte Tradescantia benötigte im Mittel 50–60 Minuten in Anelektrolytlösungen, und etwa 30 Minuten in Salzlösungen. FITTING konnte an diesen Pflanzen nach 15–30minütigem Aufenthalt in KNO<sub>3</sub>-Lösungen einen konstanten Plasmolysegrad beobachten, während dieselben Zellen in gleich konzentrierter Saccharoselösung 1,5–2 Stunden bis zum Gleichgewichtszustand benötigen (HÖFLER, 1930), EL DERRY (1929a) gibt für die nah verwandte Rhoeo discolor eine Plasmolysezeit von 30 Minuten an.

Daß sich in schwach hypertonischen K<sup>+</sup>-Lösungen dreimal so rasch das PLGGW einstellt wie in Lösungen von Ca<sup>++</sup>-Salzen, wie dies WEBER (1929) und EL DERRY (l. c.) beschrieben, wurde jedoch nicht beobachtet. Auch das Verhältnis der Plasmolysezeiten, das EL DERRY (l. c.) für K<sup>+</sup>und Saccharoselösungen mit 1:15 angab, konnte nicht beobachtet werden.

Nach BECK (1927) tritt sowohl in KNO3- als in Saccharoselösungen die Plasmolyse umso rascher ein, je höher die Konzentration des Plasmolytikums ist, ab einer gewissen Konzentration jedoch verlangsamt sich dieser Prozeß.

STRASBURGER (1901) und EL DERRY (l. c.) hingegen fanden, daß die Plasmolysezeit in steigenden Konzentrationen einer Saccharoselösung sich stets verlängerte. Wie aus den in Tabelle 1 dargestellten Ergebnissen hervorgeht, dürften die von BECK (l. c.) und STRASBURGER (l. c.) gemachten Aussagen keine allgemeine Gültigkeit besitzen, sondern nur bei einigen Objekten zutreffen, wie bei Campanula, Blechnum, Spirogyra und Zygnema. Für Allium und Lamium bestätigte sich diese Aussage nicht.

Mit Ausnahme mancher Algenzellen riefen die Elektrolytlösungen rascher Plasmolyse hervor als die Anelektrolytlösungen. Nach BRAUNER (1956) plasmolysieren Spirogyren in KNO3 nicht merklich schneller als in Saccharoselösungen, Zygnema hingegen viel rascher. BRAUNER (l. c.) sieht die Ursache dafür in der unterschiedlichen Zellwandpermeabilität. Diese kann scheinbar auch innerhalb eines Gewebes, je nach Lokalisation der untersuchten Zellen, variieren: In den Außenepidermiszellen der Küchenzwiebel ruft eine hypertonische Saccharoselösung sehr spät Plasmolyse hervor (BRAUNER, l. c.), während diese in Innenepidermiszellen rasch eintritt (DE HAAN, 1933).

In manchen Spirogyrazellen war zu Beginn eine Einbuchtung der Längswände zu erkennen, die sich dem zusammenziehenden Protoplasten anschmiegte. Hatte sich das Gleichgewicht im Plasmolysevorraum eingestellt, so konnte ganz normale Plasmolyse beobachtet werden.

Diese zeitlich begrenzte Cytorrhyse tritt bei Zellen, die eine hohe Wasserpermeabilität besitzen, auf (URL, 1974) und ist darauf zurückzuführen, daß Wasser rascher aus der Zelle als Plasmolytikum in die Zelle gelangt (BECK, l. c.).

Die Beobachtung HÖFLERs (1928), daß Zellen in K/Ca-Lösungen besonders rasch plasmolysieren, konnte nicht bestätigt werden.

Da die PVM nur angewendet werden soll, wenn das Plasma und seine Membranen für das Plasmolytikum völlig impermeabel ist, soll hier auf Veränderungen, die sich durch die *Permeation* ergeben, bewußt nicht eingegangen werden.

Mit Ausnahme der Algenzellen wurden alle Schnitte vor Versuchsbeginn gewässert, um durch die Wasseraufnahme die Viskosität des Plasmas herabzusetzen. Die Protoplasten lösen sich sodann leichter von der Zellwand (HÖFLER, 1918c) und die Abrundung der Menisken erfolgt rascher (FITTING, 1915, KACMAREK, 1929).

Nach WEIS (1926) und HANSTEEN-CRANNER (1922) treten die Hechtschen Fäden (HF) nach langer Wässerung hingegen besonders deutlich hervor, was lange Zeit als Indiz für die Erhöhung der Plasmaviskosität betrachtet wurde.

Erst sublichtmikroskopische Untersuchungen (MERCER, 1956, KOLLMANN & SCHUMACHER, 1962, SITTE & FALK, 1963) ergaben, daß die HF binnenplasmatische Anteile, u. a. Cytoskelettelemente wie Aktinstränge und Mikrotubuli, beinhalten und von Plasmalemma gänzlich umschlossen sind. Der Begriff Grundplasma mußte erneut hinterfragt und definiert werden und bezeichnet nun die auch im sublichtmikroskopischen Bereich strukturlose Substanz, in die Organellen und Cytoskelettelemente eingebettet sind. Die Viskosität ist also letztlich abhängig vom Polymerisationsgrad der Cytoskelettelemente, dem Grundplasma und der Elastizität der Membranen (Wandhaftung).

Es ist bekannt, daß der Zustand der Cytoskelettanteile selektiv durch Colchizin und Cytochalasin B verändert werden kann (BORISY und TAYLOR, 1967, WESSELS et al., 1971). In diesem Zusammenhang wäre es von großem Interesse, die nach der PVM bestimmten OW nach Colchzinund Cytochalasinbehandlung mit denen unbehandelter Zellen zu vergleichen. Auch die Veränderungen, die nach mechanischer Behandlung (Zentrifugieren) auftraten, müssen noch näher untersucht werden.

Häufig konnte ich beobachten, daß Zellen, die sich längere Zeit in hypertonischer Saccharoselösung befanden, "erstarrt" waren, ähnlich wie dies in Mannitol zu beobachten ist (LEE-STADELMANN & STADELMANN, 1989). Bei noch stärkerer Plasmolyse vollzog sich die Kontraktion  $\pm$ ruckartig, die Menisken waren oft flacher als zu Beginn der Plasmolyse. Nach GARDINER (1884) und CHODAT & BOUVIER (1898) führt besonders die Plasmolyse in stark hypertonischen Kochsalzlösungen zur Ausbildung dicker Plasmastränge, die die Verbindung zwischen plasmolysiertem Protoplasten und Zellwand aufrecht erhalten.

Neben den Eigenschaften des Plasmolytikums beeinflußt die Temperatur die Plasmaviskosität (NEMEC, 1901, WEBER, 1917, WEBER & HOHENEGGER, 1923): Bei 4° C wird das sich von der Zellwand lösende Plasmalemma geschädigt, eine Neubildung von Membransubstanz ist unter diesen Bedingungen nicht möglich (BECK, l. c.). Bei einer Temperatur von 25° C ist die Viskosität minimal (WEBER, 1925b). Schon DE VRIES (1885) hatte festgestellt, daß die Erwärmung des Protoplasten die Abkugelung begünstigt.

Frisch aus dem Glashaus geholte Algenproben besaßen eine Temperatur um 10–12°C, die Raumtemperatur im Labor betrug 20–25°C. Eine Veränderung der Viskosität, bedingt durch Temperaturdifferenzen (5–10°C), kann nicht ausgeschlossen werden. Weiters ist die Viskosität vom Alter der Zelle abhängig (ALBACH, 1931) und, bei Conjugaten, von der Kopulationsbereitschaft (WEBER, 1924a, 1925a, b, d, LLOYD, 1926).

Die Kontraktion des Protoplasten kann ferner auch durch Plasmafäden, die den Kontakt mit der Zellwand und darüber hinaus zu benachbarten Zellen darstellen, behindert sein (BUHMANN, l. c., HECHT, 1912). Besonders in der Nähe neu gebildeter Zellwände ist die Wandhaftung besonders stark (GERM, 1930 a, b, c).

Beim ersten Ablösen von der Zellwand kommt es zu strukturellen Veränderungen im Plasmalemma (HECHT, l. c., WEBER, 1925a, JOCHIMS, 1930), wahrscheinlich im gesamten Protoplasten (KÜSTER, 1910b, 1912, LEPESCHKIN, 1927, GERM, 1933a, b, ALBACH, l. c.), so daß sich die Frage stellt, ob sich der plasmolysierte Protoplast noch mit den Eigenschaften des nicht plasmolysierten vergleichen läßt.

## 2. Unterschiede zwischen "Meniskusformel" und "Grundformel"

In den angestellten Versuchen fielen die OW, ermittelt nach der Meniskusformel, etwas höher aus als die nach der Grundformel berechneten. Da die Versuchsbedingungen diese Unterschiede nicht bewirken konnten – es handelte sich ja um Zellen, die photographiert worden waren und später nach beiden Formeln ausgewertet wurden –, müssen andere Ursachen gesucht werden. So kommt die Oberfläche des Protoplasten in Betracht, die, je nach angewendeter Formel, verschieden groß ist. Es ist möglich, daß bei Zellen mit flachen Menisken, bedingt durch die geringere Oberfläche, eine kleinere Menge osmotisch wirksamer Substanz an die Plasmamembran gelangt. Da sich die Zelle aber im PLGGW befindet, kann der Zeitfaktor unbeachtet bleiben. Auch die Viskosität der Zelle kann nicht die Ursache sein.

Die Meniskusformel geht also nur genauer auf die Maße der Zelle ein.

### 3. Unterschiede zwischen PVM und GPM

Aus den dargelegten Ergebnissen ist ersichtlich, daß die nach der GPM ermittelten OW etwas höher lagen als die nach der PVM errechneten. Die Ursache für die Differenz ist durch die Wandhaftung zu erklären. Vom Standpunkt der Thermodynamik ist die Saugspannung, also die Differenz zwischen der Konzentration des Zellsaftes und der, je nach angewendeter Methode, ± hohen Konzentration des Außenmediums, mit einer Feder vergleichbar, die im Falle der GPM nur leicht gedehnt, bei Anwendung der PVM aber sehr stark gedehnt wird. Damit überhaupt Grenzplasmolyse eintritt, muß ja das Plasmolytikum einen höheren osmotischen Druck besitzen als der Zellsaft der untersuchten Zelle. Je nach Festigkeit der Wandhaftung können sich so verschieden starke Abweichungen vom wahren osmotischen Wert ergeben. Ist die Differenz zwischen dem neuen OW und dem OW der unplasmolysierten Zelle nun noch sehr groß, so wird die Kraft, mit der das Plasma von der Zellwand weggezogen wird, größer sein als bei der GPM. Die Plasmafäden werden daher nach und nach abreißen und eine weitere Kontraktion ermöglichen. Befindet sich die Zelle jedoch in einer schwach hypertonischen Lösung, so werden die auftretenden Spannungen in einer Größenordnung liegen, die vom Plasma gerade noch ertragen werden können. Das Volumen des Protoplasten entspricht nicht dem Volumen, das das Plasma in Abwesenheit der HF einnehmen würde. Nach diesen Erwägungen ist also eine stark hypertonische Lösung einer schwächeren vorzuziehen. Gerade in der freien Wahl der Konzentration liegt ja ein Vorteil der PVM.

Besonders auffallend war, daß die Differenzen zwischen den nach der PVM und der GPM ermittelten OW der Einzelzellen etwa eine Zehnerpotenz kleiner ausfielen als die Differenzen der Zufallsstichproben. Diese Differenzen waren bei Blechnum am geringsten, bei Campanula hingegen sehr hoch. Die Ursache dafür liegt vermutlich in der Stärke des Plasmawandbelages sowie in dessen Viskosität. Eine weitere Ursache scheint die Individualität der Zelle zu sein. Es ist bekannt, daß sogar benachbarte Zellen eines Gewebes nicht mit derselben Geschwindigkeit plasmolysieren müssen (BECK, l. c., KÜSTER, 1927).

## 4. Stufenversuche

Wie aus den Tabellen 3.5.–3.6. ersichtlich ist, verhielten sich die Volumina der in verschieden stark hypertonischen Lösungen plasmolysierten Protoplasten nicht gänzlich proportional: In Saccharoselösungen ergaben sich Unterschiede zwischen den OW, die in schwach und stark hypertonischer Konzentration erhalten wurden, in den KNO<sub>3</sub>-Lösungen erhöhten sich die OW mit zunehmender Plasmolysedauer. Während die meisten der in Saccharose plasmolysierten Zellen nach der Protoplasmakorrektur völlig proportional waren (vergl. K-Werte in den verschiedenen Konzentrationen in Tab. 3.5. und 3.6.), fielen die K-Werte in KNO<sub>3</sub>-Lösungen ständig oder schwankten ± stark.

Folgende Erklärungen bieten sich an:

1. Der OW der Zelle/des Gewebes bleibt während der gesamten Versuchsdauer konstant (in Saccharoselösungen): Die erhöhten OW sind auf die mangelnde Kontraktionsfähigkeit der Protoplasten zurückzuführen.

2. Eine Erniedrigung des K-Wertes resultiert aus einer übermäßigen Vergrößerung der Differenz zwischen  $O_1$  und  $O_2$ , die bei exakter Versuchsführung entweder auf das in die Vakuole eindringende Plasmolytikum zurückgeführt werden kann, oder auf die Quellung des Plasmas (s. Tafel 2: Stufenversuch in KNO<sub>3</sub>, Kappenplasmolyse).

Während des Versuches verändert das Plasmolytikum dann also die Eigenschaften des Protoplasten oder eines Teiles des Protoplasten so, daß dieser sein Volumen vergrößert.

ad 1. Für die Saccharose-Stufenversuche scheint die erste Erklärung zutreffend zu sein. Nur an wenigen Zellen waren Schwankungen zu beobachten. Stufenversuche in Saccharose gelangen, wenn die Zuckerlösungen vor Versuchsbeginn Raumtemperatur angenommen hatten. Gelangten frisch aus dem Eiskasten entnommene Lösungen zur Anwendung, so war der Plasmolysegrad weder in schwach hypertonischen noch in stärker konzentrierten Lösungen meßbar, die Menisken rundeten sich sehr spät ab und das Protoplasma wirkte zäh. Im Zusammenhang mit der beschriebenen Abhängigkeit der Viskosität von der Temperatur ist diese Beobachtung erklärbar.

ad 2. Besonders in Elektrolytlösungen ist eine Permeation nicht zu verhindern. Die Zellen nehmen in aufeinanderfolgenden Zeiträumen ungleiche Mengen des Plasmolytikums auf (HÖFLER, 1919). In manche Zellen dringt weniger Plasmolytikum ein als in andere (FITTING, l. c.). An den untersuchten Zellen konnte die Permeation von KNO<sub>3</sub>, abhängig von der gewählten Konzentration nach 1–1,5 Stunden, beobachtet werden.

Gelangt das Salz nur ins Binnenplasma, so erhöht sich dort die Konzentration der K+-Ionen, das Plasma wird auf osmotischem Wege Wasser aufnehmen müssen, es wird quellen. Die Vakuole, die ja keine Konzentrationserhöhung erfährt, wird ihr Volumen nicht verändern. Solches Verhalten zeigen die Zellen auf der Tafel 1: Die Vakuole, die auf den letzten drei Bildern besonders deutlich zu erkennen ist, ändert ihr Volumen nicht, wohl aber können sich die Plasmakappen (HÖFLER, 1928) je nach Konzentration der Außenlösung vergrößern oder verkleinern. Nach HÖFLER (1919) ist dieses reversible Quellungsvermögen nur an gesunden Zellen zu beobachten, während im Absterben befindliche Protoplasten irreversibel gequollen sind (HÖFLER, 1919). Bei einer anschließenden Deplasmolyse müßten also die jeweiligen Plasmolysegrade in der umgekehrten Reihenfolge angetroffen werden. Diese Beobachtung wurde in orientierenden Versuchen nicht gemacht. Daraus läßt sich schließen, daß die durch das Salz hervorgerufene Quellung die Eigenschaften des Plasmas doch irreversibel verändert.

Kann das Salz auch den Tonoplasten durchdringen, so muß sich (auch) das Volumen des Zellsaftes vergrößern. In beiden Fällen wird ein zu großer Plasmolysegrad vorgetäuscht.

Die aus der Plasmolyse in Salzlösungen resultierenden OW sind auch nach der Protoplasmakorrektur nicht proportional.

## 5. Zentrifugenversuche

Die Abbildungen a, b und c in Tafel 3 zeigen, daß der schraubenförmig gewundene Chromatophor nach dem Zentrifugieren seine Gestalt nicht mehr behalten hat und in eine Ecke des Protoplasten zusammengedrängt wurde. Ein Großteil des Plasmas findet sich dort. Den größten Teil nimmt die Vakuole ein, die nun besonders deutlich zu sehen ist. Der Tonoplast läßt sich als stark hervortretende Kontur erkennen.

Die Federwirkung des Chromatophors und die Viskosität des Plasmas scheinen also in diesem Zustand keinen Einfluß auf den Plasmolysegrad zu haben. Selten zeigten sich Hechtsche Fäden, die Wandhaftung scheint also in der Mehrzahl der Fälle ebenfalls minimiert zu sein. Einzig und allein die Vakuole selbst kann nun also für die Größe des Plasmolysegrades verantwortlich sein. Da völlige Proportionalität trotzdem nicht beobachtet wurde, muß angenommen werden, daß während des Zentrifugierens die Membranen in ihrem Aufbau so verändert wurden, daß bei der anschließenden Plasmolyse Stoff eintreten konnte.

Es zeigte sich, daß die Chromatophoren der Zellen, die nach dem Zentrifugieren in K/Ca-Mischlösungen gebracht wurden, rascher wieder ihre Schraubenform annahmen als die mit Zucker- oder KNO<sub>3</sub>-Lösung behandelten Zellen. Scheinbar kann die Anwesenheit der Ca<sup>++</sup>-Ionen die Restitution des Chloroplasten beschleunigen. Weiters wurde in Ca<sup>++</sup>- Die Plasmolytisch-Volumetrische Methode Höflers - Eine kritische Beurteilung 135

hältigen Lösungen keine Quellung, in KNO3 jedoch bisweilen sehr starke Quellung beobachtet.

Zuckerlösungen bewirkten die verstärkte Ausbildung Hecht'scher Fäden.

Während besonders lange Zellen des Kontrollansatzes zur Teilprotoplastenbildung neigten, der Chromatophor die völlige Trennung aber verhinderte, plasmolysierten kurze Zellen einfach, d. h. ihre Protoplasten nahmen konvexe Gestalt an. Die Protoplasten langer, zentrifugierter Zellen besaßen ebenfalls häufig Teilprotoplasten, waren aber nicht mehr durch den Chloroplasten verbunden. Hingegen fanden sich manchmal Plasmastränge, die z. T. "leer" waren, z. T. Organellen beinhalteten (s. Abb. c in Tafel 3). Das Plasma dieser langen Zellen schien also stärker viskos zu sein als das kurzer Zellen.

Besonders in der Nähe neu gebildeter Zellwände war die Ausbildung der HF, die den Protoplasten an der neu gebildeten oder entstehenden Zellwand verankerten, zu beobachten (s. Abb. e in Tafel 3).

## 6. Kritik an der Arbeit HÖFLERs

In der 1918 veröffentlichten Dissertation (HÖFLER, 1918a) werden hauptsächlich Stufenversuche geschildert. Die Versuchsobjekte waren Tradescantia guianensis und Gentiana sturmiana. Als Plasmolytikum dienten Saccharose- und KNO<sub>3</sub>-Lösungen. Sämtliche Versuchsergebnisse wurden an einzelnen, zu Versuchsbeginn ausgewählten Zellen durchgeführt, entsprechen also den "Einzelzellversuchen" aus Kapitel 3. Die statistische Auswertung beschränkt sich auf die Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung aller berechneter Daten (Plasmolysegrad und OW) eines Versuches.

Ausreißertests werden willkürlich durchgeführt: Unterscheidet sich ein Wert auch nur um einige Tausendstel Osmol von den übrigen, "paßt" er also nicht in die Reihe der übrigen Daten, so wird er eliminiert, der Mittelwert anschließend neu berechnet. Abgesehen davon, daß eine solche Reinigung des Datensatzes jeglicher mathematischer Grundlage entbehrt, ist das Entfernen von sogenannten Ausreißern grundsätzlich nicht ratsam, ist doch jeder Wert ein Ergebnis, das zwar hinterfragt, aber nicht nihiliert werden soll. (Ausreißertests werden in den meisten Statistikbüchern gar nicht beschrieben!) Eine Begründung, warum ein Ausreißer entfernt wird, gibt HÖFLER selten.

Signifikanztests werden nicht durchgeführt. Die Entscheidung, ob sich zwei verglichene Datensätze voneinander unterscheiden, erfolgt ohne mathematische Berechnung. Vermutlich ist sie abhängig vom Faktum, das bewiesen werden soll. Aufgrund der äußerst geringen Stichprobenumfänge ist eine statistische Auswertung der HÖFLERschen Ergebnisse nicht möglich. Die wenigen, veröffentlichten Versuchsergebnisse wurden hier nochmals betrachtet, und, soweit möglich, mit denen aus Kapitel 3 verglichen: Untersuchungen, um den Zeitraum, in dem PLGGW herrscht, festzustellen, wurden von HÖFLER nicht durchgeführt. Vielmehr wurden die Schnitte einige Stunden (über Nacht), 1–2 Stunden, oder auch nur 20 Minuten in die Plasmolytika eingebracht. Wie wir aus Kapitel 3 wissen, ist der Zeitraum, der vom Einlegen bis zur Messung des Plasmolysegrades verstreicht, aber nicht gleichgültig. Abhängig vom verwendeten Plasmolytikum, sind also sehr verschiedene Ergebnisse zu erwarten. Die veröffentlichten Versuchsergebnisse zeigen diese Unterschiede aber nicht. So stimmen die OW der Zellen, die jeweils 2 Stunden in verschiedenen, mäßig hypertonischen Salzlösungen plasmolysiert worden waren, überein. In weiteren, nicht veröffentlichen Versuchen soll der Grad der Übereinstimmung noch größer gewesen sein.

Vergleiche zwischen der GPM und der PVM wurden von HÖFLER nicht angestellt. Die Möglichkeit, den Fehler, der durch den nichtlösenden Raum gegeben ist, durch Zentrifugieren zu minimieren, wird zwar vorgeschlagen, Versuche werden aber nicht durchgeführt.

Bei der Bestimmung des OW eines ganzen Gewebes ist die Angabe eines Mittelwertes alleine, wie von HÖFLER angewendet, nicht sinnvoll; ohne die Standardabweichung, die ja die Streuung der Einzeldaten angibt, verliert die Aussage ihre Bedeutung. Keinesfalls aber scheinen die Einzeldaten einer Stichprobe, die einen repräsentativen Umfang besitzt, so ähnlich zu sein, wie von HÖFLER beschrieben. Es muß vermutet werden, daß eine größere Zellzahl untersucht wurde, als in den Versuchsprotokollen wiedergegeben wird, mit anderen Worten nur die "schönsten" Ergebnisse ausgewählt wurden.

Die PVM dürfte zur Bestimmung einzelner Plasmolysegrade geeignet sein, die Messung ganzer Gewebeschnitte scheint aber, bedingt durch die Verschiedenheit der einzelnen Zellen in Form, Größe, Alter und physiologischem Zustand, ohne die Angabe der Standardabweichung nicht ratsam.

#### Literatur

- ALBACH, W. (1931): Über die schädliche Wirkung der Plasmolyse und Deplasmolyse. Protoplasma 12, 254–267.
- BECK, W. (1927): Cane sugar and potassium-nitrate as plasmolysing agents. Protoplasma 1927, 1, 15.
- BORESY, G. G., & TAYLOR, E. W. (1967) (zit. in Wessels et al.).
- BRAUNER, L. (1956): Handbuch der Pflanzenphysiologie (Die Permeation der Zellwand). Springer-Verlag Wien.
- BUHMANN, A. (1935): Kritische Untersuchungen über vergleichende plasmolytische und kryoskopische Bestimmung des osmotischen Wertes bei Pflanzen. Protoplasma 23, 579–612.
- CHODAT & BOUVIER (1898): Sur la plasmolyse et la membrane plasmique. Journ. d. Bot. Tome 12. (zit. El Derry 1929).
- DERRY EL, B. H. (1929): Plasmolyseform- und Plasmolysezeitstudien. Protoplasma 1930, Bd. 8, p. 1.

Die Plasmolytisch-Volumetrische Methode Höflers - Eine kritische Beurteilung 137

- FITTING, H. (1915): Untersuchungen über die Aufnahme von Salzen in die lebende Zelle. Prigsh. Jb. f. wiss. Bot. Bd. 56, p. 1.
- GARDINER, W. (1884): On the continuity of the protoplasm through the walls of vegetable cells. Arch. Bot. Inst. Würzburg, Bd. 3.
- GERDENITSCH, W. (1984): Microscopic Contributions to the Pressure-Volume Diagram of the Cell-Water Relations as Demonstrated with Tissue Cells. Protoplasma 119, 35–47.
- GERM, H. (1933a): Untersuchungen über die systrophischen Inhaltsverlagerungen in Pflanzenzellen nach Plasmolyse I. Protoplasma 1933, 14, 566.
- GERM, H. (1933b): Untersuchungen über die systrophischen Inhaltsverlagerungen in der Pflanzenzelle bei Plasmolyse II. Protoplasma 1933, 17, 509.
- GERM, H. (1933c): Untersuchungen über die systrophischen Inhaltsverlagerungen in der Pflanzenzelle bei Plasmolyse III. Protoplasma 1933, 18.
- HAAN DE, I. (1933): Protoplasmaquellung und Wasserpermeabilität. Rec. des Travaux bot. neerl. 1933, 234.
- HANSTEEN-CRANNER, B. (1922): Zur Biologie und Physiologie der Grenzschichten lebender Pflanzenzellen. Meldinger fra Norges Landsbrucks 2, 1.
- HECHT, K. (1912): Studien über den Vorgang der Plasmolyse. Cohn's Beitr. z. Biol. 1912, 11, 137.
- HÖFLER, K. (1918a): Eine Plasmolytisch-Volumetrische Methode zur Bestimmung des osmotischen Wertes in Pflanzenzellen. Denkschrift der Kaiserl. Akad. d. W., Math. Natw. Kl. Bd. 95, p. 98–170.
- HÖFLER, K. (1918b): Über die Permeabilität der Stengelzellen von Tradescantia elongata für Kalisalpeter. Ber. d. dt. bot. Ges. 1918, XXXVI, Heft 7.
- HÖFLER, K. (1919): Über den zeitlichen Verlauf der Plasmadurchlässigkeit in Salzlösungen I. Ber. d. dt. bot. Ges. 1919, XXXVII, Heft 8.
- HÖFLER, K. (1920): Ein Schema für die osmotische Leistung der Pflanzenzelle. Ber. d. dt. bot. Ges. 38, 288–298.
- HÖFLER, K. (1928): Über Kappenplasmolyse. Ber. d. dt. bot. Ges. XLVI, 1928.
- HÖFLER, K. (1930): Über die Eintritts- und Rückgangsgeschwindigkeit der Plasmolyse. – Eine Methode zur Bestimmung der Wasserpermeabilität des Protoplasmas. Jahrb. f. wiss. Bot. 73.
- JOCHIMS, J. (1930): Über das Fadenziehen biologischer Substanzen. Protoplasma 1930, 9, 298.
- KACZMAREK, A. (1929): Untersuchungen über die Plasmolyse und Deplasmolyse in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration. Protoplasma 6, 209.
- KOLLMANN, R., & SCHUMACHER, W. (1962): Über die Feinstruktur des Phloems von Metasequoia glyptostroboides und seine jahreszeitlichen Veränderungen II. Planta 58, 366–386.
- KÜSTER, E. (1910b): Über die Veränderungen der Plasmaoberfläche bei Plasmolyse. Zeitsch. Bot. 1910, 2, p. 689.
- KÜSTER, E. (1927): Beiträge zur Kenntnis der Plasmolyse. Protoplasma 1927, 1, p. 73.
- LEE-STADELMANN, O. Y., & STADELMANN, E. J. (1989): Plasmolysis and Deplasmolysis. Methods in Enzymology, Vol. 174, Part U, 1989.

- LEPESCHKIN, W. W. (1909): Über die Permeabilitätsbestimmung der Plasmamembran für gelöste Stoffe. Ber. d. dt. bot. Ges. 27.
- LEPESCHKIN, W. W. (1927): Über den Zusammenhang zwischen mechanischer und chemischer Schädigung und der Wirkung einiger Schutzstoffe. Protoplasma 1927, Bd. 2, p. 239.
- LLOYD, F. (1926): Maturation and Conjugation in Spirogyra longata. Trans. Roy. Canad. Inst. Toronto, 15, p. 151.
- MERCER, F. V. (1956): Water relations of plant cells. Proc. Linn. Soc. New South Wales 80, 6–29, (zit. in Sitte & Falk, 1963).
- NEMEC, B. (1901): Über die Wahrnehmung des Schwerkraftreizes bei den Pflanzen. Jb. f. wiss. Bot. 36.
- PALTA, J. P., & LEE-STADELMANN, O. Y. (1983): Vacuolated plant cells as ideal osmometer: reversibility and limits of plasmolysis, and estimation of protoplasm volume in control and water-stress-tolerant cells. Plant, Cell and Environment, 6, 601–610, 1983.
- SITTE, P., & FALK, H. (1963): Zellfeinbau bei Plasmolyse I. Protoplasma 57, p. 290 ff.
- STRASBURGER, E. (1901): Über Plasmaverbindungen pflanzlicher Zellen. Jb. f. wiss. Bot. 36, 493–610.
- STRUGGER, S. (1931): Zur Analyse der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Erythrosin. Ber. d. dt. bot. Ges. 49, 453–476.
- STRUGGER, S. (1941): Praktikum der Zell- und Gewebsphysiologie der Pflanze. 2. Aufl., Springer Verl. Berlin.
- URL, W. G. (1974): Plasmolyse und Cytorrhyse. Wiss. Film C1144, IWF Göttingen.
- VRIES DE, H. (1877a): Untersuchungen über die mechanischen Ursachen der Zellstreckung ausgehend von der Einwirkung von Salzlösungen auf den Turgor wachsender Pflanzenzellen. Leipzig 1877, W. Engelmann.
- VRIES DE, H. (1877b): Über die Ausdehnung wachsender Pflanzenzellen durch ihren Turgor. Bot. Ztg. 35. Jg., No. 1, p. 2.
- VRIES DE, H. (1884a): Zur plasmolytischen Methodik. op. coll. II, p. 128.
- VRIES DE, H. (1884b): Eine Methode zur Analyse der Turgorkraft. op. coll. II.
- WEBER, F. (1917): Die Temperaturabhängigkeit der Plasmaviskosität. Ber. d. dt. bot. Ges. Bd. 34.
- WEBER, F. (1925a): Plasmolyseform und Ätherwirkung. Pflüg. Arch. Bd. 208, p. 705.
- WEBER, F. (1925b): Über die Beurteilung der Plasmaviskosität nach der Plasmolyseform. Zeitsch. wiss. Mikr. 42, p. 146.
- WEBER, F. (1925d): Physiologische Ungleichheit morphologisch gleicher Zellen.Ö. bot. Ges. Bd. 74, 1925.
- WEBER, F. (1929a): Plasmolyseform-Zeitmethode. Protoplasma 1929, Bd. 5, 622.
- WEBER, F. (1929b): Plasmolyseort. Protoplasma 1929, Bd. 7, p. 583.
- WEBER, F., & HOHENEGGER (1923): Reversible Viskositätserhöhung bei Kälte. Ber. d. dt. bot. Ges. 41.
- WEIS, A. (1926): Beiträge zur Kenntnis der Plasmahaut. Planta 1.

- WERTH, W. (1961): Vergleichende Untersuchungen über die relative Wasserpermeabilität der Protoplasten für Alkohol und Wasser. Protoplasma 1961, LIII, Heft 4.
- WESSELS, N. K., SPOONER, B. S., ASH, J. F., & BRADLEY, M. O. (1971): Microfilaments in cellular and developmental processes. Sience, 171, 135.

Anschrift des Verfassers: G. Scheberle, A-1091 Wien, Althanstraße 14, Institut für Pflanzenphysiologie, Abteilung Zellphysiologie und Protoplasmatik.

# ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: <u>Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften</u> mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse

Jahr/Year: 1990

Band/Volume: 198

Autor(en)/Author(s): Scheberle G.

Artikel/Article: <u>Die Plasmolytisch-Volumetrische Methode Höflers. Eine kritische</u> Beurteilung. 111-139