

# Das Fluoreszenzmikroskop im Dienste der Pflanzenphysiologie<sup>1)</sup>

Von

A. FREY-WYSSLING

(Pflanzenphysiologisches Institut der E. T. H. Zürich)

Das Fluoreszenzmikroskop macht von der Tatsache Gebrauch, dass viele lichtabsorbierende Verbindungen (Farbstoffe, Pigmente) einen Teil der aufgenommenen Lichtenergie als Fluoreszenzlicht wieder ausstrahlen. Dieses emittierte Licht besitzt für jeden fluoreszierenden Stoff ein spezifisches Spektrum. Es ist stets langwelliger als das Erregerlicht; im übrigen besteht jedoch keine Abhängigkeit vom Spektrum der Lichtquelle. Chlorophyll fluoresziert z. B. rot, indem es Licht von 685 m $\mu$  Wellenlänge aussendet. Ob wir nun Chloroplasten mit weissem, mit monochromatischem blauem oder mit ultraviolett Licht beleuchten, stets schicken sie das gleiche charakteristische Fluoreszenzrot aus.

Das Fluoreszenzlicht ist indessen sehr schwach; es wird daher von der Lichtquelle überstrahlt, so dass es unsichtbar bleibt, wenn wir nicht mit Dunkelfeldbeleuchtung arbeiten. Ein dunkler Hintergrund kann auch erreicht werden, wenn wir zur Erregung ultraviolettes Licht verwenden. Damit werden zwei für die Fluoreszenzmikroskopie unerlässliche Bedingungen in idealer Weise erfüllt: 1. ist das UV-Licht unsichtbar und 2. bedingt seine Kurzwelligkeit, dass alle mit sichtbarem Lichte, vor allem auch blau und violett fluoreszierende Substanzen eines Präparates aufleuchten. Da das UV-Licht das menschliche Auge schädigt, ist seine Unsichtbarkeit allerdings nicht gefahrlos; es muss deshalb auf das Okular ein Sperrfilter (Euphosglas) gelegt werden, so dass nichts von diesem unsichtbaren Lichte ins Auge fällt.

Bis zum Objekt muss die Mikroskopoptik für UV-Licht durchlässig sein. Die gesamte Beleuchtungsoptik, Kondensor und Objektträger, bestehen daher aus Quarz. Das unsichtbare Erregerlicht lässt dann die fluoreszierenden Partien eines Präparates zu in charakteristischer Farbe selbstleuchtenden Objekten werden. Dieses sichtbare Licht wird durch die gewöhnliche Mikroskopoptik aus Glas beobachtet.

Da Lignin blau fluoresziert, Zellulose dagegen nicht, kann man die Verholzung der Pflanzen auf Schnitten verfolgen. Ebenso lässt sich die Verteilung von Alkaloiden und Glukosiden studieren, da die meisten dieser Verbindungen Fluoreszenz zeigen. Neue Erkenntnisse hat man jedoch auf diese Weise kaum gewonnen, da es mikrochemische Reaktionen für den Nachweis des Lignins und der übrigen fluoreszierenden Stoffe gibt. Man kann daher höchstens von einer Vereinfachung der Arbeitsmethode sprechen, weil die Schnitte

<sup>1)</sup> Nach dem an der Hauptversammlung der N. G. Z. am 2. Juni 1947 gehaltenen Vortrag.

in ungefärbtem Zustande zur Untersuchung gelangen und sehr kleine Stoffmengen leicht nachgewiesen werden können.

Wesentlich anders gestalteten sich die Verhältnisse, als man entdeckte, dass fluoreszierende Farbstoffe (sogenannte Fluorochrome) in die Pflanze gebracht und ihre Wanderwege verfolgt werden können. Die Einführung von Farbstoffen in die Leitbahnen ist zwar nicht neu. Es braucht nur an die Rotfärbung weisser Blüten von in Eosin eingestellten Trieben erinnert zu werden. Um den Farbeffekt wahrzunehmen, müssen aber so hohe Farbstoffkonzentrationen verwendet werden, dass die eingeführten Fremdstoffe giftig wirken und die lebenden Zellen abtöten. Die Fluorochrome kann man jedoch, ohne ihre Fluoreszenz wesentlich zu schwächen, bis zur völligen Unschädlichkeit verdünnen. Dadurch ist das Fluoreszenzmikroskop zum wichtigsten Untersuchungsinstrument für die Physiologie der Stoffwanderung in der Pflanze geworden.

## 1. Wasserleitung

In den Landpflanzen sind zwei Wanderwege bekannt, die beide in den Leitbündeln lokalisiert sind. Im Gefässteil (Xylem) der Leitbündel erfolgt der aufsteigende Transpirationsstrom als wässriger Rohsaft (frz.: *sève brute*) und im Siebteil (Phloem) der absteigende Assimilationsstrom als zuckerreicher Bildungssaft (frz.: *sève élaborée*). Im deutschen Sprachgebrauch werden die beiden Transportarten in wenig zutreffender Weise als Wasserleitung und Stoffleitung auseinandergelassen.

Die Wasserleitung beginnt mit der Wasseraufnahme durch die Wurzelhaare im Boden. Dieses Wasser gelangt durch die Lebenstätigkeit der Zellen in der Wurzelrinde in den Gefässteil des zentral gelegenen Wurzeleitbündels. Die Zellen des Gefässteiles sind plasmafrei und bilden daher ein passives Leit-system. Dieses besteht in den Wurzelspitzen aus kurzen Leitzellen (Hydrozyten), die nach oben durch längere Zellen (Tracheiden) abgelöst werden. Schliesslich verschmelzen bei den Angiospermen die wasserleitenden Zellen durch Auflösung der Querwände zu mehrere Dezimeter bis Meter langen Kapillaren (Tracheen). Durch diese Gefässe gelangt das aufsteigende Wasser mit grosser Geschwindigkeit zu den Blattstielen hinauf und in die Blätter hinaus.

Die Strömungsgeschwindigkeit kann im Blattstiel gemessen werden, wenn man ein durchscheinendes Blatt in eine sehr verdünnte Lösung eines geeigneten Fluorochromes (z. B. Oxypyren-disulfonsaures Na) einstellt. Bringt man nun das Blatt vor ein schwarzes Lichtfilter, das UV-Licht durchtreten lässt (Schott *UG<sub>2</sub>*-Filter), und beleuchtet es in der Dunkelkammer durch dieses Schwarzfilter mit einer Bogenlampe, so kann man den Aufstieg des Transpirationswassers messend verfolgen. STRUGGER (1) hat mit dieser Methode Strömungsgeschwindigkeiten von 60 cm/min gemessen. Es ist eindrucksvoll, wie der leuchtende Wasserstrom durch den Blattstiel hinaufschiesst und sich dann

regelmässig auf alle Blattnerven verteilt. Von den Nerven erster Ordnung gelangt er in die Nerven zweiter Ordnung usw., bis er schliesslich die Nervenendigungen erreicht.

Gegen die Nervenenden erscheinen die Wasserleitelemente im Gefässsteil wieder kürzer; die Tracheen werden von Tracheiden und diese schliesslich von Hydrozyten abgelöst. Diese sind von lebenden Zellen des Blattparenchyms umgeben, und man hat bisher angenommen, dass das Wasser auf osmotischem Wege aus den Hydrozyten geschöpft und von Zelle zu Zelle bis zur Epidermis weitergegeben werde. Man stellte sich also vor, dass die intrafaszikuläre Wasserleitung im Lumen der plasmafreien Leitzellen von einer extrafaszikulären plasmatischen Wasserleitung abgelöst werde.

Die Beobachtung im Fluoreszenzmikroskop enthüllt jedoch andere Verhältnisse. Das Fluorochrom wird nicht von den Zellen aufgenommen, sondern es breitet sich zwischen den lebenden Protoplasten in den Zellwänden aus und erreicht in schneller Fahrt die Epidermis, wo es sich anhäuft. Die Anreicherung ist die Folge der Wasserverluste durch die Transpiration. Besonders stark aufleuchtende Stellen sind Orte bevorzugter Transpiration; als solche erweisen sich: die Antiklinen der Epidermis, die Kutikularleisten der Stomata, die basalen Teile lebender, besonders jüngerer Haare.

Diese Beobachtungen zeigen, dass das Transpirationswasser nicht durch die Protoplasten, sondern durch die Zellwände, um den lebenden Zellinhalt herum, nach aussen wandert. Es ist allerdings STRUGGER vorgeworfen worden, er habe Zellwandfarbstoffe als Fluorochrome verwendet, und es sei daher nicht erstaunlich, dass sie nicht ins Plasma eindringen und sich in den Zellwänden anhäufen. Die Frage bleibt daher offen, ob nicht auch Wasser durch die Zellen wandere; aber jedenfalls steht fest, dass die Zellwände für wässrige Lösungen sehr leicht wegsam sind und dass sich Inhaltsstoffe des Transpirationswassers in den Zellwänden rasch ausbreiten.

Eine andere Kritik muss ernster genommen werden. Die Beobachtungen STRUGGER's (2) haben die Diskussion über das Wesen des Saftsteigens in den Pflanzen wieder aufleben lassen. Es stehen sich da zwei verschiedene Anschauungen gegenüber: nach der einen saugen die lebenden Zellen das Transpirationswasser in die Blätter hinauf, während die andere den Verdunstungsmechanismus zu Hilfe nimmt. Nach diesem Mechanismus, der ohne lebende Zellen auskommt, würde in der Epidermis an Stelle jedes verdunsteten Wassermoleküls ein anderes nachrücken und durch Kohäsionszug die zusammenhängenden Wasserfäden in den submikroskopischen Wanderwegen der Zellwände nachziehen. Eine solche rein mechanische Erklärung des Saftsteigens ist jedoch unrichtig, denn GÄUMANN und JAAG (3) haben gezeigt, dass Welkegifte, die mit dem Transpirationsstrom in die Blätter gelangen, den Wassernachschub beeinträchtigen, sobald sie mit den lebenden Zellen in Berührung kommen. Die Arbeit des Wasserhebens wird daher offenbar nicht direkt von der wasserverdunstenden Sonnenenergie, sondern von der Lebensenergie des Blattgewebes geliefert.

Wenn man also in dieser Hinsicht mit der Ausdeutung der fluoreszenzmikroskopischen Befunde etwas zu weit gegangen ist, so lassen sich doch in anderen Richtungen ganz erstaunliche Schlussfolgerungen ziehen.

Man darf annehmen, dass nicht nur Farbstoffe, sondern auch die Nährionen, die mit dem aufsteigenden Wasserstrom in die Blätter gelangen, sich mit dem Transpirationswasser in den Zellwänden verteilen. Aus diesem Vorrat beziehen nun die Protoplasten ihre Nährsalze. Man kommt daher zum Schlusse, dass sich eine Blattzelle kaum anders ernährt als eine einzellige Süßwasseralge, die allseitig von ihrer Nährlösung umgeben ist. Die Zellen der Landpflanzen haben also ihr Nährsubstrat in den Zellwänden mit in die Luft hinaufgenommen! Dieses Verhalten erinnert an die Analogie des Verhältnisses der Ionenzusammensetzung  $\text{Na} : \text{K} : \text{Ca} : \text{Mg}$  im Blute der Säuger und im Meerwasser, woraus HÖBER (4) geschlossen hat, die Zellen durchbluteter Gewebe seien von einer Art Meerwasser umspült. Die Wirbeltiere hätten also gewissermassen beim Übergang vom Wasser- zum Landleben die Zusammensetzung ihres ursprünglichen Milieus in den Blutbahnen erhalten. In ähnlicher Weise gleicht also der in den Zellwänden der Blätter zirkulierende Saft der Landpflanzen dem Süßwasser, von dem aus die Pflanzenwelt das feste Land erobert hat.

Durch die Transpiration werden die mitgeführten Salze angereichert. Diese Erscheinung ist schon längst von Aschenanalysen bekannt, die zeigen, dass die Blätter während einer Vegetationsdauer zunehmend mineralisiert werden. Besonders Kieselsäure und Calciumkarbonat häufen sich an, und zwar vor allem an den oben als Orte bevorzugter Transpiration bezeichneten Stellen, während Mg- und K-Salze zurücktreten. Die fehlende Speicherung dieser Salze rührt von ihrer grösseren Löslichkeit her, so dass sie beim Beregnen der Blätter ausgewaschen werden. Es ist möglich, dass nicht nur eine passive Auslaugung der Epidermis, sondern wie ARENS (5) annimmt, auch eine aktive Salzausscheidung durch die Zellwände hindurch stattfindet. Nach den vorliegenden Untersuchungen ist jedenfalls der Salzverlust der Blätter, den wir als kutikulare Rekretion bezeichnet haben, deutlich von der Löslichkeit der Salze abhängig. Relativ am meisten gehen K und Mg «verloren», dann folgt Ca, und die Kieselsäure bleibt schliesslich fast quantitativ in den Blättern zurück. Eigentlich darf man jedoch nicht von einem Verlust sprechen, denn die von den Blättern in den Boden geschwemmten K- und Ca-Salze können als Dünger betrachtet werden. ARENS (5) berechnet, dass dem Boden auf einer Hektare Buchenwald pro Regentag 9,8 kg Kali und 4,5 kg Kalk zugeführt werde. Wir stellen somit einen Kreislauf der Nährsalze fest, der sich nicht erst nach dem Tode, sondern bereits während des Lebens einer Pflanze abspielt.

Die Zirkulation der Mineralsalze in den Zellwänden erlaubt auch, die Ausscheidung fester Rekrete in mikroskopisch sichtbaren Membranausstülpungen richtig zu deuten. Als Beispiel soll auf die Zystolithen der Urticaceen und Moraceen hingewiesen werden. Sie sind an einem Stiel aufgehängt, der einen charakteristisch geformten Zellulosekörper trägt. Dieser ist von feinen, mikro-

skopisch sichtbaren radialen Kanälchen durchzogen, an deren Ende Calciumkarbonat abgelagert ist. Man darf sich vorstellen, dass das Plasma der Zystolithenzellen das an Mineralstoffen angereicherte Wasser, welches in den peripheren Zellwänden zirkuliert, durch diese Kanälchen ansaugt und das darin enthaltene Calciumbikarbonat zur Ausscheidung bringt.

## 2. Stoffleitung

Während so die Fluoreszenzmikroskopie viele Probleme der aufsteigenden Saftströmung geklärt hat, sind ihre Ergebnisse hinsichtlich des Wesens des absteigenden Assimilatenstromes nicht eindeutig. Sie ist namentlich dazu benützt worden, um die sogenannte Druckstromtheorie von MÜNCH (6) auf ihre Richtigkeit zu prüfen.

Nach dieser Theorie presst der Blatt-Turgor die gelösten Assimilate in die Siebröhren und durch den Siebteil der Leitbündel hinunter zu den Verbrauchsstellen im Kambium und in den Wurzeln. Tatsächlich enthält der Siebröhrensaft 20 % Rohrzucker, der als Wanderzucker betrachtet wird. An den Verbrauchsstellen wird der Zucker für die Synthese von hochpolymeren Kohlehydraten (Zellulose, Stärke) und von Eiweiss verwendet. Das als Vehikel dienende Wasser soll in die Leitbahnen des Gefässteils ausgeschieden werden und mit dem Transpirationsstrom wieder in die Blätter hinaufsteigen. Auf diese Weise wäre in den Bäumen eine geschlossene Zirkulationsströmung vorhanden, als deren «Herz» die Blattzellen, die den Transpirationsstrom ansaugen und den Assimilatenstrom wegpresen, anzusprechen wären.

Durch Einführung von Fluorochromen in die Siebröhren suchte man deren Wegsamkeit zu beweisen. Solche Versuche sind indessen schwierig, da das Siebröhrensystem gegen Verletzungen ausserordentlich empfindlich ist. SCHUMACHER (7) ist dieses Experiment gelungen. Er setzte erstarrende Gelatine mit einem kleinen Fluoreszeingehalt auf Blattnerven, deren Epidermis abgezogen worden war. Nach kurzer Zeit lässt sich dann das Fluoreszein fluoreszenzoptisch in den Siebröhren auf Längsschnitten beobachten und dessen Wanderung verfolgen. Das Fluoreszenzmikroskop hat daher die erste und bis jetzt einzige Methode geliefert, die Stoffwanderung in den Siebröhren direkt zu beobachten.

SCHUMACHER (7) stellte 1933 in den Siebröhren von Pelargonium Wandergeschwindigkeiten von Dezimetern je Stunde fest. Diese Messungen stimmten mit den Berechnungen von MÜNCH überein, die von der zur Ermöglichung des beobachteten Dickenwachstums der Bäume notwendigen Stromstärke des absteigenden Saftes ausgehen. Leider ist hiemit das 100jährige Problem der Siebröhrenwanderung doch nicht endgültig gelöst worden [HUBER (8)]. Das Fluoreszein wandert nämlich im dünnen Plasmabelag der Siebröhren, während den Berechnungen von MÜNCH eine Massenströmung über den ganzen Querschnitt der Siebröhren zugrunde liegt, wobei nach den Gesetzen der laminaren Strömung der wandständige Plasmabelag unbewegt

bleiben sollte. Tatsächlich zeigen die Siebröhren jedoch Plasmaströmung; aber das Fluoreszein wandert unabhängig davon in polarer Richtung mit oder gegen den Plasmastrom. Man muss sich daher vorstellen, dass das Fluoreszein als molekularer Film auf der Oberfläche des Plasmas wandert. Damit würde auch die grosse Ausbreitungsgeschwindigkeit von Dezimetern je Stunde verständlich. Die Forstbotaniker machen jedoch geltend, dass auf diesem Wege eine ein bis zwei Grössenordnungen grössere Wanderungsgeschwindigkeit herrschen müsste, um die notwendigen Zuckermengen zu verfrachten. Sie werfen den Versuchen von SCHUMACHER vor, er arbeite mit einem Plasmafarbstoff, was für den Zucker nicht gelte, da dieser im Zellsaft gelöst sei. Mir scheint, dass diese Streitfrage entschieden werden könnte durch die Anwendung von Zellsaft-Fluorochromen, die nur die Zellvakuole im Schosse des dunkel bleibenden Plasmabelages aufleuchten lassen, wie dies SCHOPFER (9) für das Thiochrom nachgewiesen hat.

### 3. Nikotinwanderung

Überraschend sind die Ergebnisse, die das Fluoreszenzmikroskop in unserem Laboratorium für die Lösung des Problemes der Nikotinwanderung ermöglicht hat. Reziproke Pfropfversuche zwischen Tabak und Tomate machen es wahrscheinlich, dass das Alkaloid Nikotin in den Wurzeln gebildet wird und dann in die Blätter hinaufwandert [s. BLANK (10)]. Pfropft man nämlich Tomate auf Tabak, so erhält man nikotinhaltige Tomatenblätter, während umgekehrt Tabak auf Tomate als Unterlage nikotinfrei bleibt. Es muss also Nikotin oder ein Vorläufer des Nikotins in den Wurzeln gebildet werden und in die Blätter hinaufwandern. Als Wanderwege kommen der Gefässteil oder der Siebteil der Leitbündel in Betracht. Da diese beiden Leitgewebe stets gemeinsam auftreten, lässt sich analytisch nicht entscheiden, welcher der beiden Saftströme verwendet wird.

Nikotin fluoresziert bläulich, so dass die Möglichkeit einer fluoreszenzoptischen Untersuchung in Betracht gezogen wurde. Leider zeigt aber das Lignin die gleiche Fluoreszenzfarbe, so dass der Gefässteil der Leitbündel im Fluoreszenzmikroskop schon von sich aus blau aufleuchtet. Da machte SCHMID (11) die Entdeckung, dass die Additionsverbindung von Nikotin mit Bromcyan, die für die kolorimetrische Mikrobestimmung des Nikotingehaltes von Lösungen benützt wird, sehr intensiv gelbgrün fluoresziert. Die Auffindung dieses neuen Fluorochromes gestattete nun die mikroskopische Untersuchung der Nikotinwanderung.

Es ergab sich, dass in Tabakkeimlingen das Nikotin<sup>2</sup>) in der Wurzelrinde gebildet wird. Von dort wandert es in die Tracheiden des jungen Leitbündels aus, und man kann verfolgen, wie es im Gefässteil zu den Keimblättern und zum Knösphen emporwandert. Diese Beobachtungen stossen zwei alte Dogmen der Pflanzenphysiologie um: 1. dass die grünen Blätter als Stätte der

$CO_2$ -Assimilation die chemischen Laboratorien seien, die nicht nur die primären, sondern auch die merkwürdigen sekundären Pflanzenstoffe wie Alkaloide, Glukoside usw. aufbauen, indem offenbar auch die heterotrophen Zellen der Wurzeln zu solchen Synthesen befähigt sind, und 2. dass die Stoffleitung im Siebteil der Leitbündel erfolge. Das Nikotin ist ja wahrscheinlich kein Assimilat des pflanzlichen Stoffwechsels, sondern eher ein Nebenprodukt wichtiger Assimilationsvorgänge (Mobilisation und Assimilation von Eiweißstoffen); aber es ist doch eine komplizierte, organische Verbindung, zu deren Verfrachtung wider Erwarten nicht die «Stoffleitungs»-, sondern die Wasserleitungsbahn benützt wird.

### Literaturverzeichnis

- (1) STRUGGER, S. Studien über den Transpirationsstrom im Blatt von *Secale cereale* und *Triticum vulgare*. Z. Bot., 35, 97 (1939/40).
- (2) STRUGGER, S. Die lumineszenzmikroskopische Analyse des Transpirationsstromes in Parenchymen. Flora, 33, 56 (1938).
- (3) GÄUMANN und JAAG. Die physiologischen Grundlagen des parasitogenen Welkens I. Ber. Schweiz. Bot. Ges., 57, 3 (1947).
- (4) HÖBER, R. Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. 5. Aufl., S. 653, Leipzig 1922.
- (5) ARENS, K. H. Die cuticuläre Exkretion des Laubblattes. Jb. wiss. Bot., 80, 248 (1934).
- (6) MÜNCH, E. Die Stoffbewegungen in der Pflanze. Jena 1930.
- (7) SCHUMACHER, W. Untersuchungen über die Wanderung des Fluoreszeins in den Siebröhren. Jb. wiss. Bot., 77, 685 (1933). Weitere Untersuchungen über die Wanderung von Farbstoffen in den Siebröhren. Jb. wiss. Bot., 85, 422 (1937).
- (8) HUBER, B. Hundert Jahre Siebröhren-Forschung. Protopl., 29, 132 (1937). Gesichertes und Problematisches in der Wanderung der Assimilate. Ber. Dtsch. Bot. Ges., 59, 181 (1941).
- (9) SCHOPFER, W. H. Le thiochrome, colorant vital fluorescent. Son rôle comme indicateur cytologique de la perméation de l'acide ascorbique. Protopl., 36, 546 (1942).
- (10) BLANK, F. Alkaloidbildung in der Pflanzenwurzel. Experientia, 1, 111 (1945).
- (11) SCHMID, H. Über die Nikotinbildung in der Tabakpflanze. Diss. E. T. H. Zürich 1947 (im Drucke).

<sup>2)</sup> Es geben auch andere Pyridinverbindungen mit Bromcyan analoge Farbstoffe; im Blutungssaft des Tabaks konnte jedoch nur Nikotin nachgewiesen werden, so dass offenbar dieses Alkaloid von der Wurzel vollständig aufgebaut wird.