Beiträge zur vergleichenden Physiologie der Verdauung.

VII.

Dringen Verdauungsfermente in geschlossene Pflanzenzellen ein?

Von

W. Biedermann.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Jena.

(Eingegangen am 25. November 1918.)

Die verhältnismässig schlechte Ausnützbarkeit der meisten pflanzlichen Nahrungsmittel wird zumeist darauf bezogen, dass die in ihnen enthaltenen Nährstoffe der Einwirkung der Verdauungsfermente dadurch entzogen sind, dass sie in Zellen eingeschlossen liegen, deren Wände aus einem Stoff bestehen, für welchen allen Wirbeltieren ein lösendes Ferment abgeht. Aber auch für Wirbellose ist, wenn man von gewissen Protisten absieht, bis jetzt erst in zwei Fällen (*Helix* und *Astacus*) das Vorhandensein einer „Cytase“ nachgewiesen worden. Da nun ausserdem den Verdauungsfermenten ziemlich allgemein kolloidale Eigenschaften zugeschrieben werden, so dass ein Eindringen in unverletzte Zellen dann kaum anzunehmen wäre, so bliebe eine Ausnützung des Inhaltes bei der Verdauung entweder auf den Fall beschränkt, dass die Cellulosemembranen mechanisch gesprengt werden, oder man muss die Mithilfe von Darmbakterien in Anspruch nehmen, welche Cellulose chemisch anzugreifen (zu vergären) imstande sind. Nun wird freilich zugegeben, dass der kolloidale Charakter der Fermente kein so ausgesprochener ist, dass sie alle Eigenschaften der typischen Kolloide im Sinne Graham's besitzen. So trifft, wie Wohlgemuth bemerkt¹⁾, „gerade eines der Hauptcharakteristika für Kolloide, die gänzliche Unfähigkeit, tierische und pflanzliche Membranen zu passieren, für die Fermente nicht vollkommen zu. Solange zwar die Fermente sich in Lösung mit anderen kolloidalen Beimengungen befinden, sind sie auch nicht imstande, zu dialysieren. Wenn man sie aber reinigt und von allen kolloidalen Beimengungen möglichst gründlich befreit, so erlangen einige von ihnen doch schliesslich die Eigenschaft, tierische und pflanzliche Membranen zu passieren“ (Wohlgemuth). Da nun solche kolloidale

1) J. Wohlgemuth, Grundriss der Fermentmethoden. Berlin 1913.

Beimengungen, wenn man vom Pepsin des Magensaftes absieht, gerade bei den natürlichen Verdauungssäften fast immer vorkommen und wie beim Pankreassaft der Wirbeltiere und den Darmsekreten vieler Wirbellosen (Mollusken, Insekten, Crustaceen) oft überreichlich vorhanden sind, so wäre gerade in diesen Fällen auf ein leichtes Eindringen kaum zu rechnen. Tatsächlich wird wohl allgemein angenommen, dass bei der „Aufschliessung“ pflanzlicher Nahrungsmittel im Organismus der Wirbeltiere den Darmbakterien die Hauptrolle zufällt. Es prägt sich dies ja auch schon im anatomischen Bau der Herbivoren aus, indem besondere Gärungsräume von oft enormen Dimensionen entwickelt sind; man denke nur an die „Vormagen“ der Wiederkäuer und das riesige Coecum der Pflanzenfresser mit einhöhligen Magen.

Was nun die Frage betrifft, ob Verdauungsfermente auch in unversehrte pflanzliche Zellen einzudringen imstande sind, so herrscht darüber eine merkwürdige Unklarheit, und ich habe weder für noch gegen eine solche Annahme sprechende, unzweideutige Beweise in der Literatur gefunden. Von der Beantwortung dieser Frage hängt aber, wie ich zeigen werde, nicht nur die richtige Beurteilung der Verdauungsvorgänge im Darm pflanzenfressender, wirbelloser Tiere ab, sondern auch die Möglichkeit, die künstliche Verdauung als mikrochemische Methode für pflanzliche Objekte zu verwenden. Es ist dies allerdings schon mehrfach, wenn auch ohne die notwendige Kritik, geschehen, und ich verweise in dieser Beziehung besonders auf die Arbeiten von Zacharias¹⁾, welcher die Pepsin-Salzsäure-Verdauung in ausgedehnter Weise in Anwendung brachte.

a) Amylasen.

Von grosser Bedeutung ist die Frage nach dem Diffusionsvermögen der Fermente besonders auch in bezug auf die Diastase und die durch sie vermittelte Stärkelösung beim Keimen vieler Samen. Bekanntlich wurde viel darüber gestritten, ob die im Endosperm aufgespeicherten Nährstoffe und speziell die Stärke in den stärkeführenden Samen bei der Keimung ausschliesslich durch Fermente, die der Embryo ausscheidet (sezerniert), aufgeschlossen werden oder ob die Endospermzellen selbständig dabei mitwirken und die festen Nährstoffe auflösen (intracellular verdauen). Es kann zurzeit nicht bezweifelt werden, dass beides geschieht, wenn auch wohl die Sekretion von seiten des Embryos die wichtigste Rolle spielt. Bei den Gräsern liegt dieser am einen Ende des Kornes und steht mit dem Endosperm durch

1) Vgl. H. Molisch, Mikrochemie der Pflanze. Jena, G. Fischer 1913, S. 295.

Vermittlung des sogenannten „Schildchens“ in Berührung. An der Grenzfläche dieses, sowohl der Sekretion wie auch der Resorption dienenden, Organes befindet sich eine Zellschicht (Epithel), dessen Elemente Diastase absondern, die, wenn sie wirksam werden soll, naturgemäss die Cellulosemembranen durchdringen muss. Von verschiedener Seite wurde denn auch bereits Diffusionsfähigkeit vegetabilischer Diastasen behauptet. Fraenkel und Hamburg¹⁾ fanden, dass eine von ihnen nach besonderer Methode dargestellte „reine“ Diastase ohne Verlust durch Pukallfilter ging. Nur die ultramikroskopische Untersuchung sprach für die kolloidale Natur, da sich das bikonkave Lichtbüschel zeigte, welches für das Vorhandensein sehr kleiner Teilchen in der kolloidalen Lösung spricht. Brown und Morris²⁾ konnten sogar die Diffusionsgeschwindigkeit der Diastase in Gelatinegallerte messen. Sie versetzten 3 %ige Gelatinelösung mit Malzextrakt und mischten ferner andere ebenfalls 3 %ige Gelatinegallerte mit Buchweizenstärke, schichteten beide Gallerten übereinander, hielten sie mit Chloroform völlig steril und beobachteten das Aufsteigen der Diastase an der Korrosion der Stärkekörner. In einer Stunde wanderte die Diastase 0,145 mm. Für die Speicheldiastase (Ptyalin) hat neuerdings W. Gast³⁾ das „leichte Eindringen in die Pflanzenzelle und die kräftige Einwirkung dortselbst“, welche er anscheinend voraussetzt, benützt, um den Stärkegehalt von Blättern quantitativ zu bestimmen. Möglichst fein gepulverte, mit Alkohol entfärbte, trockene Blätter (von *Tropaeolum*) wurden zunächst mit Wasser zur Verkleisterung der Stärke erhitzt, dann nach dem Abkühlen mit Speichel versetzt und mehrere Stunden bei 40° C. digeriert. Während Jodjodkali vorher blauschwarze Färbung bewirkte, trat nach der Speichelbehandlung nur noch Gelbfärbung auf. A. Meyer, der in seiner bekannten ausgezeichneten Stärkemonographie auf diese Frage zu sprechen kommt (S. 228), hält es für sicher, „dass die Diastase auch in ganz intakte Stärkekörner einzudringen vermag, also zwischen die Kristallfasern der Stärkesphärite“, und macht als Beweis dafür besonders auf die Korrosionserscheinungen bei Einwirkung von Speichel oder Diastaselösungen aufmerksam, die er am einzelnen Stärkekorn unter dem Mikroskop verfolgte und eingehend schildert (l. c. S. 274). Im Gegensatz zu Naegeli, welcher behauptete, dass Speichel auf Stärkekörner bei gewöhnlicher Temperatur überhaupt nicht einwirke, fand Meyer, dass „kalter Speichel alle Stärkekörner angreift, Weizenstärke schon nach einigen Stunden deutlich, alle Stärkekörner aber relativ langsam“. Er fand die Stärke-

1) Hofmeister's Beiträge VIII S. 389. 1906.

2) Journ. Chem. Soc. 1893.

3) Z. f. physiol. Chemie 99 S. 17. 1917.

körner der Samen für Speichel wie auch für Diastase leichter angreifbar als die relativ dichten Körner, wie sie in den Rhizomen vorkommen (Kartoffel). Jedenfalls muss man unter allen Umständen mit spezifischen Verschiedenheiten der einzelnen Stärkesorten hinsichtlich ihrer Angreifbarkeit durch Amylasen rechnen. An noch feuchten Grosskörnern von *Hordeum* sah Meyer bei Einwirkung einer Mischung von 5 cem Speichel, 2,5 cem Wasser und 2,5 cem Glycerin unter Thymolzusatz schon nach 2–6 Stunden feine radiäre Kanälchen entstehen, die sich mehr und mehr verbreitern und von denen aus dann die Zerstörung im Innern weiter fortschreitet. Bei 40° C. war völlige Lösung meist schon innerhalb 5 Stunden eingetreten, während bei Anwendung von Diastaselösungen (50 g gekeimte Gerste mit 50 g Wasser und 2 g Chloroform zerrieben und nach 10 Stunden filtriert) erst am dritten Tage Lösungserscheinungen hervortraten. Noch sehr viel widerstandsfähiger ist die Kartoffelstärke, zu deren Lösung durch Speichel selbst bei 40° C. meist über 10 Tage erforderlich sind (l. c. S. 94). „Selbstdargestellte Stärkekörner aus ruhenden Kartoffelknollen liessen erst nach dreimonatiger Behandlung mit häufig gewechseltem Malzauszug bei 40° C. deutliche Zeichen des Angriffes der Diastase erkennen. Viele erscheinen auf der Oberfläche fein punktiert. Nach sechsmonatiger Behandlung war die Aussenschicht gröber punktiert und in manchen Fällen oberflächlich durch eingezätzte Rinnen gefurcht“. A. Meyer hebt mit Recht hervor, dass „die Angriffserscheinungen bei den verschiedenen Stärkekörnern selbst dann, wenn die durch das Ferment gelöste Substanzmenge gleich ist, doch sehr verschieden deutlich sein können. Leicht sichtbar werden alle Angriffe dann, wenn sie im Innern oder an der Oberfläche des Stärkekornes Höhlungen irgendwelcher Art schaffen, während eine gleichmässige Auflösung peripherer Schichten äusserst schwierig nachzuweisen ist“ ... „am schnellsten gehen die Stärkekörner in Lösung, in welchen durch die Fermentwirkung Porenkanäle entstehen, die zwischen den Amylosekriställchen verlaufen, sofort eine grosse Angriffsfläche schaffen und die Schichten alle sofort auch seitlich freilegen (*Hordeum*)“. Stärkekörner des Buchweizens, die zu dieser Klasse gehören, sah Baranetzky ¹⁾ in Diastaselösungen schon nach 48 Stunden verschwinden. Gestützt auf die Beobachtung, dass intakte feuchte Stärkekörner von *Dieffenbachia* nach dreiwöchigem Liegen in Malzauszug im Vergleich mit in Chloroformwasser aufbewahrten gleichen Stärkekörnern weniger dicht waren, also im Innern gleichmässig in allen Teilen an Substanz verloren hatten,

1) J. Baranetzky, Die stärkeumbildenden Fermente in der Pflanze. Leipzig 1878.

nimmt Meyer an, dass die Diastase die kristallinisch-poröse Masse des Stärkekornes gleichmässig zu durchtränken vermag. Man hätte demnach eine äussere Lösung, welche die periphere Masse eines Kornes gleichmässig abträgt, von einer inneren zu unterscheiden, „welche, die Kristallfasern angreifend, die Zwischenräume zwischen diesen Elementen vergrössert. Die gleichmässige innere Lösung des intakten Stärkekornes muss voraussichtlich immer nur eine äusserst schwache bleiben, da die Interstitien zwischen den Kristallfasern bei allen Stärkekörnern äusserst eng sind, die Diffusion der durch die Wirkung der Diastase gebildeten Maltose und der Dextrine, welche wahrscheinlich in höchst konzentrierter Lösung die Diastasearbeit herabsetzen, nur äusserst langsam vor sich gehen kann. Sie kann nur bei wochenlanger Einwirkung des Fermentes auf die Stärkekörner bemerkbar werden; die äussere Lösung wird um so schneller von statten gehen, je kleiner die Stärkekörner sind, und sie wird wesentlich beschleunigt durch irgendwelche Unebenheiten der Oberfläche der Körner“ (A. Meyer).

Wenn man diesen Anschauungen beipflichtet und die Möglichkeit eines Eindringens der Lösung eines diastatischen Fermentes durch die Zwischenräume der „Kristallfasern“ (Trichiten), aus denen sich Meyer ein Stärkekorn zusammengesetzt denkt, ins Innere desselben zugibt, so würde daraus doch noch keineswegs zu folgern sein, dass auch eine unversehrte Cellulosehaut für ein solches Ferment durchgängig wäre, indem deren Dichte ohne Zweifel grösser ist. Ich habe mich daher bemüht, direkt durch den Versuch festzustellen, ob und in welchem Grade dies der Fall ist. Der unmittelbare Anlass dazu war die Beobachtung, dass die Stärkeeinschlüsse in den Chloroplasten der Blattzellen von *Elodea* nach völliger Auflösung des Stromas sowie des Gesamtplasmas im Inneren der sonst ganz unversehrten Zellen durch Behandlung derselben mit Speichel restlos gelöst werden. Wie ich in einer vorhergehenden Arbeit ¹⁾, auf die ich mich noch öfters werde berufen müssen, gezeigt habe, gelingt es an dem genannten Objekte Plasma und Chlorophyllkörner in den uneröffneten Zellen nach Extraktion mit Alkohol, Äther und Chloroform durch Trypsin vollständig in Lösung zu bringen, so dass nun die frei gewordenen Stärkekörnchen und eventuell Oxalatkryställchen den einzigen geformten Zellinhalt bilden. Die ersteren stellen dann ganz kleine, stark lichtbrechende Körnchen von rundlicher oder länglicher Form dar, von denen in jedem Chloroplasten gewöhnlich nur ein einziges vorkommt. Die

1) W. Biedermann, Mikrochem. Beobacht. an den Blattzellen von *Elodea*. Flora, N. F. Bd. 11. 1918.

grössten Einschlüsse finden sich an der Basis der Blätter und in den der Mittelrippe entsprechenden Zellen, die kleinsten in den Randzellen und an der Blattspitze, wo die Stärke sogar meistens ganz fehlt. Man kann sich von dieser Verteilung sehr leicht eine Anschauung verschaffen, wenn man ein mit Alkohol entfärbtes Blatt in Jodjodkaliumlösung legt, wo sich dann die Stärkebezirke sofort dunkel färben. Entsprechend der viel beträchtlicheren Grösse der der Oberseite des Blattes entsprechenden Zellen ist auch der Stärkereichtum der „Oberzellen“ immer grösser als der der schmaleren Zellen der Blattunterseite. Doch eignen sich diese letztere zu den meisten der in folgendem beschriebenen Versuche wesentlich besser.

Dadurch, dass man die Blätter vor der Extraktion mit Kochsalzlösung plasmolysiert, wobei sich Plasma und Chlorophyll zu einem zentralgelegenen Ballen vereinigen (l. c. S. 573 Abb. 1), und dann erst unmittelbar in Alkohol absol. überträgt, gewinnt man besonders charakteristische Präparate, indem nach beendeter Trypsinverdauung die isolierten Stärkekörnchen im Inneren der sonst völlig leeren Zellen eine Gruppe bilden, innerhalb deren die einzelnen Körnchen in zitternder Molekularbewegung sich befinden. Es ist auf diesen letzteren Umstand zu achten, da sich herausgestellt hat, dass eine glatte Lösung der Chlorophyllstärke bei Behandlung mit Speichel im gegebenen Falle nur dann erfolgt, wenn die umhüllenden Proteinstoffe wirklich vollständig gelöst sind. Dies ist aber keineswegs immer ganz leicht festzustellen, denn die mit der Peptonisierung der Zelleiweisskörper Hand in Hand gehende Aufhellung des Plasma-Chlorophyllballens kann so weit gehen, dass die Stärkekörnchen anscheinend bereits ganz freiliegen, während sie in Wirklichkeit doch noch von ganz durchsichtigen Resten der Stromata oder des Plasmas umhüllt sind. Das genügt aber, um sie vor der Einwirkung der Speicheldiastase zu schützen. Es gelingt daher auch nicht ohne weiteres, ein Elodeablatt zu entstärken, wenn man es frisch oder auch nach Extraktion mit Alkohol und Chloroform mit Speichel behandelt, und man würde auf Grund solcher Versuche leicht zu der Meinung gelangen, dass das Ferment die Cellulosemembran überhaupt nicht zu durchdringen vermag. Ich habe plasmolysierte und dann in Alkohol entfärbte Blätter tagelang bei erhöhter Temperatur (40° C.) mit unverdünntem sowie auch verschieden verdünntem Speichel unter Zusatz von Chloroform digeriert, ohne dass sich auch nur die Spur einer Lösung bemerkbar machte. Bei Zusatz von Jodjodkalium trat an den wurstförmigen, sich gelb färbenden Inhaltskörpern sofort das von mir früher schon (l. c. S. 593) beschriebene charakteristische, dunkelgefleckte Aussehen hervor, welches durch die im Inneren der Masse gelegenen Stärkekörnchen verursacht

wird, deren blauschwarze Jodfarbe durchschimmert und selbst das kleinste Körnchen noch entdecken lässt.

Es muss zugegeben werden, dass auch nach vollständigster Isolierung der Blattstärke von *Elodea* durch Trypsinverdauung die Lösung der Körnchen durch Ptyalin immer nur langsam von statten geht, und dass viele der grösseren Körnchen in den Zellen der Mittelrippe sowie in den Oberzellen überhaupt ungelöst bleiben, ja nicht einmal Korrosionserscheinungen darbieten. Auch die kleinsten Körnchen bedürfen zu ihrer Lösung immerhin mehrere Stunden. Es scheint sich demnach hier um eine an sich sehr widerstandsfähige Stärkesorte zu handeln. Mit Diastaselösungen (Malzauszügen), die unter allen Umständen sehr viel weniger energisch wirken als selbst stark verdünnter Speichel, gelingt es in diesem Falle überhaupt nicht, *Elodea*blätter zu entstärken.

Ich habe in der Folge andere Objekte untersucht, welche an und für sich noch viel günstigere Bedingungen darzubieten scheinen als die *Elodea*blattzellen, wo dennoch keine Lösung der noch im Stroma befindlichen Chlorophyllstärke erfolgt, so dass es scheinen könnte, als wären die Stärkeeinschlüsse der Chloroplasten in situ gegen die Einwirkung von Amylasen überhaupt geschützt, auch selbst dann, wenn die betreffenden Zellen vorher mit Alkohol und Chloroform extrahiert wurden. Bekanntlich zeichnen sich die Schliesszellen der Spaltöffnungen durch ihren Chlorophyll- resp. Stärkegehalt aus, der auch in solchen Fällen nicht fehlt, in denen die übrigen Epidermiszellen durchaus chlorophyllfrei sind, ja sogar bei Pflanzen, die überhaupt keine Stärke in den Blättern bilden. Man darf hieraus wohl auf eine besondere Bedeutung der in diesem Falle in den Chloroplasten gebildeten Stärke schliessen, und es liegt nahe, diese in der Entstehung von Zucker, also einer osmotisch wirksamen Substanz, zu erblicken, durch welche Turgorschwankungen in den Schliesszellen und damit Veränderungen des von ihnen begrenzten Spaltes bewirkt werden könnten. In der Tat hat schon Haberlandt die in den Chlorophyllkörnern der Schliesszellen enthaltene Stärke als einen Reservestoff aufgefasst, „welcher allmählich nach Bedarf“ in osmotisch wirkenden Zucker umgewandelt wird, wodurch der Turgor der Schliesszellen erhöht und so eine Öffnung des Spaltes bewirkt werde. Neuerdings hat Iljin (Beitr. z. Bot. Zentralbl. 32 Bd. I. Abt. 1914) beobachtet, dass die Schliesszellen geschlossener Spaltöffnungen immer reichlich mit Stärke erfüllt sind, die sich durch Blaufärbung mit Jodjodkali leicht nachweisen lässt, während in weit offenen Schliesszellen die Reaktion auf Stärke vollkommen negativ ausfiel. Die Stärkeabnahme verlief ganz parallel der zunehmenden Öffnung. Beim Wiedereintritt der Schliessbewegung wird sie dagegen wieder in kurzer Zeit regeneriert.

Die Regulierung des osmotischen Druckes würde daher, wie Iljin schliesst, auf der Wirkung einer (intracellularen) Amylase beruhen, welche je nach den Transpirationsverhältnissen Stärke in Zucker oder umgekehrt verwandelt. Zu gleichen Ergebnissen gelangte auch Hagem (Beitr. z. allgem. Bot. I. 1916), der hauptsächlich die Umwandlung der Kohlehydrate in Hinblick auf den Öffnungszustand der Schliesszellen in Abhängigkeit vom Beleuchtungswechsel untersuchte. Auch er konstatierte einen deutlichen Zusammenhang zwischen Stärkevorkommen und Spaltzustand. Er führt unter anderem auch eine ältere Beobachtung von Kohl an, welcher fand, dass „bei Darbietung von Diastase auf stärkeführende geschlossene Stromata eine Verzuckerung der Stärke erfolgt, die mit einer zunehmenden Öffnungsbewegung verknüpft ist“. Es wäre demnach anzunehmen, dass das Ferment die Wände der Schliesszellen nicht nur leicht durchdringt, sondern auch die Stärkeeinschlüsse der im Plasma eingebetteten Chloroplasten rasch verzuckert.

Ich konnte dies an dem von mir untersuchten Objekt nicht bestätigen. Die Schliesszellen der Spaltöffnungen an der Unterseite von Dahlienblättern zeigen sehr schön den charakteristischen Bau. Zwischen chlorophyllfreien Epidermiszellen mit gebuchteten Rändern eingebettet, enthalten sie mehrere Chlorophyllkörner, von denen jedes wieder drei bis vier kleine, stark lichtbrechende und deutlich voneinander gesonderte Stärkekörnchen einschliesst. Man kann an frischen Blättern und noch besser an solchen, die etwa 24 Stunden in Wasser gelegen haben, durch vorsichtiges Abschaben mit dem Messer von der Oberseite her grosse Flächen der unteren Epidermis blosslegen und erhält so ein Objekt, welches sich für die Untersuchung der vorliegenden Frage in ausgezeichnete Weise eignet. Ich habe frische, nicht weiter vorbehandelte derartige Präparate bis zu 48 Stunden mit halbverdünntem Speichel bei 40° C. mazeriert, ohne dass es mir gelungen wäre, eine Entstärkung der Schliesszellen herbeizuführen, obgleich, wie später gezeigt werden wird, das Ferment die Zellmembranen sicher durchdringt. Zu dem gleichen negativen Ergebnis führten auch Versuche, bei denen die Epidermis erst noch vorgängiger Extraktion mit Alkohol der Speichelwirkung unterworfen wurde. Es mag noch erwähnt sein, dass die solchen Präparaten immer anhaftenden, chlorophyllführenden Parenchymzellen erwünschte Gelegenheit boten, das völlig gleichartige Verhalten der Stärkeeinschlüsse der betreffenden Chlorophyllkörner festzustellen. Auch sie blieben bei Einwirkung von menschlichem gemischtem Mundspeichel vollständig unversehrt.

Dennoch kann ein solches Verhalten nicht als ausnahmslose Regel gelten. Offenbar sind die Bedingungen nicht in allen Fällen ganz übereinstimmende, ohne dass es mir aber zurzeit möglich wäre, sie

genauer zu präzisieren. Es fiel mir dies zuerst bei der Untersuchung von *Vallisneria* auf, deren Blattzellen im plasmolysierten Zustande je einen zentralgelegenen runden Ballen von Plasma und Chlorophyllkörnern umschliessen, der nach darauffolgender Extraktion mit Alkohol sehr deutlich die stark lichtbrechenden Stärkekörnchen der Chloroplasten erkennen lässt, die nach Jodzusatz die erwähnte fleckige Zeichnung der Ballen bedingen. Gegen Speichelbehandlung erweist sich nun zwar die grosse Mehrzahl der Zellen auch in diesem Falle durchaus widerstandsfähig; dennoch aber findet man nach Jodzusatz immer Gruppen oder auch vereinzelte Zellen, in denen die zentralen Ballen lediglich die gelbe Jodfarbe angenommen haben, ohne jede Spur der sonst ausnahmslos vorhandenen dunklen Punktierung. Es werden hier also ohne jeden Zweifel die Stärkekörnchen aus ihrer natürlichen Umhüllung durch das eingedrungene Ferment herausgelöst, und wenn dies auch nicht in allen Zellen der Fall war, so kann doch an der Tatsache selbst nicht gezweifelt werden. Bei genügend langer Einwirkungszeit gelingt es sogar in der Regel, die Mehrzahl der Zellen zu entstärken, was bei *Elodea* unter sonst gleichen Umständen an keiner einzigen Zelle erreichbar ist. Man wird kaum annehmen dürfen, dass die Zellwände im einen Falle durchlässiger sind, wie im andern, denn sie sind zwar bei *Vallisneria* entschieden dünner als bei *Eloden*, aber andererseits wieder viel dicker als bei den Schliesszellen der Spaltöffnungen. Eher liesse sich an substanzielle (strukturelle?) Verschiedenheiten der Stärkekörner selbst denken. Zugunsten der Annahme solcher Unterschiede verschiedener Stärkearten sprechen ja schon die oben angeführten Beobachtungen A. Meyer's. Es kommt dazu, dass es auch Fälle gibt, wo ungeachtet ziemlich stark verdickter Zellwände die verhältnismässig grossen Stärkeeinschlüsse der Chloroplasten mit Leichtigkeit im Inneren der Zellen aufgelöst werden, wenn man diese letzteren mit Speichel behandelt. Ein Beispiel liefern die unmittelbar unter der Epidermis junger grüner Bohnenschoten gelegenen, sehr stärkereichen Parenchymzellen. Am besten verfährt man auch hier wieder so, dass man die Zellen zunächst plasmolysiert, indem man kleinere Stücke der Schoten nach Abziehen der Epidermis in 1—2 %ige Kochsalzlösung bringt und dann in Alkohol zur Entfärbung einlegt. Dünne, in der Längsrichtung der Schote geführte Schnitte zeigen dann sehr schön inmitten der ziemlich grossen Zellen das zusammengeballte Plasma, durchsetzt von zahlreichen ovalen stärkereichen Chlorophyllkörnern, die meist so dicht beisammenliegen, dass man vom Plasma nicht viel zu sehen bekommt. Bei Jodzusatz färbt sich die ganze Masse tief schwarzblau. Bringt man nun solche Schnitte in Speichellösung, so findet man bei einer Temperatur von

40° C. nach einigen Stunden keine Stärke mehr, und die Jodreaktion bleibt gänzlich aus. Dafür tritt dann der Plasmaballen als eine infolge der herausgelösten Stärkekörner schaumig oder wabig erscheinende, zart granulいたe Masse um so deutlicher hervor. Ich habe nicht unterlassen, auch Schnitte von ganz frischen Schoten ohne jede Vorbehandlung der Speichelverdauung zu unterwerfen, um zu sehen, ob nicht durch das Plasmolysieren und die Alkoholextraktion Veränderungen an den Chloroplasten bewirkt wurden, durch welche die rasche Lösung der Einschlüsse ermöglicht wird. Bei blossen Zusatz von Wasser treten die Stärkekörnchen in den verhältnismässig grossen Chloroplasten ausserordentlich deutlich hervor und bieten bei der grossen Durchsichtigkeit selbst dickerer Schnitte und der vereinzelt Lage der Chlorophyllkörner vortreffliche Gelegenheit, etwaige Veränderungen ihrer Zahl und Grösse leicht und sicher zu erkennen. Setzt man zu einem solchen Schnitt unverdünnten Speichel und lässt bei Zimmertemperatur stehen, so findet man nach 24 Stunden die Chloroplasten noch unverändert, und nur in ganz vereinzelt Zellen sind die Stärkeeinschlüsse gelöst. Nach ebensolanger Einwirkung halbverdünnten Speichels bei 40° C. ist dagegen die Stärke in der Mehrzahl der Zellen verschwunden. Schon vor langer Zeit (vgl. diese Beiträge Bd. 75 S. 48. 1899) hatte ich beobachtet, dass die sehr energisch wirkende Amylase des „Magensaftes“ (Lebersekret) von *Helix pomatia* die Stärkeeinschlüsse aus den Chlorophyllkörnern des Parenchyms von Salat- und Kohlblättern vollständig herauszulösen vermag, so dass Lücken von entsprechender Form entstanden.

Ich hatte erwartet, dass sich die Unterschiede im Verhalten der Stärke gegen Speichelferment nach vorhergehender Verkleisterung völlig ausgleichen würden; es war dies aber bemerkenswerterweise nicht der Fall. Kocht man ein Stückchen eines in der oben angegebenen Weise vorbehandelt Blattes von *Vallisneria* etwa $\frac{1}{2}$ Stunde mit Wasser, so gewinnen die durch Plasmolyse entstandenen zentralen Plasma-Chlorophyll-Ballen ein zierlich gegittertes Aussehen, indem die Stärkeeinschlüsse der Chloroplasten stark aufquellen und so die Zwischensubstanz in ein polygonales Netzwerk umformen, dessen Maschen von Kleister ausgefüllt werden. In ganz ähnlicher Weise entstehen auch in den Blattzellen von *Elodea* Stärkegeritter, wie dies schon in meiner früheren Arbeit (Flora l. c.) beschrieben wurde. Bei Jodzusatz erscheinen die Wabenräume natürlich dunkelgefärbt, während die stark lichtbrechenden Wabenwände einen gelblichen Farbenton annehmen. Nirgends bemerkt man eine Kontinuitätsunterbrechung der Gitter, wiewohl eine Zerreissung der Maschen (Waben) als Folge der Quellung der Stärkekörner wohl zu erwarten gewesen wäre und auch angenommen werden muss; denn sonst wäre nicht zu verstehen,

dass nach dem Ausweis der Jodreaktion gelöste Stärke den ganzen Zellraum ausserhalb der gegitterten Plasmaballen erfüllt, der demgemäss diffus blau gefärbt erscheint. So kommt es, dass bei einem solchen gekochten Präparat die Jodfärbung ausserordentlich viel intensiver ausfällt als bei einem nichtgekochten. Während ein solches, mit dem blossen Auge gesehen, nur unwesentlich dunkelt, tritt anderenfalls momentan eine meist ganz gleichmässig schwarzblaue Färbung ein. Bei der grossen Übereinstimmung im Bau und sonstigen Verhalten der Blattzellen von *Elodea* und *Vallisneria* erscheint es nun sehr auffallend, dass sich auch nach dem Kochen und der dadurch bewirkten Verkleisterung der Stärke die sonst ganz gleich vorbehandelten Präparate nach gleich langer Speichelwirkung doch ganz verschieden verhalten. Während bei *Vallisneria* schon nach kurzer Zeit nicht nur die im Zellraum verteilte gelöste, sondern auch die noch im zentralen Ballen eingeschlossene Stärke als solche verschwunden ist, so dass die Jodreaktion völlig negativ bleibt, gewinnen die *Elodea*-blätter beim Betupfen mit Jodjodkaliumlösung in der Regel ein eigentümlich geflecktes oder gestreiftes Aussehen, indem zwischen Gruppen von Zellen, aus denen die Stärke ganz verschwunden ist, andere liegen, in welche das Ferment anscheinend gar nicht eingedrungen ist und die daher noch ebenso gebläut erscheinen wie vor der Speichelbehandlung. Neben Zellen, deren Inhalt noch rein blau erscheint, finden sich meist andere, welche einen mehr violetten oder rötlichen Farbenton angenommen haben, zum Beweis, dass doch eine Fermentwirkung stattgefunden hat, aber nicht bis zum achromischen Punkt fortgeschritten ist. Unter diesen Umständen bleibt wohl nur die Annahme übrig, dass die auch im verkleisterten Zustande viel schwerer angreifbare Blattstärke von *Elodea* chemisch von der *Vallisneria*-stärke verschieden ist. Sehr leicht und schnell wird nach dem Kochen die Stärke in den Schliesszellen der Spaltöffnungen von *Dahlia* hydrolysiert und ebenso die in den Blattparenchymzellen des *Spinates*. Bereitet man, wie es in der Küche üblich ist, aus gekochten Spinatblättern durch Auspressen und Zerhacken einen steifen Brei, zieht diesen dann, nach wiederholtem Auskochen mit Wasser, mit Alkohol bis zur völligen Entfärbung aus, so erhält man eine weisse, bröcklige Masse, welche sich nach weiterer Extraktion mit Äther und Chloroform zu allen Verdauungsversuchen vortrefflich eignet. Bei mikroskopischer Untersuchung findet man neben kleinen und kleinsten Blattfragmenten auch zahlreiche, nur lose zusammenhängende Gruppen von Parenchymzellen sowie ganz isolierte Zellen, die innerhalb der dünnen Membran einen grossen, aus Plasma und den entfärbten Resten der Chlorophyllkörner bestehenden Klumpen

enthalten, der die Zellwand nicht direkt berührt, sondern durch einen meist ziemlich breiten Zwischenraum getrennt erscheint. Die in diesem nach dem Kochen vorhandene gelöste Stärke ist durch den Alkohol ausgefällt worden und bildet nun kleinere und grössere tropfenähnliche Kugeln, die bei Jodbehandlung sehr scharf hervortreten. Diese sowohl wie auch die gequollene Stärke, welche den ganzen Ballen durchsetzt, verschwinden bei Speichelbehandlung aus den unversehrten Zellen sehr rasch, so dass dann bei Jodzusatz keine Spur von Färbung mehr eintritt.

Auf Grund der mitgeteilten Tatsachen darf es wohl als vollkommen sichergestellt gelten, dass die Amylase des menschlichen Speichels absolut unversehrte pflanzliche Zellmembranen, wenn diese nicht zu stark verdickt oder verholzt sind, zu durchdringen vermag. In welchem Ausmaasse dies der Fall ist, darüber geben die Versuche allerdings keinen direkten Aufschluss. Doch könnte man sich wohl eine Vorstellung davon bilden, wenn es gelänge, ein wirkungsfähiges Dialysat aus Speichel zu gewinnen. Dies ist in der Tat der Fall. Füllt man in eine nach Abderhalden's Vorschriften sorgfältig geprüfte Dialysierhülse (von Schleicher und Düll) Speichel, so gelingt es leicht, nach 24 Stunden in der Aussenflüssigkeit Amylase nachzuweisen. 10 ccm derselben mit 2 ccm 1 %iger Stärkelösung vermischt, geben bei gewöhnlicher Zimmertemperatur schon nach 3 Stunden rein rote Jodreaktion, und 1 Stunde später ist der achromische Punkt erreicht. Wenn man diese langsame Hydrolyse allerdings mit der explosionsartig erfolgenden momentanen Spaltung durch selbst stark verdünnte Speichellösung vergleicht, so wird man das Dialysiervermögen des Fermentes als ein sehr beschränktes bezeichnen müssen. Da, wie ich seinerzeit zeigte, auch Speichelasche diastatisch zu wirken vermag, so war daran zu denken, ob es sich nicht etwa auch im vorliegenden Fall lediglich um eine Wirkung der herausdiffundierenden Speichelsalze handelt. Der Versuch mit einer vorher gekochten Probe des Dialysates zeigte, dass dies nicht der Fall ist. Zwar wurde die zugesetzte Stärke auch dann noch hydrolysiert, aber erst nach 24 Stunden färbte sich ein zur Probe entnommener Tropfen mit Jod rot. Auf alle Fälle ist die diastatische Kraft der Fermentlösung, welche man bei einem Dialysierversuch mit Papierhülsen erhält, eine ausserordentlich geringe und entspricht nur der eines sehr hochverdünnten Speichels. Darf man aus diesem Verhalten auf die Fermentmengen schliessen, welche in eine Pflanzenzelle eindringen, die von unverdünntem Speichel umgeben ist, so wird man auch da nur mit Fermentspuren rechnen können. Es erscheint dann leicht verständlich, dass grössere Stärkekörnchen, auch wenn sie ganz frei

im Innern einer Zelle liegen, nur schwer angegriffen werden, und dass selbst durch Kochen gelöste Stärke nur verhältnismässig langsam hydrolysiert wird. Jedenfalls wird man den diastatischen Fermenten Dialysiervermögen nur in recht beschränktem Grade zuschreiben können; von einem „leichten Eindringen in Pflanzenzellen“ kann gar nicht die Rede sein. Es steht damit in Übereinstimmung, dass in allen den Fällen, wo es auf rasche Lösung der Stärke ankommt, das Ferment in den betreffenden Zellen selbst, unter Umständen sogar in unmittelbarer Nähe der Stärkekörner, entsteht. Davon bildet auch der schon oben erwähnte Fall keine Ausnahme, wo, wie bei den Gramineen, der Embryo in dem „Schildchen“ ein Organ besitzt, welches Diastase absondert: denn auch dann wird die Stärke nicht bloss durch das von aussen in die Zellen des Endosperms eindringende Ferment „verdaut“, sondern es besitzen diese Zellen auch noch selbst die Fähigkeit, Diastase zu erzeugen.

Unvergleichlich rascher als bei der Keimung stärkeführender Samen oder Rhizome muss naturgemäss die Lösung der in den Chlorophyllkörnern der grünen Laubblätter gebildeten Stärke erfolgen, welche sich unter günstigen Assimilationsbedingungen im Laufe eines Tages hier in grossen Mengen anhäuft. Viele Pflanzen entleeren nun in unserem Klima in warmen Nächten diese aufgespeicherten Stärke massen vollständig, und es erscheinen die Blätter am frühen Morgen gänzlich stärkefrei. Dass in diesem Falle die Hydrolyse lediglich durch ein intrazellulär gebildetes Ferment bewirkt werden kann, leuchtet ohne weiteres ein. Aber selbst dann bieten sich der Erklärung Schwierigkeiten, wenn man berücksichtigt, dass, wie die Erfahrung lehrt, die im Stroma eingeschlossenen Stärkekörnchen vor dem Angriff eines im übrigen Zellinhalt verbreiteten Fermentes in der Mehrzahl der Fälle fast völlig geschützt sind. A. Meyer gelangte bei seinen Untersuchungen zu der Überzeugung, dass die die Blattstärke lösende Diastase ausschliesslich in den Chloroplasten selbst entsteht und ein Produkt des farblosen Stromas derselben darstellt. Er hält es für wahrscheinlich, dass jedes Stärkekorn, sei es auch noch so gross, „zeitlebens von der Masse des Chromatophors, sei derselbe ein Chloroplast, Leukoplast oder Chromoplast, völlig umschlossen wird. Die vollkommene Umhüllung des Stärkekornes durch die Masse des Chromatophors ermöglicht eine allseitige direkte Beeinflussung des wachsenden und des gelöst werdenden Stärkekornes durch das Chromatophor. Jede Stelle der Oberfläche eines Stärkekornes ist mit der Mutterlauge direkt in Berührung, wächst unter dem direkten Einfluss des die Amylose und die Diastase erzeugenden Organes“ (l. c. S. 167).

Die vorstehend mitgeteilten Tatsachen sprechen, wie mir scheint, sehr zugunsten dieser Annahme Meyer's, die ja auch sonst durch sehr gute Gründe gestützt erscheint (vgl. l. c. S. 170). In der Tat bleibt, wenn die Chlorophyllstärke innerhalb des Stromas gegen von aussen her einwirkendes Ferment mehr oder weniger geschützt ist, kaum eine andere Möglichkeit rascher Lösung derselben übrig, als dass das Lösungsmittel (Diastase) von der Hülle selbst nach innen abgegeben wird. Auffallend bleibt nur, dass, wie gezeigt wurde, vielfach schon ganz dünne Hüllen, wie sie infolge der beim Wachsen des Stärkekornes rasch zunehmenden Dehnung des Stromas bei jedem grösseren Korn anzunehmen sind und wie man sie wohl auch in dem oben erwähnten Falle voraussetzen darf, wo kleinste Stärkekörnchen von Elodea durch kaum sichtbare Reste der durch Verdauung gelösten Hüllsubstanzen doch noch in wirksamster Weise gegen Speichelferment geschützt erscheinen. Es ist dies um so merkwürdiger, als, wie ich mich selbst überzeugt habe, Ptyalin ohne Schwierigkeit dicke Gelatineschichten zu durchdringen vermag.

Man bringe in die Höhlung eines ausgeschliffenen Objektträgers ein wenig Gerstenstärke und bedecke diese dann mit einem Tropfen Gelatinelösung, die so konzentriert sein muss, dass sie bei gewöhnlicher Temperatur fest wird. Schliesslich wird so viel Speichel aufgetragen, dass die Gelatine vollständig überdeckt erscheint. Das Präparat bleibt dann in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur stehen. Nach mehreren Stunden (12) findet man die Stärkekörner gerade so korrodiert, wie wenn sie direkt mit Speichel zusammengebracht werden. Es ist also das Ferment imstande, relativ sehr dicke Gelatineschichten ebenso, ja, wie es scheint, noch leichter zu durchwandern wie eine Membran. Da nun wirklich freie Stärkekörnchen von Elodea selbst von einer so verdünnten Fermentlösung, wie man sie im Inneren der Zellen bei Behandlung derselben mit Speichel voraussetzen muss, dennoch gelöst werden, so sieht man sich gezwungen, den Stromahüllen besondere Eigenschaften zuzuschreiben, die ihre aussergewöhnliche Undurchdringlichkeit verursachen. Man dürfte kaum fehl gehen, wenn man in dieser Beziehung ihrer chemischen Zusammensetzung die grösste Bedeutung zuschreibt. Auf gewisse Besonderheiten derselben weist ja auch das Verhalten der Chloroplasten sowie des umgebenden Plasmas gegen eiweissverdauende Fermente hin, auf das ich schon in meiner Elodea-arbeit (l. c.) kurz hinwies.

b) Pepsin.

Dass Proteasen pflanzliche Zellmembranen zu durchwandern imstande sind, muss ohne weiteres aus der Tatsache gefolgert werden.

dass sie als Bestandteile von Drüsensekreten auftreten, welche bei gewissen Pflanzen (Insektivoren) in Zellen gebildet werden, die wie alle anderen von Cellulosemembranen umhüllt sind. Aber auch sonst scheint in den Kreisen der Botaniker ziemlich allgemein die Ansicht verbreitet zu sein, dass wenigstens Pepsin leicht eindringt; denn nur so lässt sich erklären, dass schon seit lange die Behandlung mit künstlichem Magensaft als mikrochemische Methode üblich ist, obschon gerade ihr gegenüber Bedenken am meisten gerechtfertigt erscheinen; denn nur zu leicht kann man hier verführt werden, einfach durch Säure hervorgebrachte Veränderungen mit Fermentwirkungen zu verwechseln. Dies scheint denn auch in ausgiebigem Maasse der Fall gewesen zu sein. Merkwürdigerweise hat man das viel wirksamere Trypsin anscheinend gar nicht versucht, denn sonst hätten die ausserordentlich auffallenden Wirkungen gerade dieses Fermentes kaum unbekannt bleiben können.

Was zunächst das Pepsin betrifft, so ist es, da, wie wir sehen werden, seine Wirkungen auf pflanzliches Plasma im allgemeinen negativ charakterisiert sind, besonders schwer, sich von dem Eindringen desselben in Pflanzenzellen zu vergewissern, um so mehr, als verschiedene Gründe von vornherein dagegen zu sprechen scheinen. In erster Linie der Umstand, dass alle bis jetzt dargestellten Pepsinpräparate, die dem wirklich reinen Ferment anscheinend am nächsten kommen, sich als streng kolloid, also nicht dialysierbar erwiesen. Dies gilt insbesondere auch für das von Pekelharing gewonnene Pepsin, dessen Darstellung ja gerade darauf beruht, dass es nicht dialysierbar ist. Oppenheimer schreibt dem Pepsin „in seinem bisher reinsten“ Zustande alle Eigenschaften eines Eiweisskörpers zu: „Es ist absolut nicht diffusibel durch Pergamentpapier (Hammarsten, Wolffhügel), dagegen durch Papier de la Rue (Fermi und Pernossi)“ (Fermente II. S. 526. 1903). Ich selbst hatte vor kurzem eine ganze Anzahl käuflicher Pepsinpräparate auf ihre Dialysierbarkeit geprüft und eine solche in merklichem Grade nicht feststellen können (Fermentforschung II. S. 51. 1917). Ich habe diese Versuche neuerdings mit angesäuerten Pepsinlösungen wiederholt, um zu sehen, ob vielleicht die Reaktion einen Einfluss auf das Durchtreten des Fermentes besitzt. Es kamen selbstverständlich nur sorgfältig geprüfte Dialysierhülsen zur Verwendung. Es ergab sich nun, dass unter diesen Umständen die Aussenflüssigkeit in der Tat Fibrin zu verdauen vermag, und dass demnach sicher nachweisbare Mengen des Fermentes durch Pergamentpapier diffundieren. Die sehr konzentrierte Pepsinlösung, die ich der Dialyse unterwarf, war nur minimal angesäuert; es handelte sich um ein als „Pepsin. pur.“ bezeichnetes

Präparat von Schuchardt, dessen wässrige Lösung ganz schwache Biuretreaktion gab. Die Dialyse dauerte 12 Stunden; die Aussenflüssigkeit bestand aus destilliertem Wasser und wurde nachher auf einen HCl-Gehalt von 0,1 n. gebracht. Wie ich früher zeigte (Fermentforschung II. S. 17) ist diese Konzentration die geeignetste, wenn es sich darum handelt, sehr geringe Pepsinmengen sicher nachzuweisen, da Säurehydrolyse dann nicht zu befürchten ist. Eine zugesetzte Flocke von Rohfibrin wurde bei 40° C. in 5 Stunden glatt verdaut, während 10 ccm 0,1 n. HCl mit zwei Tropfen der in der Hülse zurückgebliebenen Lösung eine gleich grosse Fibrinmenge in weniger als $\frac{1}{2}$ Stunde löste. Es handelte sich also nur um sehr kleine Mengen von Ferment, welche die Membran passiert hatten. Ich habe dann noch eine ganze Reihe anderer Pepsinpräparate unter denselben Bedingungen auf ihre Dialysierbarkeit geprüft und stets dasselbe Resultat erhalten, so dass ich nicht zweifeln kann, dass Pepsin ganz ebenso wie Ptyalin in geringem Grade dialysierbar ist; doch scheint die Reaktion dabei eine entscheidende Rolle zu spielen.

Was nun die Frage betrifft, ob es auch in unversehrte Pflanzenzellen einzudringen vermag, so ist ein direkter Beweis dafür schwer zu erbringen, da, wie ich bereits in meiner Elodeaarbeit gezeigt habe, nicht nur der Kern, sondern auch das Plasma und die Chlorophyllkörner von Pepsin-Salzsäure so gut wie gar nicht angegriffen werden. Unterwirft man ein frisches Elodeablatt oder noch besser einen beblätterten Stengel von *Mnium* der Einwirkung von künstlichem Magensaft bei 40° C., so stirbt der Zellinhalt natürlich sehr rasch ab, da ja die Säure schnell eindringt und gewisse Wirkungen bedingt, die wohl am meisten charakteristisch an den Chlorophyllkörnern hervortreten (Chlorophyllanreaktion vgl. Molisch, Mikrochemie der Pflanzen S. 223. 1913). Ich habe den Eindruck bekommen, dass diese Reaktion mit dem Verdauungsgemisch schneller und schöner erfolgt als mit reiner, verdünnter Salzsäure, und habe so geradezu ideale Präparate erhalten. Die sonstigen Veränderungen am Stroma der Chloroplasten, den Zellkernen und dem Plasma selbst sind im ganzen wenig auffallend. Aus den Untersuchungen von Zacharias, der sich bisher am eingehendsten mit solchen mikrochemischen Verdauungsversuchen beschäftigt hat, geht hervor, dass die Veränderungen, die am pflanzlichen Zellkern als Folge der Einwirkung von Pepsin-HCl hervortreten, sich nicht erheblich von jenen unterscheiden, welche auch reine, verdünnte HCl (0,1 %) hervorbringt. Letzterenfalls „quillt der Nukleolus, während die Körperchen (gemeint sind die Chromosomen) sehr scharf hervortreten“ ... „Unterwirft man Schnitte aus frischen Wurzeln von *Phajus grandifolius* der Verdauung in künst-

lichem Magensaft, so werden die Körperchen ungemein stark lichtbrechend und scharf konturiert, während Nukleoli und Zwischen-substanz ein etwas gequollenes, blasses Aussehen erhalten, was auch bei den unverdaulichen Teilen des Protoplasmas der Fall ist.“

Es ist aus den Arbeiten von Zacharias nicht klar zu ersehen, woraus er eigentlich schliesst, dass vom Plasma überhaupt etwas verdaut wird; von diesem ist nur wenig die Rede, und fast alle Angaben beziehen sich auf den Kern. Das wesentlichste Ergebnis der ganzen Untersuchungsreihe würde, wenn man die Voraussetzung gelten lässt, von der offenbar Zacharias ausging, dass Pepsin in unversehrte Pflanzenzellen einzudringen vermag, der Nachweis sein, dass nicht nur der Kern, von dem es bereits bekannt war, sondern auch der übrige Inhalt (Plasma, Chlorophyll) in der Hauptsache aus einer Substanz besteht, welche von Pepsin-HCl nicht angegriffen wird.

In seiner bekannten Arbeit über das Protoplasma von *Aethalium septicum* hat Reinke für den in Pepsin-HCl unverdaulichen Anteil des Plasmodiums, der etwa 30 % der Trockensubstanz ausmacht, den Namen „Plastin“ eingeführt und als besonders charakteristisch den geringen N-Gehalt (12 %) sowie die Unlöslichkeit in verdünnten Säuren und Alkalien und auch im Magensaft hervorgehoben. Zacharias und Frank-Schwarz haben das Vorkommen desselben Körpers sowohl im Kern wie auch im Plasma von Pflanzenzellen behauptet, und der letztgenannte Autor vertritt sogar die Ansicht, dass das Plastin der einzige darin nachweisbare Proteinstoff sei. Dass pflanzliches Plasma, wenigstens das älterer Zellen, sich durch manche Besonderheiten auszeichnet und jedenfalls genuine Eiweisskörper immer nur in sehr geringer Menge enthält, geht übrigens auch aus dem Umstände hervor, dass gewisse Farbenreaktionen, welche derartige Eiweissstoffe unter allen Umständen geben, beim Protoplasma durchaus nicht immer Erfolg haben. C. Sachs machte bereits darauf aufmerksam, dass Violettfärbung bei Behandlung mit Kalilauge und Kupfersulfat (Biuretreaktion) nur in jugendlichen Pflanzenzellen auftritt, bei der Streckung der Parenchymzellen aber verschwindet. Er zieht daraus den Schluss, „dass in den wachsenden Zellen sowohl Protoplasma wie Zellsaft keinen Proteinstoff vom Charakter der Albumine oder Globuline enthalten, sondern nur Plastin“. Dass übrigens wohlcharakterisierte Globuline in Pflanzengewebe vorkommen, ist seit lange bekannt; freilich beziehen sich die betreffenden Beobachtungen mehr auf die Reserveeiweisskörper der Samen und Wurzeln, welche zwar Produkte, nicht aber integrierende Bestandteile des Plasmas sind und bekanntlich sehr oft in Kristallform abgelagert werden.

Indessen hat schon Hoppe-Seyler Globuline auch aus Knospen und jungen Trieben gewonnen, wie er denn überhaupt der Ansicht war, dass Globuline und Vitelline Bestandteile jedes Plasmas seien. Dies dürfte ja wohl auch zutreffen, wenn man an den Zellsaft denkt und darunter nicht nur den Inhalt der Vakuolen, sondern auch die Flüssigkeit versteht, welche das Plasma in seiner Gesamtheit durchtränkt. Dass aber dieses selbst einfache Proteine kaum enthält, darf schon auf Grund der Löslichkeitsverhältnisse in Wasser und Salzlösungen gefolgert werden. Auf alle Fälle hat man es aber gerade beim pflanzlichen Plasma mit einer Substanz zu tun, deren Eigenschaften nicht nur von denen gewöhnlicher einfacher Eiweisskörper, sondern auch von denen der meisten tierischen Plasmaformen weit abweichen.

Indem ich mir vorbehalte, über die sehr eigenartige chemische Zusammensetzung später zu berichten, soll hier zunächst nur das mikrochemische Verhalten besprochen werden, soweit es sich um die Verdaulichkeit handelt.

Das, was am meisten auffällt, ist die ausserordentliche Widerstandsfähigkeit selbst gegen starke Säuren und Laugen, von der ich mich bei meinen Untersuchungen über die Blattzellen von *Elodea* oft genug zu überzeugen Gelegenheit hatte. Es gilt dies vor allem auch von der Stromasubstanz der Chromatophoren, die ja gewöhnlich als Plasma angesprochen wird. Nach A. Meyer erscheint der Chloroplast „als ein je nach Umständen mehr oder weniger zähflüssiger Tropfen einer farblosen oder hellgelblichen Substanz (Stroma), in welcher zähflüssige Tröpfchen (Grana) einer durch Chlorophyllfarbstoff dunkelgrün gefärbten Substanz liegen, ferner als feste Körper mehr oder weniger gut ausgebildete Kristalloide von Proteinstoffen (Globuline) und die Stärkekörner wachsen können“. Von einer völligen Identität der Stromasubstanz mit dem übrigen Plasma kann ja schon deswegen nicht wohl gesprochen werden, weil es sich um Differenzierungen mit besonderen Funktionen handelt. Immerhin wird man kaum fehlgehen, wenn man der Stromasubstanz eine wenigstens ähnliche chemische Zusammensetzung zuschreibt wie dem Plasma. Um nun über diese letztere etwas Näheres zu ermitteln, schien das Studium der durch Verdauungsfermente eventuell zu bewirkenden Veränderungen am ehesten Erfolg zu versprechen. Zunächst musste aber die angebliche Unverdaulichkeit des „Plastins“ in Pepsin-HCl, die durch die bisherigen Untersuchungen an höheren Pflanzen keineswegs als sicher festgestellt gelten konnte, näher geprüft werden. Dass der Inhalt unversehrter Blattzellen von *Elodea* oder *Mnium* auch nach tagelanger Einwirkung sehr kräftig wirkender Pepsin-HCl-Gemische nicht gelöst wird, kann auch jetzt, wo das Eindringen des Fermentes nicht

nur als möglich, sondern sogar als wahrscheinlich gelten kann, nicht als vollgültiger Beweis der Unverdaulichkeit angesehen werden, da es sich ja unter allen Umständen nur um äusserst geringe Pepsinmengen handeln könnte, die den Weg ins Innere der Zellen gefunden haben. Da aber, wie ich gezeigt habe, in einer starken Pepsinlösung auch der Inhalt angeschnittener Zellen erhalten bleibt, so erscheint die Tatsache der Unverdaulichkeit nicht mehr zweifelhaft. In sehr eleganter Weise kann man sich davon auch überzeugen, wenn man mittels der im Schneckenmagensaft enthaltenen Cytase die Cellulosehüllen auflöst und den freigewordenen Inhalt dann mit Pepsin-HCl behandelt. Am besten eignen sich Abschnitte von Kohl- oder Salatblättern von etwa 1 cm Seitenlänge. Werden solche für 12 Stunden mit dem Lebersekret („Magensaft“) von *Helix pomatia* bei Zimmertemperatur behandelt, so findet man dann infolge der Auflösung der Membranen bei sämtlichen Parenchymzellen die Plasmaschläuche mit den Chloroplasten völlig isoliert (vgl. diese Beiträge in Pflüger's Arch. Bd. 75 S. 48. 1899) und bis auf die Stärkeeinschlüsse ganz unversehrt. Lässt man nun nach gehörigem Auswaschen des grünen Parenchymbreies mit Wasser Pepsin-HCl bei 40° C. einwirken, so bleiben die isolierten Protoplasten vollständig erhalten, und nur ihre braune Verfärbung (Chlorophyllan) verrät die Säurewirkung. Dagegen findet man dieselben nebst den Chlorophyllkörnern schon nach kürzester Zeit aufgelöst, wenn man sie mit der grünefärbten Flüssigkeit auf dem Objektträger eindeckt, welche sich im Darmkanal hungernder Kohlräupen (*Pieris brassicae*) findet und ein äusserst energisch wirkendes proteolytisches Ferment von tryptischem Charakter enthält.

Wie ich in der oft zitierten Elodeaarbeit zeigte, gelingt es leicht, den gesamten Inhalt plasmolysierter Blattzellen durch Einwirkung starker H_2SO_4 (2:1 mit Wasser verdünnt) in Form wurstähnlicher länglicher Körper zu isolieren (Flora l. c. S. 603 Abb. 19), die sich dann auch nach dieser eingreifenden Vorbehandlung noch als völlig unverdaulich in Pepsin-HCl erweisen. Auch nach mehr als 12stündiger Einwirkung einer äusserst kräftigen Pepsinlösung war keine Spur einer Veränderung an den isolierten Inhaltskörpern zu erkennen. Sie verhalten sich absolut widerstandsfähig. Wenn also etwas vom Inhalt der Zellen gelöst wird, so könnte es sich nur um sehr geringe Anteile des Plasmas sowie um Eiweiss handeln, welches im Zellsaft gelöst enthalten ist. Da man allen Grund hat, anzunehmen, dass sich pflanzliches Plasma verschiedener Herkunft nicht prinzipiell verschieden verhalten wird, so ergibt sich demnach, dass Pflanzenzellen, gleichgültig, ob roh oder gekocht oder sonstwie zubereitet, vom sauren Magensaft auch dann so gut wie gar nicht

angegriffen werden, wenn sie vollkommen eröffnet sind. Nicht nur die Kerne sind in Pepsin-HCl unverdaulich, sondern ebenso auch die Chloroplasten und, wenigstens zum weitaus grössten Teil, das Plasma. Hält man demnach die Unverdaulichkeit in Pepsin-HCl für ein charakteristisches Merkmal des sogenannten „Plastins“, so müsste man sagen, dass auch das strömende Plasma in der Hauptsache aus einem solchen Proteid besteht.

Ich verkenne nicht, dass trotz des Anscheins der völligen Unversehrtheit des plasmatischen Inhaltes einer Pflanzenzelle nach der Behandlung mit Pepsin-HCl dennoch die Möglichkeit besteht, dass ein gewisser, wenn auch geringer Anteil des ursprünglichen Bestandes an Proteinkörpern herausgelöst wurde. Die mikroskopische Untersuchung allein kann hier offenbar kaum entscheidend sein.

Es muss auch makrochemisch geprüft werden, ob und welche Produkte bei der peptischen Verdauung geeignet vorbereiteten Pflanzenmaterials gebildet werden, was ja in Hinblick auf das Vorhandensein gelöster Eiweissstoffe im Zellinhalt von vorn herein anzunehmen ist. Ich möchte aber schon hier darauf hinweisen, dass auch das Aussehen mikroskopischer Objekte in manchen Fällen darauf hinweist, dass es sich bei der peptischen Unverdaulichkeit des Pflanzenplasmas doch nur um die absolute Widerstandsfähigkeit der Hauptmasse handelt, während offenbar ein gewisser, wenn auch kleiner Anteil herausgelöst wird, was dann gelegentlich auch zu mikroskopisch erkennbaren Veränderungen führt. Sehr deutlich habe ich solche immer bei den subepidermalen, Chlorophyll und Stärke führenden Parenchymzellen der unreifen jungen Bohnenschoten gesehen. Man muss zu diesem Zwecke durch Plasmolyse den Zellinhalt zur Ballung bringen. Daran schliesst sich dann Behandlung mit Alkohol bis zu völliger Entfärbung, worauf erst Schnitte angefertigt werden. Nun müssen diese noch durch Behandlung mit Speichel entstärkt werden und sind dann erst für die peptische Verdauung vorbereitet. Die Plasmaballen im Inneren der ziemlich dickwandigen, spärlich und gross getüpfelten Zellen zeigen infolge der herausgelösten relativ grossen Stärkeeinschlüsse der Chloroplasten ein lockeres, schwammiges Gefüge und eignen sich daher sehr gut, um einen eventuellen Substanzverlust mikroskopisch zu erkennen. Denn es ist klar, dass dies in solchem Falle viel besser zur Geltung kommen wird als dann, wenn es sich um eine ganz kompakte Masse oder auch um einen plasmatischen Wandbelag handelt. Schon makroskopisch unterscheidet sich ein in der angegebenen Weise vorbehandelter Schnitt nach mehrstündiger Verdauung mit Pepsin-HCl durch seine grössere Durchsichtigkeit, und mikroskopisch ist unschwer zu erkennen, dass ungeachtet der Er-

haltung der Form und Grösse der Plasmamasse dieselbe doch viel blasser und zarter im Gefüge geworden ist, so dass sich nun namentlich die durch ihr verhältnismässig starkes Lichtbrechungsvermögen ausgezeichneten Stromata der stärkefreien Chloroplasten viel schärfer von der Umgebung abheben als vorher. Hiermit steht nun in Übereinstimmung, dass, wie in einer folgenden Arbeit gezeigt werden soll, bei peptischer Verdauung geeigneten Pflanzenmaterials sich stets Albumosen in der Flüssigkeit nachweisen lassen. Auch an den Schliesszellen der Spaltöffnungen von *Dahlia* lassen sich nach vorgängiger Plasmolyse und Extraktion mit Alkohol bei der Verdauung mit Pepsin-HCl unzweifelhafte Veränderungen, wenngleich keine Lösung der kleinen Plasma-Chlorophyll-Ballen erkennen. Diese nehmen an Volumen etwas ab und werden zugleich durchsichtiger.

Ich wende mich jetzt zur Besprechung der Wirkungen des Trypsins auf Pflanzenzellen, welche in noch viel höherem Maasse als das geschilderte Verhalten gegen Pepsin-HCl die Sonderstellung pflanzlichen Plasmas in chemischer Hinsicht beweisen.

c) Trypsin.

Da, wie ich zeigen werde, das Trypsin unter gewissen Bedingungen ausserordentlich energisch den plasmatischen Inhalt pflanzlicher Zellen angreift, auch wenn deren Wand absolut unversehrt ist, so ist damit ohne weiteres der Beweis gegeben, dass das Ferment, und zwar, wie es scheint, viel leichter als Pepsin, die Cellulosemembran zu durchdringen vermag. Meine ersten Erfahrungen bezogen sich wieder auf die Blattzellen von *Elodea* und *Vallisneria*, die sich ja zu allen derartigen Versuchen ausgezeichnet eignen. Ich habe darüber in aller Kürze am Schlusse meiner *Elodea*-Arbeit berichtet. Zunächst schien es, als ob auch gegen Trypsin der Zellinhalt völlig widerstandsfähig wäre, denn alle Versuche mit frischen Blättern fielen durchweg negativ aus, und ich konnte selbst bei tagelang fortgesetzter Verdauung mit äusserst wirksamem Trypsin in 0,5 %iger Sodalösung keine irgend nennenswerten Veränderungen feststellen. Die Chloroplasten blieben auch in angeschnittenen Zellen in Form und Farbe erhalten, und auch das Plasma schien keine Veränderung erfahren zu haben. Als ich aber plasmolysierte und dann mit Alkohol extrahierte Blätter dem Versuch unterwarf, ergab sich das überraschende Resultat, dass nun in kürzester Zeit Verdauung (Lösung) des gesamten plasmatischen Inhaltes der geschlossenen Zellen erfolgte. Es schien daher der Schluss gerechtfertigt, dass alkohollösliche (lipoide) Substanzen des Plasmas und der Chloroplasten einen sehr wirksamen Schutz gegen die Einwirkung des Trypsins verleihen.

Äusserst energisch wirkt Trypsin auch nach vorhergehender Behandlung der Blätter mit Schwefelsäure (2:1 Wasser) auf die so freigewordenen Inhaltskörper ebensowohl wie auch auf die, die noch von den gequollenen Membranen umschlossen sind. Es erfolgt restlose Lösung schon bei gewöhnlicher Temperatur.

Ich habe diese Versuche seither weitergeführt und teile in folgendem die Ergebnisse mit.

Zunächst habe ich mich davon überzeugt, dass es für die Vollständigkeit und Schnelligkeit der tryptischen Verdauung des plasmatischen Zellinhaltes vor allem darauf ankommt, dass die Extraktion der lipoiden Bestandteile eine möglichst erschöpfende gewesen ist. Dem einfachen längeren Einlegen in Alkohol absol. liess ich daher später in der Regel noch Auskochen mit Alkohol sowie Extraktion mit Äther und schliesslich mit Chloroform folgen. Für das Gelingen aller tryptischen Verdauungsversuche mit Pflanzenmaterial ist es ferner ganz wesentlich, die üblichen Zusätze antiseptischer Mittel nach Möglichkeit zu vermeiden, da sie, wie sich bald herausstellte, in hohem Grade hemmend wirken. Insbesondere gilt dies von dem viel verwendeten Thymol, in dessen Anwesenheit die verdauende Wirkung im vorliegenden Falle so gut wie ganz fehlt, selbst wenn nur wenig zugesetzt wird. Besser wirkt schon ein mässiger Zusatz von Chloroform, am allerbesten aber werden Antiseptika ganz vermieden. Dies hat nun freilich bei der bekannten Schnelligkeit, mit der sich in tryptischen Verdauungsflüssigkeiten Bakterien entwickeln, sein Missliches, und es sind insbesondere alle langfristigen Versuche dadurch ganz ausserordentlich erschwert und vielfach unmöglich. Glücklicherweise ist aber die Wirkung des Trypsins auf entsprechend vorbehandelte Präparate eine so energische und die zur Lösung erforderliche Zeit daher so kurz, dass gar nicht daran gedacht werden kann, die beobachteten Wirkungen etwa auf Bakterien zu beziehen, die im gegebenen Falle ja auch schon aus dem Grunde weniger zu fürchten sind, weil sie in Pflanzenzellen, solange deren Membranen unversehrt sind, überhaupt nicht einzudringen vermögen; eine etwaige Celluloselösung aber macht sich immer erst nach langer Zeit geltend. Dennoch habe ich, um ganz sicher zu sein, stets einen Kontrollversuch mit Chloroform gleichzeitig angesetzt. Auf die schädigende Wirkung der Antiseptika auf das Trypsin ist auch schon von anderer Seite aufmerksam gemacht worden¹⁾, wiewohl sich dieselbe bei Verwendung tierischer Stoffe bei weitem nicht in dem Maasse geltend macht.

Um sich von der überaus raschen Wirkung des Trypsins zu überzeugen, verdaut man am besten auf dem Objektträger. Bei einem

1) Kaufmann, Z. f. physiol. Chem. Bd. 39 S. 434. 1903.

in der angegebenen Weise vorbehandelten plasmolysierten Elodeablatt erfolgt nach Eindeckung des Präparates mit Trypsinlösung bei gewöhnlicher Zimmertemperatur die Lösung des Plasma-Chlorophyll-Ballens in den Zellen schon innerhalb 3 Stunden, so dass man die Veränderungen Schritt für Schritt unter dem Mikroskop verfolgen kann. Man konstatiert dabei ein ganz allmähliches Erblassen und stetig zunehmende Aufhellung des Zellinhaltes ohne Quellung oder Zerfall. Schliesslich bleibt von jedem Ballen nur ein ganz blasser, bei sorgfältiger Abblendung des Lichtes eben noch erkennbarer Rest übrig, aus dem die kleinen, stark lichtbrechenden Stärkeeinschlüsse der Chloroplasten nun scharf begrenzt hervorglänzen, ohne dass dabei Form und Grösse der Ballen auch nur die geringste Änderung erfährt. So bleibt es, bis endlich die blasse Umhüllungsmasse völlig unsichtbar (gelöst) wird und die Stärkekörnchen nun frei im flüssigen Zellinhalt schwimmen.

Verwendet man zu dem Versuch Elodea- oder noch besser Mniumblätter, welche nicht erst plasmolysiert, sondern sofort in Alkohol eingelegt und dann nach der Entfärbung noch mit Äther und Chloroform ausgezogen wurden, so liegen die namentlich bei Mnium sehr grossen Chloroplasten gleichmässig in den Zellen verteilt, und man hat so besser Gelegenheit, ihre Veränderungen bei tryptischer Verdauung zu studieren. Jedes Korn stellt, von der Fläche gesehen, ein rundes Scheibchen dar, welches infolge der herausgelösten „Grana“ bei starker Vergrösserung fein punktiert erscheint. Lässt man nun eine starke Trypsinlösung auf dem Objektträger einwirken (am besten auf dem heizbaren Objektisch), so sieht man die Scheibchen sehr bald erblassen und schliesslich ohne Änderung ihrer Form und Grösse verschwinden, wobei die eingeschlossenen Stärkekörnchen frei werden.

Das überaus zierliche Bild, welches plasmolysierte und nach entsprechender Vorbehandlung mit Trypsin verdaute Elodeablätter mit den isolierten Stärkekörnergruppen in den Zellen darbieten, wird noch übertroffen von Präparaten, welche in ganz gleicher Weise von Vallisneria gewonnen werden. Ein verdautes Blattstückchen wird so durchsichtig, dass man beim Heben und Senken der Tubus die ganze Dicke des Blattes durchmustern und in jeder Schicht alle Einzelheiten erkennen kann.

Ich muss nochmals besonders betonen, dass eine wirklich restlose Lösung des plasmatischen Zellinhaltes durch Trypsin sich nur dann erzielen lässt, wenn der Alkoholbehandlung noch eine längere Extraktion mit Äther und namentlich mit Chloroform folgt. Man kann sich davon am besten am Spinat überzeugen, dessen Blattparenchym aus grossen, dünn-

wandigen, an Plasma und Chlorophyll sehr reichen Zellen besteht, die sich schon beim Kochen leicht voneinander trennen. Es erscheint dann der Inhalt in ähnlicher Weise klumpig geballt, wie man es sonst nur durch Plasmolyse erzielen kann. Zwischen der zentralen Plasma-Chlorophyll-Masse und der Membran bildet sich in der Regel ein breiter Zwischenraum, so dass man etwaige Veränderungen des Ballens sehr gut beobachten kann. Ich habe die frischen Blätter in der Regel 1–2 Stunden gekocht, wobei sich das Kochwasser bräunlichgelb färbt; die schön grüne Blättermasse wurde dann ausgedrückt und wie bei der Zubereitung in der Küche fein zerhackt, mit kaltem Wasser gründlich ausgewaschen und nach Abpressen in einem Tuch abermals gekocht. Dieses Verfahren wurde dann noch mehrmals wiederholt, bis das Kochwasser sich nicht mehr gelb färbte. Der Spinatbrei wurde dann nach gutem Abpressen mit Alkohol übergossen und so lange extrahiert, bis die Blattfragmente völlig entfärbt waren. Untersucht man die farblose Masse in Wasser mit dem Mikroskop, so findet man neben zahlreichen ganz isolierten Zellen und Zellgruppen kleine, noch durch die Gefässbündel zusammengehaltene und von Epidermis bedeckte Blattfragmente, deren Parenchym reichlich von grossen, runden Zellen durchsetzt erscheint, welche je eine kugelige Druse von Kalkoxalatkristallen enthalten, die den Raum der Zellen fast ganz ausfüllen. Einzelheiten der Form und Oberflächenbeschaffenheit lassen sich unter diesen Umständen nur schlecht erkennen, da die Drusen noch von Plasma eingehüllt sind und undurchsichtige schwarze Körper darstellen. An den zahlreichen ganz freien Parenchymzellen überzeugt man sich leicht von der Zusammensetzung der centralen Ballen aus vielen, noch gut erkennbaren, entfärbten Chlorophyllkörnern, welche den Hauptbestandteil bilden, so dass vom Plasma als solchem nicht viel zu sehen ist.

Wenn man eine kleine Probe der so vorbereiteten Spinatmasse, die also nur mit kaltem Alkohol, wenn auch eventuell wochenlang extrahiert wurde, nach gehörigem Auswaschen mit Wasser in einem Reagenzglas mit Trypsin bei 40° C. ohne Thymolzusatz oder mit Chloroform 3–4 Stunden verdaut, so findet man die Fragmente nachher ganz durchsichtig geworden. Unter dem Mikroskop treten die Gefässbündel prachtvoll hervor; auch sieht man schon mit blossen Auge die erwähnten, Oxalat führenden Zellen als weisse (resp. im durchfallenden Licht dunkle) Pünktchen. Auf den ersten Blick erhält man den Eindruck, als ob die Parenchymzellen völlig entleert wären; bei genauerem Zusehen aber bemerkt man in jeder ganz deutlich einen blassen Rest des Plasma-Chlorophyll-Ballens, nur ist dessen Volum viel kleiner als vor der Verdauung und die Substanz viel durchsichtiger geworden. Vielfach er-

scheint ein solcher Inthaltkörper wie ein Haufe Bakterien, indem stäbchenförmige, stark lichtbrechende Gebilde in einer blassen Grundsubstanz eingebettet liegen. Bei genauerem Zusehen erkennt man aber leicht, dass es sich um die Stromata von Chloroplasten in Seitenansicht handelt. Färbt man mit Eosin, so nehmen sie eine rosa Färbung an, und man sieht sie dann auch in vielen Zellen in Flächenansicht als zart rosa gefärbte Scheibchen. Es wird demnach auch nach wochenlanger Einwirkung von Alkohol bei gewöhnlicher Temperatur immer nur ein gewisser, allerdings sehr erheblicher Teil des festen plasmatischen Zellinhaltes durch Trypsin verdaut, während namentlich von den entfärbten Chlorophyllkörnern beträchtliche Reste zurückbleiben. Unterwirft man dagegen das gleiche Objekt erst nach vorgängigem Auskochen mit Alkohol und darauffolgender Extraktion mit Äther und Chloroform der tryptischen Verdauung, so ist der Erfolg immer der, dass nach 3—4 Stunden alle Zellen ihres gesamten Inhaltes völlig beraubt sind und nun leere Cellulosehülsen darstellen. Davon machen natürlich nur diejenigen eine Ausnahme, welche die erwähnten Oxalatdrusen einschliessen, die nun völlig gereinigt alle Einzelheiten ihrer Form auf das klarste erkennen lassen. Man sieht an ihrer Oberfläche überall Oktaederspitzen herausragen, so dass sie über und über mit Stacheln besetzten Kugeln gleichen. Grössere Blattstückchen sind so durchsichtig geworden, dass man die Epidermis der Unterseite bei tiefer Einstellung ebenso deutlich zu erkennen vermag wie die dem Beschauer zugewendete Epidermislage. Da die Spinatblätter mehrfach ausgekocht wurden, so ist natürlich von Stärkekörnern nichts mehr zu sehen; wohl aber lässt sich an den farblosen extrahierten Blattstückchen und namentlich an den zahlreichen, ganz isolierten Parenchymzellen vor der Verdauung reichlich gequollene Stärke nachweisen, die, wie schon erwähnt wurde, zum Teil in Form von Tropfen, die sich mit Jod schwarzblau färben, frei in den Zellen liegt. Ich war sehr überrascht, in den mit Trypsin völlig ausverdauten Zellen bei Jodzusatz keine Spur mehr der vorher doch reichlich vorhanden gewesen Stärke zu finden. Ich musste demnach annehmen, dass das von mir hauptsächlich benützte Trypsinpräparat (von Merck) auch wirksame Pankreasdiastase enthielt. Ein Versuch mit Stärkelösung zeigte denn auch sehr bald, dass dies wirklich der Fall war, indem die Jodreaktion schon nach kurzer Zeit negativ wurde. Es liefert dieses Verhalten zugleich auch den Beweis dafür, dass nicht nur Ptyalin und pflanzliche Diastase, sondern auch die Amylase des Pankreas unversehrte Cellulosemembranen zu durchdringen vermag. Andererseits zeigt der Versuch aber auch sehr anschaulich, wie viel leichter gequollene oder

gar gelöste Stärke angegriffen wird als Stärkekörner, auch wenn dieselben noch so klein sind. Anderenfalls wäre ja eine Isolierung der Stärkeeinschlüsse durch Verdauung mit demselben Trypsinpräparat, wie sie an den Blattzellen von *Elodea* oder *Vallisneria* so schön gelingt, nicht möglich gewesen. Hier bedarf es noch ausserdem der Behandlung mit Speichel, um die Körnchen zur Lösung zu bringen, und auch dann bleiben noch viele der grösseren erhalten. Auch die sehr kleinen Stärkeeinschlüsse der Chloroplasten der Spaltöffnungszellen von *Dahlia* wurden durch mein Trypsinpräparat zwar völlig isoliert, aber nicht gelöst.

Es bedarf nach dem Mitgeteilten wohl kaum noch der besonderen Erwähnung, dass nur gekochte und gar nicht weiter vorbehandelte Blattzellen des Spinates der tryptischen Verdauung anscheinend völlig Widerstand leisten, soweit sich dies durch mikroskopische Beobachtung feststellen lässt. Makrochemisch lässt sich aber in der Tat zeigen, dass eine teilweise Verdauung doch stattfindet.

Nach diesen Erfolgen war ich begierig zu erfahren, wie sich grössere, sonst ganz unversehrte Blattfragmente von Pflanzen verhalten, die ein viel derberes Gefüge und insbesondere auch eine sehr viel widerstandsfähigere Epidermis besitzen als die zarten, weichen Spinatblätter, namentlich im gekochten Zustand. Ich dachte dabei vor allem an die ja auch als Nahrung für Pflanzenfresser in erster Linie mit in Betracht kommenden Gräser.

So ohne weiteres sind selbst zartere Grasblätter viel zu undurchsichtig und ausserdem so stark lufthaltig, dass man von ihrer Struktur bei mikroskopischer Untersuchung nur wenig zu erkennen vermag. Doch werden sie bei der zu einer erfolgreichen Verdauung notwendigen Vorbehandlung mit Alkohol, Äther und Chloroform schliesslich doch so durchsichtig, dass man durch die Schicht der langgestreckten Epidermiszellen die Anordnung sowohl wie die Beschaffenheit des Inhaltes der an Chlorophyllstärke reichen Parenchymzellen sehr wohl zu erkennen vermag, namentlich wenn man in Glycerin untersucht. Beiderseits findet sich subepidermal je eine Lage kleiner, fast kugeligere Zellen mit verhältnismässig dicken, nicht porösen Wänden, die zwischen je zwei Gefässbündelsträngen in Reihen angeordnet liegen und in dem plasmatischen Wandbelag ziemlich grosse Chlorophyllkörner enthalten. Durch Behandlung mit Jod kann man die Stärkeeinschlüsse sehr deutlich sichtbar machen. Diese, den Pallisadenzellen anderer Blätter entsprechenden Zellschichten umschliessen das Schwammparenchym, welches bei den von mir untersuchten Grasarten aus in Querreihen angeordneten, grosse Lufträume zwischen sich lassenden, länglichen, sonst aber ganz ähnlich gebauten Zellen besteht, die ebenfalls zahlreiche Chloroplasten enthalten. Wenn man

etwa zentimeterlange Stücke solcher Grasblätter, die in der angegebenen Weise vorbehandelt sind, mit Trypsin verdaut, so findet man nach 3—4 Stunden, von jedem der beiden Querschnitte ausgehend, die Zellen völlig leer, aber nur in einer Zone, welche nach innen zu etwa fünf bis sechs Querreihen von Zellen umfasst, während die weiter im Innern gelegenen zwar in verschiedenem Grade „angedaut“, aber nicht völlig entleert erscheinen. Die in der Mitte zwischen den beiden Querschnitten gelegenen Elemente zeigen meist nur geringe Veränderungen. Die Fermentlösung dringt demnach hier fast nur von den Schnittflächen her ein, und scheint die Epidermis für dieselbe trotz der zahlreichen Spaltöffnungen kaum durchlässig zu sein. Man muss daher, wenn vollständige Ausverdauung beabsichtigt wird, wesentlich kleinere, quadratische Blattstückchen benutzen, die an allen vier Seiten von Schnittflächen begrenzt sind und so die günstigsten Bedingungen für das Eindringen des Fermentes darbieten. Das, was an solchen glasartig durchsichtig gewordenen Präparaten vor allem auffällt, ist das Erhaltenbleiben der Kerne in den sonst total entleerten Zellen, um so mehr, als von diesen vorher kaum etwas zu sehen ist. Es verhalten sich also die Kerne in diesem Falle der tryptischen Verdauung gegenüber ganz so, wie sonst bei Einwirkung von Pepsin-HCl. Da ich bei keinem der bisher erwähnten Objekte jemals auch nur die Andeutung eines Kernes in ausverdauten Blattzellen gesehen habe, so bleibt kaum eine andere Annahme übrig, als dass im gegebenen Falle die Kernsubstanz chemisch anders geartet sein muss. Zunächst bin ich freilich nicht in der Lage, auch nur vermutungsweise darüber etwas auszusagen; doch ist die Tatsache um so bemerkenswerter, als, wie ich zeigen werde, eine solche Kernisolierung auch bei der Verdauung von Pflanzenteilen im Darm gewisser wirbelloser Tiere vorkommt.

Über das Verhalten der Kernsubstanzen gegen Trypsin habe ich genauere Angaben nicht finden können. Von vornherein wäre ja das Erhaltenbleiben von Kernresten keineswegs ausgeschlossen, wenn man berücksichtigt, dass die Nukleoproteide komplizierte Eiweissverbindungen darstellen, von denen nur gewisse Anteile der Wirkung von Proteasen zugänglich sind. In der Bearbeitung der Nukleoproteide im Biochemischen Handlexikon IV. S. 986 heisst es bezüglich deren Verdauung wie folgt: „Durch Behandeln mit Pepsin-HCl wird Eiweiss abgespalten und weiter peptonisiert, und es hinterbleiben Nukleine, P-reichere Verbindungen stärker saurer Natur, die ihrerseits manchmal weitergespalten werden in Eiweiss und Nukleinsäure. Ebenso, nur schneller, wirkt Trypsin.“ Nach Abderhalden (Lehrb. I. S. 654) werden aus dem bei der Magenverdauung übrigbleibenden Kernrest

bei darauffolgender tryptischer Verdauung Nukleinsäuren abgespalten. Er drückt sich darüber folgendermaassen aus: „Da es gelungen ist, aus den Nukleoproteiden durch Verdauung mit Magensaft einen von diesem nicht weiter spaltbaren Rest abzuspalten, während gleichzeitig Eiweiss in Peptone übergeführt wird, so nimmt man an, dass die Nukleoproteide einen Eiweisskomplex besitzen, der locker in das ganze grosse Molekül eingefügt ist, während ein zweiter Komplex mit der Nukleinsäure noch in Verbindung bleibt und das erwähnte, vom Magensaft übriggelassene Produkt darstellt. Es ist ‚Nuklein‘ genannt worden. Vom Pankreassaft wird dieses in Nukleinsäuren und Eiweiss gespalten. Dieses letztere wird dann hydrolytisch abgebaut.“ Da Nukleinsäuren in Alkalien leicht löslich sind, so würde es verständlich sein, dass Zellkerne wenigstens nach Vorbehandlung mit Pepsin-HCl vom Trypsin gelöst werden, wobei allerdings vorausgesetzt wird, dass die Eiweisskomponente der Nukleine vom Trypsin angegriffen wird. Dies braucht aber nicht notwendig der Fall zu sein, wie sie sich ja auch dem Pepsin gegenüber so gut wie unangreifbar erweist. Da unsere derzeitigen Kenntnisse gerade über diesen Punkt noch sehr mangelhaft sind und kaum darüber hinausgehen, dass es sich vielfach um Eiweisskörper von ausgeprägt basischem Charakter handelt, so wird man darauf gefasst sein müssen, bei verschiedenen Kernen Nukleine von wechselnden Eigenschaften zu finden, und es könnte sehr wohl sein, dass im einen Falle tryptische Lösung erfolgt, in einem andern aber ausbleibt. Dass auch sonst Unterschiede im Verhalten pflanzlichen Plasmas sowie der Chromatophoren gegenüber der tryptischen Verdauung hervortreten, geht schon aus den mitgeteilten Erfahrungen hervor, die zur Genüge erkennen lassen, dass das Ferment bei gleicher Vorbehandlung im einen Falle rascher als im andern einwirkt. So wird trotz viel grösserer Dicke der Zellwand der plasmatische Inhalt der Elodea- und Vallisneriazellen unzweifelhaft schneller gelöst als der der äusserst dünnwandigen Blattzellen des Spinates oder derjenigen der Grasblätter. Nach dem Verhalten dieser letzteren hätte man erwarten dürfen, dass selbst grössere Stücke der zarten, jungen Blätter von Salat aus dem Warmbeet von Trypsin sehr rasch und leicht ausverdaut würden, wenn sie vorher in entsprechender Weise mit Alkohol, Äther und Chloroform extrahiert werden. Dies ist nun aber keineswegs der Fall. Zwar gelingt es ohne Schwierigkeit, Stücke von etwa einem Quadratcentimeter innerhalb weniger Stunden fast glashell durchsichtig zu machen, aber bei der mikroskopischen Untersuchung zeigt sich, dass dennoch keine ganz gleichmässige Entleerung aller Zellen stattgefunden hat, sondern trotz der Dünne und Zartheit der beiderseitigen Epidermislage und ganz wie bei den Ausschnitten

aus Grasblättern nur innerhalb einer allerdings breiteren Randzone, so dass sich offenbar das Ferment auch hier leichter von den Schnitt-rändern her durch Diffusion von Zelle zu Zelle ins Innere des Parenchymis verbreitet als durch die unversehrte Epidermis. Man findet den Inhalt in den Zellen der zentralen Partien des Blattstückes zwar sehr verblasst und offenbar angedaut, aber doch noch erkennbar. Ausserordentlich klar ist wieder die Nervatur des Blattes zu sehen sowie das Gefüge der entleerten Zellen in den einzelnen optischen Flächenschnitten des Blattes beim Heben und Senken des Tubus. Besonders hat mich in diesem Falle das Erhaltenbleiben der in den Epidermiszellen beider Blattflächen regelmässig vorhandenen, wenn auch nicht zahlreichen Chlorophyllkörner auch an solchen Stellen überrascht, wo die chlorophyllreichen Parenchymzellen vollkommen entleert waren. So gewinnt es den Anschein, dass bei derselben Pflanze die Chloroplasten nicht in allen Zellen völlig gleiche Eigenschaften zeigen; doch dürfte die richtige Deutung wohl die sein, dass selbst bei grösster Zartheit und Dünne die Membranen der Epidermiszellen doch eine solche Beschaffenheit besitzen, dass sie dem Durchtreten gelöster Stoffe einen wesentlich grösseren Widerstand entgegensetzen als die eventuell viel dickwandigeren, aber nicht kutikularisierten Parenchymzellen. Es liesse sich dann auch verstehen, dass bei den Blättern submerser Pflanzen (ohne Epidermis) das Ausverdauen rascher und vor allem ganz gleichmässig in allen Zellen auch bei unverletzten Blättern stattfindet. Zugunsten dieser Auffassung sprechen ferner auch noch einige andere Beobachtungen, die ich sowohl an den Epidermiszellen der Salatblätter wie auch besonders an jenen der Blattunterseite von Dahlia zu machen Gelegenheit hatte. Die letzteren zeichnen sich stets durch ihren Plasmareichtum aus; sie sind, frisch untersucht, erfüllt von einer feinkörnigen, gelblichen Substanz, die sich bei Plasmolyse mit Kochsalzlösung zu einer in der Mitte der Zelle gelegenen runden Kugel ballt und auch nach der darauffolgenden Extraktion mit Alkohol, Äther und Chloroform, wenn auch in etwas geschrumpftem Zustande, deutlich sichtbar bleibt. Wird nun mit Trypsin verdaut, so lösen sich zwar, wie schon erwähnt, die ebenfalls geballten wurstförmigen Inhaltmassen der Schliesszellen der Spaltöffnungen bis auf die Stärkekörnchen; die im Vergleich sehr grossen Plasmaballen der angrenzenden, gebuchteten Epidermiszellen aber bleiben, soviel man sehen kann, im wesentlichen unverändert. Auch in den Epidermiszellen der Salatblätter, in welchen das Plasma in der Regel homogen und daher unsichtbar erscheint, kann man wenigstens in einzelnen Zellen ein ähnliches Verhalten feststellen. Es bilden sich bei der Extraktion der Lipoidsubstanzen, entweder vereinzelt oder zu mehreren gruppiert, kugelige, ganz homogene Tropfen

oder wohl auch halbmondförmige Segmente von gelblicher Farbe, welche dann neben den entfärbten Chloroplasten den Inhalt der betreffenden Zellen ausmachen. Da man gegebenenfalls bei Sinken des Tubus die nächst unterliegenden Parenchymzellen völlig leer findet, so bleibt offenbar nur die Annahme übrig, dass die Fermentlösung durch die unversehrte Epidermis überhaupt gar nicht eindringen kann. Der Gegensatz zwischen Epidermis und Parenchymzellen tritt am schärfsten an Präparaten von frischen Dahlienblättern hervor, die man in der Weise gewinnt, dass mittels eines Rasiermessers von der Ober- oder Unterseite her Flachschnitte abgekappt werden, die aus der betreffenden Epidermislage und einer möglichst dicken Schicht des Blattparenchyms und der dazwischen verlaufenden Gefässbündel bestehen. Werden diese dann nach entsprechender Vorbehandlung mit Trypsin verdaut, so erhält man geradezu ideale Präparate, die, wenn man sie vor Druck durch zwischen Objektträger und Deckglas eingelegte Papierstreifen schützt, bei ihrer vollkommenen Durchsichtigkeit die Form und Anordnung der Zellen des Blattinneren in allen Tiefen auf das schönste erkennen lassen.

Dass sehr auffallende Unterschiede des plasmatischen Zellinhaltes in bezug auf die Angreifbarkeit durch Trypsin bei verschiedenen Pflanzen bestehen, ergibt sich sehr klar aus dem Verhalten der Zellen von *Spirogyra*, deren grosse Widerstandsfähigkeit mich sehr überraschte, zumal ich gehofft hatte, in den so charakteristischen Chlorophyllbändern dieser Algen ein zum Studium der Einzelheiten der Verdauungserscheinungen gerade besonders geeignetes Objekt vor mir zu haben. Dass sich nicht weiter vorbehandelte Fäden als ganz unangreifbar erwiesen, war ja nach allen Erfahrungen von vornherein zu erwarten. Auffallender war schon, dass nach alleiniger Extraktion mit Alkohol die Veränderungen, welche bei tryptischer Verdauung hervortraten, kaum merklich waren; ganz unerwartet war aber, dass auch nach wochenlangem Liegen in Chloroform nach vorhergehender Extraktion mit Alkohol und Äther ein restloses Ausverdauen der Zellen bis auf die Stärke nicht zu ermöglichen war. Die von mir untersuchte *Spirogyra*art (*Grevelleana*?), die ich in ungeheurer Menge in einem langsamfließenden Bache im Mai fand, fiel mir durch die grosse Verschiedenheit in der Länge resp. Breite der Zellen sowie durch entsprechende Differenzen der Form und feineren Struktur der Chlorophyllbänder auf, so dass ich zunächst an zwei verschiedene Arten in Mischung dachte. Ich überzeugte mich aber, dass es sich lediglich um Wachstumsdifferenzen handelte, durchaus denen entsprechend, welche ganz neuerdings O. Hartmann ¹⁾ bei Kultur ver-

1) O. Hartmann, Exper. Unters. über den Einfluss höherer Temp. auf Morph. u. Cytologie der Algen (Roux' Archiv Bd. 44 S. 589. 1918).

schiedener Algen bei hoher und niederer Temperatur beobachtet hat. Die Fäden mit langen, schmalen Zellen enthielten Chlorophyllbänder, deren Windungen viel mehr gestreckt und weniger zahlreich waren, auch schien das Stroma substanzärmer zu sein und enthielt so gut wie gar keine „Stromastärke“; aber auch die Pyrenoide erwiesen sich als sehr stärkearm. Oft erschienen die Bänder fast gerade und parallel der Längsachse der Zellen eingestellt; trotzdem erreichen sie meist nicht das beiderseitige Zellende. Im Vergleich zu den Chromatophoren der kurzen, gedrungenen Zellen, die mit Stärke (Stroma- und Pyrenoidstärke) meist überladen sind und bei Jodfärbung fast in toto schwarz erscheinen, sind die der gestreckten Zellen auch wesentlich schmaler und mehr zylindrisch geformt. Die Veränderungen, welche nach 3–5stündiger tryptischer Verdauung bemerkbar waren, machen sich immer am meisten in den Fäden mit langgestreckten Zellen und dementsprechend schmalen, steilgewundenen Chlorophyllbändern geltend. Unverdaut erscheinen dieselben, da die Algenfäden vor der Extraktion plasmolysiert worden waren, um den plasmatischen farblosen Wandbelag besser zu erkennen, von der Zellmembran abgelöst und im Zusammenhang mit dem zarten Plasmasäckchen, dessen Wand im optischen Längsschnitt als ziemlich stark lichtbrechende Linie zwischen den Windungen des Spiralbandes sichtbar wird. Im übrigen tritt das eigentliche Plasma im mikroskopischen Bilde wenig hervor, da es, wenigstens nach der erwähnten Vorbehandlung, fast vollkommen hyalin erscheint oder in der Flächenansicht nur wenige, stark lichtbrechende Tröpfchen und Granula erkennen lässt. Die farblose Substanz der Chlorophyllbänder erscheint feinkörnig und umschliesst eine Reihe von Stärkeherden (Pyrenoiden), die in ziemlich gleichen Abständen liegen und am deutlichsten bei hoher Einstellung als stark lichtbrechende, hellglänzende, runde Körper hervortreten, die sich bei Jodbehandlung oft tiefschwarz färben. Ein wesentlich verschiedenes Aussehen zeigen die Fäden mit kürzeren und dementsprechend breiteren Gliedern, deren Chlorophyllbänder flacher, weniger steil gewunden und offenbar viel substanzreicher sind. Sie erscheinen dunkler und enthalten zahlreichere und grössere „Mikrosomen“; auch liegen die Pyrenoide dichter gedrängt und sind um mehr als das Doppelte grösser, was hauptsächlich auf die dicken Stärkehüllen zu beziehen ist. Da ihr Durchmesser meist den der Spiralbänder, denen sie zugehören, übertrifft, so gewinnen diese ein eigentümlich knotiges Aussehen. An vielen Stellen lässt sich erkennen, dass die Stärke in Form zahlreicher, kleiner Körnchen rings um die Pyrenoide sowie auch im verbindenden Stroma abgelagert wird.

Vergleicht man das Aussehen solcher Präparate mit anderen, gleich vorbehandelten, aber 3–4 Stunden mit Trypsin verdauten,

so ist der Unterschied auf den ersten Blick ein sehr auffallender. Man kann ihn mit zwei Worten charakterisieren: der Zellinhalt und insbesondere die Chlorophyllbänder sind viel substanzärmer geworden, und die Stärkeherde treten demgemäss ausserordentlich scharf hervor. Der Substanzverlust ist immer in den gestreckten Zellen am deutlichsten, deren Spiralbänder an sich blasser erscheinen; hier könnte man oft von einer völligen Ausverdauung sprechen, wenn nicht neben den Stärkehüllen der Pyrenoide, die als solche auch verschwunden sind, doch noch einzelne feinste Körnchen in einer ganz blassen, kaum sichtbaren Grundsubstanz als Reste der Bänder die Stärkeherde miteinander verbanden. Auch die Kontur des Plasmasäckchens, welches von der Wand abgehoben die Spiralbänder umschliesst, erscheint noch hier und da durch vereinzelte Körnchen angedeutet. Der gesamte Zellinhalt ist demnach noch zu sehen, aber freilich nur verblasst und ganz schattenhaft angedeutet. Die verdauten Stärkeherde zeigen je nach dem Grade ihrer Entwicklung ein sehr verschiedenes Aussehen. Im einfachsten Falle stellen sie im ungefärbten Zustande stark lichtbrechende, bei hoher Einstellung hellglänzende, doppeltkonturierte Ringe dar, die aber nach Ausweis der Jodfärbung nicht wirklich solche sind, sondern Kugelschalen vorstellen, welche das Pyrenoid umschliessen. Der helle Ring als optischer Durchschnitt der Kugelschale färbt sich mit Jod tief dunkel, während die umschlossene Fläche heller erscheint. Nimmt die Stärkehohlkugel an Masse zu, wie in den grossen Stärkeherden der kürzeren, die Mehrheit bildenden Zellen, so wird natürlich der Ring immer breiter, und der Helligkeitsunterschied zwischen Peripherie und Mitte gleicht sich mehr und mehr aus.

Nicht immer kommt es zu einer gleichmässigen Abscheidung von Stärke rings um das Pyrenoid, sondern sehr häufig beobachtet man statt der homogenen Kugelschale mehr oder weniger zahlreiche kleine Stärkekörnchen, welche an verdauten, ungefärbten Präparaten oft ausserordentlich deutlich zu sehen sind und jeden Stärkeherd als ein Haufwerk glänzender Körnchen erscheinen lassen. So wird es leicht verständlich, dass man oft statt eines geschlossenen homogenen Ringes einen Kranz von Stärkekörnchen findet. Gerade die Verdauungsmethode ermöglicht es, die Morphologie der Stärkeablagerung in den Herden viel besser zu studieren, als es sonst möglich ist; doch habe ich mich damit nicht eingehender befasst, da es mir in erster Linie auf das Verhalten des plasmatischen Zellinhaltes der tryptischen Verdauung gegenüber ankam.

Die grosse Widerstandsfähigkeit des Plasmas sowie der Stroma-substanz der Chromatophoren bei *Spirogyra* ist nun keineswegs eine Eigentümlichkeit aller Algen; sie bildet vielmehr eine Ausnahme

von der Regel, wonach der plasmatische Zellinhalt ganz wie bei den höheren Pflanzen vom Trypsin restlos verdaut wird, wenn alle Lipide vorher extrahiert wurden. Ein ausgezeichnetes Beispiel lieferte eine *Ödogonium* art, deren Fäden ein geradezu ideales Objekt für Verdauungsversuche bilden. Im extrahierten Zustande mit Eosin gefärbt, stellen sich in diesem Falle die Chromatophoren als der Längsachse der rechteckigen Zellglieder parallel angeordnete, feingranulierte Bänder dar, welche durch plasmatische Querbrücken von gleichem Aussehen zu einer Art Netzwerk verbunden und von Stelle zu Stelle durch grosse, runde Stärkeherde unterbrochen erscheinen, in deren Zentrum das stark lichtbrechende Pyrenoid als tiefrot gefärbtes Körperchen deutlich sichtbar ist. Ausserdem liegt in jeder Zelle ein verhältnismässig grosser Kern. Schon nach kurzer Einwirkung von Trypsin (1–2 Stunden bei 40° C.) erscheinen die Zellen ausnahmslos bis auf den Stärkeinhalt völlig entleert; es sei denn, dass einige winzig kleine Körnchen, die im flüssigen Inhalt einzelner Zellen in lebhaft zitternder Molekularbewegung schwimmen, als unverdaute Plasmareste anzusprechen wären. Die Stärke findet man in der Regel am einen oder anderen Ende der Zellen oder wohl auch in der Mitte zu einem Häufchen gesammelt, und da jede Spur umhüllenden Plasmas fehlt, so lassen sich die verschiedenen Formen der Stärkegebilde, die wieder teils geschlossene, teils offene Ringe resp. Kugelschalen darstellen, auf das deutlichste erkennen. Vom Kern habe ich niemals eine Spur auffinden können und mich von seiner restlosen Lösung auch bei Verdauungsversuchen am heizbaren Objektisch direkt mit dem Mikroskop überzeugen können.

Völlig ausverdaut werden auch, soweit ich gesehen habe, Diatomeen, deren Kieselschalen auf diese Weise vollkommen gereinigt werden können. In Hinblick auf die viel besprochene Frage nach der Verdaulichkeit (resp. der Ausnutzung) des Pilzeiweisses habe ich mit *Boletus granulatus* einige Versuche gemacht und auch hier das gleiche Verhalten des plasmatischen Inhaltes der Hyphen feststellen können, was um so bemerkenswerter ist, als ja die Membranen hier eine ganz andere chemische Beschaffenheit besitzen als bei den übrigen Pflanzen. Frisch untersucht erscheint der Hypheninhalt völlig homogen und durchsichtig; untersucht man aber Schnitte von Alkoholmaterial, so wird er durch das Auftreten von Fällungen sichtbar. Es handelt sich zum Teil um feinkörnige Niederschläge, anderenteils aber um stark lichtbrechende, grössere Tröpfchen oder netzförmig angeordnete Fäden. Wenn man feine Schnitte von frischem Pilzgewebe mit Pepsin-HCl verdaut, so bemerkt man sehr bald als Folge der Säurewirkung die Bildung glänzender, stark lichtbrechender Körnchen oder Tröpfchen, die teils locker, teils dicht geschlossen

liegen und in ihrer Gesamtheit einen Achsenstrang der Hyphen darstellen, der sich mit Methylenblau sehr intensiv färbt. Niemals erscheinen die Hyphen leer, und niemals lässt sich auch bei noch so lange fortgesetzter peptischer Verdauung eine merkliche Substanzverminderung der Achsenfäden konstatieren. Eine solche erfolgt auch dann nicht oder doch nur in sehr beschränktem Ausmaasse, wenn man nach gründlichem Auswaschen solche Präparate der Trypsinverdauung unterwirft. Ein wirkliches Ausverdauen, d. h. eine Lösung aller geformten Inhaltsbestandteile der Hyphen, ist aber leicht und sicher zu erzielen, wenn man Pilzmaterial, welches nach Behandlung mit verdünnter HCl bei 40° C. und dadurch bewirkter Ausfällung gelöster Proteide noch mit Alkohol, Äther und Chloroform extrahiert und dann erst der tryptischen Verdauung unterwirft.

So scheint denn pflanzliches Plasma sich ganz allgemein in seiner Zusammensetzung von tierischen weitgehend zu unterscheiden, und zwar vor allem durch den Gehalt an lipoiden, durch Alkohol, Äther und Chloroform extrahierbaren Stoffen, welche solchem Plasma seine so charakteristische Widerstandsfähigkeit gegen das tryptische Ferment des Pankreas verleihen.

Andererseits ist aber pflanzliches Plasma, auch wenn es vorher extrahiert wurde, in Pepsin-HCl ebenso unverdaulich, wie es bisher nur von den Kernen bekannt war. Wenigstens lassen sich mikroskopisch erkennbare Veränderungen am ungeformten Plasma wie an Stroma der Chloroplasten nur in sehr beschränktem Maasse nachweisen. Durch Trypsin wird aber der gesamte, von Lipoiden befreite Zellinhalt plasmatischen Charakters schnell und vollkommen aufgelöst, und zwar auch innerhalb völlig unversehrter, geschlossener Zellen.