

Copyright ©

Es gilt deutsches Urheberrecht.

Die Schrift darf zum eigenen Gebrauch kostenfrei heruntergeladen, konsumiert, gespeichert oder ausgedruckt, aber nicht im Internet bereitgestellt oder an Außenstehende weitergegeben werden ohne die schriftliche Einwilligung des Urheberrechtlichsinhabers. Es ist nicht gestattet, Kopien oder gedruckte Fassungen der freien Onlineversion zu veräußern.

German copyright law applies.

The work or content may be downloaded, consumed, stored or printed for your own use but it may not be distributed via the internet or passed on to external parties without the formal permission of the copyright holders. It is prohibited to take money for copies or printed versions of the free online version.

Polarisationsoptische Untersuchungen an *Laminaria* und *Fucus*²⁾

Von C. Hoffmann und G. Andersen

A. Einleitung

Nachdem mit Hilfe der klassischen anatomisch-morphologischen Untersuchungsmethoden für die Laminariaceen und Fucaceen ein befriedigendes Bild des anatomischen Aufbaus dieser Algengruppen gewonnen war, wie es in allen Einzelheiten in den zusammenfassenden Werken von OLTMANN (1922), FRITSCH (1948) und PAPPENFUSS im Manual of Phycology von SMITH (1951) wiedergegeben ist, wandte sich in den letzten Jahren in zunehmendem Maße das Interesse biochemischen Fragen zu. Bereits STANFORD (1883), SCHMIEDEBERG (1885), WILLE (1897) und vor allem KYLIN (1913) schufen hier mit dem Nachweis und dem Studium von Alginsäure, Fucoidin, Laminarin, Mannit und Zellulose die ersten Grundlagen unserer Kenntnis von der besonderen stofflichen Zusammensetzung der Braunalgen. Zahlreiche Untersuchungen aus neuerer Zeit (vgl. BLACK 1953) haben diese Kenntnisse gesichert, wesentlich vertieft und erweitert. Dagegen ist vielfach noch unvollständig bekannt, wie sich die Verteilung dieser Stoffe im Gewebe oder in den Einzelzellen gestaltet. Für Laminarin und Mannit konnte das Vorkommen im Zellinhalt nachgewiesen werden. Zellulose ist wie bei allen Pflanzen Membranbestandteil (SPONSLER 1931). Schwieriger ist dagegen eine Entscheidung für das Fucoidin. KYLIN (1913) nimmt an, daß es in den Schleimgängen lokalisiert ist. Zu diesem Ergebnis kommt auch MIWA (1941). DEWAR (1951) dagegen beschreibt es als einen Membranbestandteil. Alginsäure bzw. Alginat hielt schon STANFORD (1883) für einen Hauptbestandteil der Zellmembranen der Braunalgen. KYLIN (1913), SCHMIDT und FOCKE (1926), NAYLOR und RUSSELLS (1934) u. a. schlossen sich dieser Meinung an. Moss (1948) entnimmt dagegen ihren Versuchen, daß Alginat in den Membranen der Zellen des Rindenteils kein Hauptbestandteil sei. Sie nimmt die Anwesenheit dieses Stoffes fast ausschließlich im Zentralkörper an und zwar als stark verquollene Interzellulärsubstanz.

Zum Nachweis der Lokalisation der einzelnen Stoffe, insbesondere der Zellwandbestandteile hat man in den letzten Jahren zu den verschiedensten Methoden gegriffen.

Nach einer modifizierten optischen Methode arbeiteten bereits BAAS-BECKING und GALLIKER (1931), indem sie UV-Licht anwandten und so die Erkenntnis von FREY-WYSSLING ausnutzten, daß allein Zellulose in diesem Licht transparent erscheint, während Hemizellulosen Schatten ergeben. Sie arbeiteten jedoch unter anderen Aspekten und mit Rhodophyceen. Röntgen-Untersuchungen an vielen Algen (SPONSLER, 1931 u. a.) ergaben fast immer typische Zellulose-Diagramme. Eine Lokalisation der Alginsäure oder ihre Unterscheidung von Zellulose ist röntgenometrisch nicht möglich, weil die Alginat in der in Algen vorkommenden Form keine Interferenzen geben.

Es finden sich aber Angaben über Differentialfärbungen. Die gebräuchliche Chlor-Zink-Jod-Methode zum Nachweis der Zellulose versagt bei Algen häufig. FREY-WYSSLING

¹⁾ In Zusammenarbeit mit dem Lehrfach für Kolloidchemie der Universität Kiel.

²⁾ Diese Arbeit umfaßt ein Teilgebiet aus der Dissertation ANDERSEN, Kiel 1954, in ungearbeiteter Form. Für Ratschläge und Hinweise bei der Bearbeitung von kolloidchemischen Fragen danken wir Herrn Prof. Dr. H. THIELE vom Lehrfach für Kolloidchemie der Universität Kiel.

Die Arbeit wurde z. T. mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie vom Fond zur Förderung der Chemie durchgeführt.

(1938) führt das auf den hohen Kristallisationsgrad der Zellulose zurück und empfiehlt vorheriges Anquellen in SCHWEITZERS Reagenz. Mit etwa 72%iger H_2SO_4 und Jod erzielt man jedoch leicht die bekannte Blaufärbung. Nach dieser Methode arbeiteten auch NAYLOR und RUSSELS (1934), die außerdem wie MOSS (1948) Ruthenium-Rot und Gentiana-Violett als Farbstoff für die Polyuronidsubstanzen anwandten. In mehreren Fällen ist jedoch die mangelnde Spezifität beider Farbstoffe für die selektive Anfärbung von Polyuroniden nachgewiesen worden. KERTESZ (1951) u. a. halten diese Stoffe deswegen für ungeeignet und allein auf Grund von Färbungen mit ihnen abgeleitete Ergebnisse für fragwürdig. NAYLOR und RUSSELS erhitzten ihre Schnitte vor der Färbung je eine Stunde mit 2%iger Soda-Lösung und 2%iger Schwefelsäure. Sie wiesen dann nach, daß sich die Zellulose nicht homogen anfärben läßt. In Querschnitten durch Zellmembranen findet man sie daher meistens in Form von „striating structures“. In einem Falle zählten sie bis zu 215 einzelne blaue Schichten. In den Membranen aller Gewebsteile in mehr oder weniger großen Mengen vorkommend, zeigt die Zellulose dieses Phänomen bei der Schwefelsäure-Jod-Färbung fast immer. STRUGGER (1940), FREY-WYSSLING (1936) und SCHAEDE (1940) führen das auf strukturelle Heterogenität der Zellulose zurück, während MOSS (1948) die Anwesenheit einer dritten, nicht anfärbaren Substanz als Erklärung annimmt.

MOSS befaßte sich rein färberisch mit der Frage nach der Lokalisation der Alginsäure im Gewebe. Sie färbte pulverisierte angequollene Gewebsteile von *Fucus* vor und nach der heute allgemein üblichen Standard-Alginat-Extraktion von CAMERON et al. (1948). Sie stellte dabei keine großen, färberisch nachweisbaren Unterschiede bei dem Rindenteil (Meristoderm und Cortex) fest. Lediglich bei den Zellelementen des Zentralkörpers (Medulla) bemerkte sie nach der Extraktion eine Verminderung der Membransubstanz und die reine Zellulose-Reaktion der zurückgebliebenen inneren Membranteile. Mit STANFORD (1883) fand sie eine durch Verquellen vor sich gehende Auflösung der Interzellulärsubstanz des Zentralkörpers und wies in Übereinstimmung mit NAYLOR und RUSSELS eine Konzentrierung der Zellulose in der den Protoplasten direkt umgebenden sekundären Membran nach.

Auch über polarisationsoptische Untersuchungen an Meeresalgen liegen bereits eine Reihe von Arbeiten vor (NICOLAI und FREY-WYSSLING, 1938, NICOLAI und PRESTON 1952 u. a.). Merkwürdigerweise sind aber bisher unseres Wissens keine Braunalgen untersucht worden.

Nachdem nun von ANDERSEN (1954) und THIELE und ANDERSEN (1955 a, b) durch polarisationsoptische Untersuchungen an ionotropen Alginatgelen kürzlich nachgewiesen werden konnte, daß die Polyuronsäuren (Alginsäure und Pektinsäure) unter gewissen Bedingungen doppelbrechende Gele bilden, lag daher die Vermutung nahe, daß die Alginsäure, die ja aus bestimmten Arten der Gattungen *Laminaria* und *Fucus* gewonnen wird, auch als natives Eukolloid im Gewebe, also im Zellverband anisotrop vorliegen würde. Eine Untersuchung dieser Frage schien um so aussichtsreicher, als die genannten Autoren zeigen konnten, daß sich unter Bedingungen, bei denen die Doppelbrechung der Zellulose nicht verändert wird, die Anisotropie des Alginates durch eine ionotrope Umrichtung bzw. anisotrope Schrumpfung variieren läßt. Damit ist die Möglichkeit gegeben, im mikroskopischen Schnitt das Vorkommen der Alginsäure neben der Zellulose im Polarisationsmikroskop und ihre Verteilung zu untersuchen.

B. Material und Methodik

Die Untersuchung wurde in erster Linie an *Laminaria digitata* und *saccharina*, sowie *Fucus vesiculosus* und *serratus* aus der Kieler Förde durchgeführt. Zur Kontrolle und zum Vergleich wurden aber auch Pflanzen der englischen Küste herangezogen, wobei auch

Fucus spiralis, *Pelvetia canaliculata* und *Ascophyllum nodosum* geprüft wurden. Die verwendeten Laminarienstifte waren zum Teil Handelsware unbekannter Herkunft, zum Teil stammen sie von den Orkneys.

Hinsichtlich der polarisationsoptischen Untersuchungstechnik sei auf AMBRONN und FREY (1926), FREY-WYSSLING (1938 und 1948) und W. J. SCHMIDT (1924) verwiesen. Grundsätzlich sei nur folgendes angeführt. Man bezeichnet einen Körper als doppelbrechend, wenn er für Licht verschiedener Schwingungsebenen unterschiedlich starke Brechungsindices für verschiedene Richtungen hat. In erster Näherung ist bei Stoffen kolloider Größenordnung eine auftretende Doppelbrechung die Funktion der Asymmetrie ihrer Molekül- oder Mizellgestalt, also ihres Längen-Breiten-Verhältnisses. Das einzelne Makromolekül (Fadenmolekül) hat also bereits ein Inkrement optischer Anisotropie. Eine sichtbare Doppelbrechung — die Aufhellung der an sich schwarzen Fläche zwischen gekreuzten Nicolprismen — kommt aber erst dann zustande, wenn die Fadenmoleküle nicht mehr statistisch wahllos verteilt sind wie im Sol, sondern wenn sie sich durch Parallelisierung orientieren. Die Doppelbrechung ist also die Folge einer optischen Summation der Anisotropie-Inkremente der Einzelteilchen. Auftretende Doppelbrechung ist also fast in allen Fällen ein sicheres Zeichen dafür, daß Linearkolloide in geordneter Weise vorliegen, wie die z.B. bei der Zellulose mit ihren besonders stark doppelbrechenden Kristalliten fast immer der Fall ist.

C. Polarisationsoptische Befunde zur Anatomie

Wenn wir im Folgenden eine Schilderung der polarisationsoptischen Befunde an den von den verschiedenen Arten hergestellten Schnitten geben, so wird die Darstellung dadurch außerordentlich vereinfacht, daß, wie schon OLTMANN (1922) und FRITSCHE (1945) betonen, alle Vertreter der Fucaceen und Laminariaceen hinsichtlich ihres histologischen Aufbaus weitgehende Übereinstimmung zeigen. Auf eine Beschreibung im Einzelnen können wir unter Hinweis auf die bekannten Lehrbücher (vgl. OLTMANN, Bd. II, 1922, Abb. 417, 421, und 453 und FRITSCHE, Bd. II, 1945, Fig. 83 und 130), verzichten, da rein histologisch durch unsere Untersuchungen Neues nicht hinzugefügt werden kann. Die Schilderung unserer Befunde wird sich vorzüglich auf *Laminaria* beziehen. Für die Fucaceen gilt prinzipiell Gleiches. Es werden daher nur dort, wo Abweichungen auftreten, andere Arten besonders erwähnt werden.

1. Zustand und Verteilung der Alginsäure im Thallus

Vor der Herstellung von Schnitten wurden kleine Stücke der Algen meist kurz aufgekocht, um die anhaftenden Schleimstoffe zu entfernen und die Tendenz der Schnitte, sich infolge der Gewebespannung aufzurollen, herabzusetzen. Ein Vergleich mit Schnitten, die nicht vorher gekocht wurden, ergab, daß die Behandlung ohne Einfluß auf die beobachteten polarisationsoptischen Erscheinungen war. Im polarisierten Licht ergibt schon der im Wasser liegende neutrale Schnitt von *Laminaria digitata* und *Fucus vesiculosus* sehr eindrucksvolle Bilder. Bei dünnen Schnitten werden die Farben der ersten Ordnung nicht überschritten. Der größte Anteil der in den Schnitten auftretenden Doppelbrechung fällt auf die Zellulose auf Grund der ihr eigenen starken Anisotropie. Bei Zugabe von 0.2 n Mineralsäure nimmt nicht nur die Schärfe der Konturen der einzelnen Gewebe Rinde — Zentralkörper, deren Übergänge, wie schon OLTMANN betont, stets fließend sind, zu, sondern auch die doppelbrechende Fläche und vor allem der Gangunterschied des Präparates in seiner Gesamtheit. Für die Doppelbrechung der einzelnen Gewebesteile kann man bei schwacher Vergrößerung durch Messung mit dem Kompensator Durchschnittswerte für den Gangunterschied ermitteln. Für eine Trennung der optischen Effekte von Zellulose und Alginat ist nun nicht so sehr die absolute Höhe

des Gangunterschiedes als vielmehr seine relative Zunahme nach Säurezugabe von Wichtigkeit. Diese Zunahme des Gangunterschiedes wurde durch Reihenversuche

für den Zentralkörper zu 80 — 90%
und für das Mark zu 120 — 150%

der Doppelbrechung, die ohne Säurezugabe gemessen wurde, ermittelt.

THIELE und ANDERSEN (1955) konnten nun auf Grund von Versuchen an Alginaten zeigen, daß bei Säurezugabe

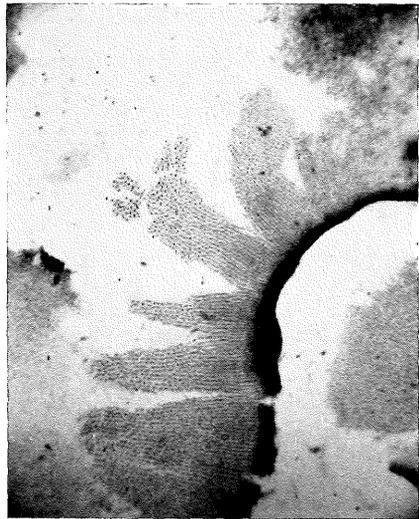
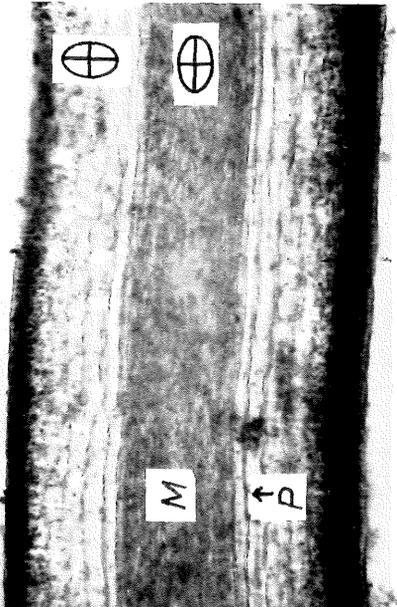
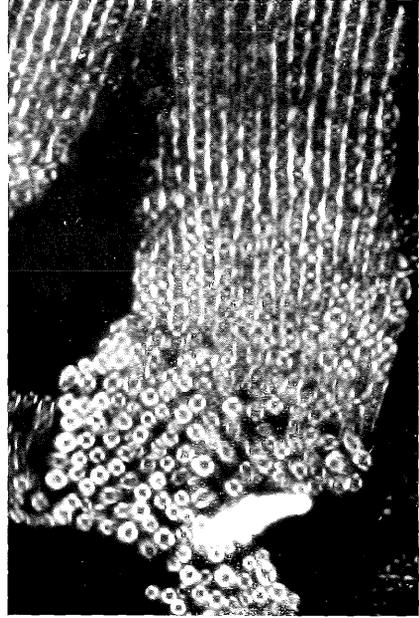
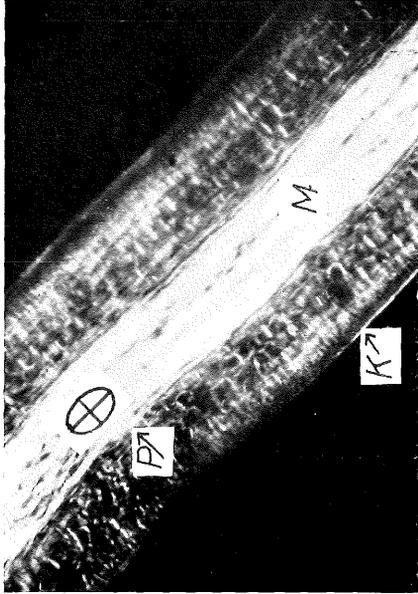
1. keine Zunahme der Doppelbrechung erfolgt, wenn ein Alginsäure-Gel vorliegt,
2. eine Zunahme der Doppelbrechung erfolgt, wenn ein Alginat-Gel zweiwertiger Kationen vorliegt,
3. eine Kontraktion ohne Zunahme der Doppelbrechung erfolgt, wenn Alginat einwertiger Kationen vorliegen.

Wir können daher aus dem optischen Verhalten unserer Schnitte im polarisierten Licht schließen, daß die Alginsäure im Gewebe der untersuchten Braunalgen überwiegend in Form von Salzen zweiwertiger Metalle vorliegen muß. Die Höhe der Werte für die Zunahme des Gangunterschiedes sprechen für das Vorhandensein unvollständig abgesättigter Erdalkali-Alginat. Wenn WASSERMANN (1948) durch schwierige und umständliche Ionenaustauschversuche feststellte, daß die Alginsäure der Braunalgen nicht wie HAAS und BURA (1931) annahm, als freie Säure vorliegt, auch nicht, wie nach Meinung der meisten Autoren, als Ca-Salz allein, sondern ebenso als Mg-, K- und Na-Salz, so können wir das durch polarisationsoptische Untersuchung bestätigen. Darüber hinaus können wir weiter annehmen, daß quantitativ die zweiwertigen Kationen überwiegen.

Der gemessene Gangunterschied von neutralen Schnitten ist gewöhnlich für das Mark kleiner als für den übrigen Zentralkörper. Der Wert schwankt je nach Thallusteil und Organismus und ist abhängig von der Schichtdicke des Präparates. Unabhängig davon und verhältnismäßig gleichmäßig ist jedoch die Zunahme der Doppelbrechung nach Säurezugabe. Diese Zunahme ist, wie wir oben sahen, im Mark viel stärker als in den übrigen Gewebeteilen. Wir können sie allein der Anwesenheit von Polyuroniden, also dem Alginat, zuschreiben, denn nach THIELE und ANDERSEN (1955c) wirkt sich bei Zellulose die starke Doppelbrechung nur auf die absolute Stärke, nicht aber auf die Schwankungen des Gangunterschiedes aus, wenn das pH geändert wird. Wir können daher auf Grund der Differenzen der Gangunterschiede von Mark und Zentralkörper vor und nach der Säurezugabe weiterhin ableiten, daß das Verhältnis Alginat zu Zellulose im Mark gegenüber der Rinde stark zu Gunsten des Alginats überwiegt. Diesen Schluß werden wir weiter unten noch durch andere Versuche stützen. Die Zunahme scheint etwa im gleichen Verhältnis vor sich zu gehen, wie der kontinuierliche Umbau von dünnwandigen Epidermiszellen über dickwandige Zentralkörperzellen zu den verquollenen Markzellen erfolgt.

Legende zu den nebenstehenden Abbildungen (Taf. 5)

- Abb. 1: *Laminaria digitata*. Längsschnitt durch die Lamina im polarisierten Licht unter 45 Grad. Vergrößerung: 36×.
- Abb. 2: wie Abb. 1, jedoch mit Gips Rot I unter 90 Grad. Die Indexellipsen symbolisieren die Richtung bzw. das Vorzeichen der Doppelbrechung. Erklärung der Zeichen im Text.
- Abb. 3: Schwache Verquellung eines Querschnittes durch den Stiel einer *Laminaria* nach saurer Vorbehandlung. Polarisiertes Licht mit Gips Rot I. Vergrößerung: 50×.
- Abb. 4: Ausschnitt aus Abb. 3. Quellungszone. Polarisiertes Licht. Vergrößerung: 250×.



Tafel 5

2. Beschreibung und Deutung der Anisotropie-Phänomene in den mikroskopischen Schnitten.

a) Lamina und Thallus

In den Abbildungen 1 und 2 (Tafel 5) sind Mikrophotographien von Längsschnitten durch *Laminaria digitata* im polarisierten Licht wiedergegeben. Man sieht, daß der Thallus nach außen von einer zur Längsrichtung des Thallus positiv doppelbrechenden Cuticula begrenzt wird (K in Abb. 1). Sie löscht nicht gleichmäßig aus. Wahrscheinlich handelt es sich um wachsähnliche Stoffe (W. J. SCHMIDT 1937). Die unmittelbar angrenzenden zwei oder drei Zellschichten des sogenannten Meristoderms sind in den Längsachsen der sehr kleinen Zellen senkrecht zur Oberfläche des Thallus orientiert und erscheinen so, da jede Membran von der Seite gesehen positiv zur Länge der Zelle doppelbrechend ist, als Gewebeteil negativ zur Längsachse des Thallus doppelbrechend.

Die nach innen zu folgenden Zellen sind auf Grund des Teilungsmechanismus des außenliegenden Meristoderms anfänglich in Reihen angeordnet. Die Einzelzellen strecken sich aber nach innen mehr und mehr in der Längsrichtung des Thallus, wodurch die Reihenanzordnung mehr oder weniger gestört wird, während ihre Wandung in zunehmendem Maße eine Verdickung erfährt. Das Vorzeichen der Doppelbrechung dieses Gewebeteils ist ebenfalls negativ, wiederum bezogen auf die Längsrichtung des Thallus. Wir nehmen daher an, daß diese Zellen eine Röhrenstruktur besitzen und daher in der Aufsicht negativ zur Längsachse doppelbrechend sind. Außerdem strecken und verdicken sich die Membranen erst allmählich. Daher überwiegen die im optischen Schnitt als Fibrillen erscheinende Längsmembranen erst unmittelbar am Markteil des Präparates, in dem das Zellumen und damit der in der Aufsicht negativ zur Länge doppelbrechende Anteil der Membranen immer mehr eingeengt wird. Dieser Gewebeteil wird von Strängen verdickter Zellmembranen in der Längsrichtung durchzogen. Sie sind positiv zur Thalluslängsachse doppelbrechend, und werden zum Mark hin häufiger (P). Die Doppelbrechung des Marks (M) ist rein positiv zur Längsachse. Die sehr heterogenen Markzelelemente bestehen überwiegend aus langen, dünnen hyphenartig verflochtenen Zellen, die stark verdickte Längs- und unverdickte Querwände und keine oder nur schwache Röhrenstruktur aufweisen. Zwar wird ihnen, besonders bei *Fucus*, eine bevorzugte Richtung parallel zur Längsrichtung des Thallus zugeschrieben (OLTMANN 1923), doch ist das Vorzeichen der Doppelbrechung auch bei Querschnitten durch das gleiche Objekt positiv, bezogen auf die Querrichtung des Thallus, nur ist der Gangunterschied nicht ganz so groß. Wir erklären dieses unerwartete Phänomen so, daß in jeder Schnittrichtung Zellen in der Längsrichtung getroffen werden, was auch aus den für Laminarien wiedergegebenen Abbildungen bei OLTMANN klar hervorgeht (OLTMANN 1922, Bd. II, Abb. 417). Diese erzeugen den positiven Charakter der Doppelbrechung, während die jeweils quergetroffenen als Sphärite erscheinen und so das Vorzeichen der Doppelbrechung nicht beeinflussen. Die Sphäriten-Doppelbrechung ist, wie bei ionotropen Alginat-Sphäritenscheiben im Modell negativ, bezogen auf den Radius (vgl. THIELE und ANDERSEN 1955a).

b) Stiele

Betrachtet man im Polarisationsmikroskop den Querschnitt eines Laminariastieles, so zeigen die schon im Lichtmikroskop sichtbaren „Jahresringe“ interessante Phänomene. Der Teilungsmechanismus des meristematischen Randgewebes ergibt eine Anordnung der Zellen in Form radiär verlaufender Reihen. Die Kontinuität der radiären Zellwände, deren Doppelbrechung das Vorzeichen positiv zu ihrer Länge und damit zum Radius der Stiele hat, gibt durch Summationseffekte dem Querschnitt durch den Stiel den

Charakter einer Sphäritenscheibe. Diese hat das Vorzeichen positiv mit dem Radius als Bezugsachse (vgl. FREY-WYSSLING 1938 Abb. 71). Durch das sekundäre Dickenwachstum bilden sich rhythmisch konzentrische Zonen von Zellen mit stark verdickten Membranen aus. Entlang dem Radius wechselt also der Grad der Verdickung und damit die Fläche der doppelbrechenden Substanz. Bei Betrachtung mit Gips Rot I sieht man daher charakteristische Farbnuancierungen im Rhythmus der „Jahresringe“. Die radiärstrahlige Anordnung der Zellen verliert sich im Mark, so daß die optische Anisotropie im Zentrum ohne bevorzugte Richtung, also statistische Doppelbrechung ist.

In dem Maße wie sich der Stiel zur Lamina hin abplattet, verändert das Mark seinen optischen Charakter. Am unteren Ende in unmittelbarer Nähe des markfreien Haftorgans ist es rund und ohne bevorzugte Schwingungsrichtung für das polarisierte Licht. Es wird dann bis zu der interkalaren Wachstumszone am Fuße der Lamina allmählich spindelförmig und damit immer stärker positiv zu Länge doppelbrechend.

Der Querschnitt durch das Haftorgan verändert auf Säurezugabe weder qualitativ noch quantitativ seinen Charakter als positiver Sphärit. Dieser Teil der Alge scheint alginatfrei zu sein.

Im Längsschnitt des Stieles wechselt das Vorzeichen der doppelbrechenden Zonen von positiv zu negativ, bezogen auf die Achse des Stieles. Hierfür sind wiederum die im Rhythmus der „Jahresringe“ erfolgenden Veränderungen des Verdickungsgrades der Zellwände, bzw. bei abgestorbenen Teilen der Anteil der Zellwände im Verhältnis zum Lumen verantwortlich. Die Gewebzonen mit negativen Vorzeichen der Doppelbrechung bestehen aus Zellen, die Röhrenstruktur haben. Solche Zellen zeigen in der Aufsicht Doppelbrechung von negativem Vorzeichen, bezogen auf die Zell-Längsachse. Die Verdickung der Membranen erfolgt auf Kosten des Zellumens. Im optischen Längsschnitt durch eine Zelle von stark verdickten Membranen überwiegt daher der Anteil der Membran mit positiver Doppelbrechung (vgl. FREY-WYSSLING 1938, Abb. 70). Das Mark des Stieles ist rein positiv zur Längsachse doppelbrechend.

D. Nachweis der Alginsäure in den Membranen

Der Nachweis der Alginsäure in den Algenmembranen ist meist durch spezifische Anfärbung versucht worden. Hierbei untersuchte B. Moss (1948) normale isolierte Zellen oder Gewebestückchen und solche, bei denen die Alginsäure herausgelöst war. Der Extraktionsvorgang selbst ist aber weder von Moss untersucht noch unseres Wissens jemals im Licht- oder Polarisations-Mikroskop beobachtet und beschrieben worden. WASSERMANN (1948 a, b), der über die Herauslösung der Alginat unter den verschiedensten Bedingungen berichtet hat, verwendet bei seinen Untersuchungen ganze Algen und konnte daher nur das chemische Verhalten der gesamten Alginat erfassen.

1. Extraktionsvorgang

Die Herauslösung der Alginsäure erfolgt auch technisch noch immer nach STANFORD (1883) mit Natrium-Karbonat nach einer Überführung der Alginat in Alginsäure durch Mineralsäuren. Wäscht man nun einen mit Säure (etwa 0,2 n) 15 Minuten vorbehandelten Schnitt gut mit Wasser aus und saugt unter dem Deckglas des Objektträgers etwa 1 mol. Soda-Lösung hindurch, so erfolgt ein sofortiges, fast ruckartiges Verquellen des Schnittes. Die Alginsäure wird in das stark quellbare Na-Salz umgewandelt, das unter Wasseraufnahme eine starke Volumenzunahme erfährt. Es werden dabei Brücken zwischen den Alginsäureteilchen zerstört. Dadurch desorientieren sich die Kettenmoleküle und die Doppelbrechung der Alginsäure geht verloren. Nach kurzer Zeit haben z.B. bei Schnitten durch die Lamina von *Laminaria* nur noch die zwei oder drei äußeren Zellschichten des Meristoderms ihren Zusammenhalt bewahrt.

Die anderen Zellen haben sich aus dem Gewebeverband gelöst, sind kleiner geworden und liegen isoliert. Bei der verwendeten Alkalikonzentration verläuft der Vorgang so schnell, daß genaue Beobachtungen der einzelnen Phasen der Auflösung nicht möglich sind. Das gelingt aber bei folgendem Verfahren. Man wäscht einen sauer vorbehandelten Schnitt etwa zwei Tage lang mit 0,1%iger Lösung von Na-Citrat nach, indem man diese öfter unter dem Deckglas hindurchsaugt. Dadurch erzielt man eine sehr schwache Anquellung, die für längere Zeit konstant bleibt, wenn kein weiteres Citrat mehr zugesetzt wird.

In Abb. 3 (Tafel 5) ist eine Mikrophotographie eines so behandelten Schnittes durch den Stiel einer *Laminaria* wiedergegeben. Man sieht, daß der Schnitt bei der Quellung die Rindenschicht nach außen aufröllt. Wir fanden diese Erscheinung außer bei *Laminaria* auch bei *Fucus* und *Ascophyllum*.

Da größere Unterschiede im pH-Wert der Flüssigkeit unter dem Deckglas unter den gegebenen Versuchsbedingungen kaum vorliegen dürften, können wir annehmen, daß das Gewebe zum Mark hin stärker verquillt als die Rindenschichten. Das bei der Quellung sich stark ausdehnende Na-Alginat wird daher den biegsamen Schnitt nach außen umwenden. Dafür spricht auch, daß sich an den hyalin oder leer erscheinenden Stellen des Schnittes färberisch dichte Alginat-Schleier nachweisen lassen. Ob außerdem die von FÖRSTER (1950) beschriebene Gewebespannung eine Rolle spielt, konnte bisher nicht entschieden werden.

Betrachtet man die Quellzone des gleichen Schnittes bei stärkerer Vergrößerung (Abb. 4, Tafel 5), so erkennt man, daß dort, wo die Quellung weit fortgeschritten ist, die Zellen bereits aus dem Gewebeverband herausgelöst sind, während nach der Rinde zu (rechte Seite der Abb. 4) noch deutlich die ungestörte Reihenanzordnung der Zellen erkennbar ist. Die herausgelösten Zellen zeigen im polarisierten Licht deutlich Sphäritencharakter, der bei den in Reihen liegenden Zellen nicht sichtbar ist. Hier ist noch von der Rinde her die Kontinuität der Zellreihen durch den noch nicht verquollenen Alginatanteil der (primären) Membranen erhalten und dadurch der Sphäritencharakter der sekundären Zelluloseanteile der Membranen maskiert, so daß die Membranen hier als doppelbrechende Fibrillen erscheinen.

Vergrößert man die Quellungszone noch stärker, so erkennt man, daß die Zellmembranen mehrschichtig sind. An den koagulierten Zellinhalt grenzt ein klar erkennbarer Teil der Membran, den wir als Sekundärmembran¹⁾ bezeichnen. An diese schließt die verquellende Primärmembran an. Dort, wo im Schnitt die Quellung gerade beginnt, kann man beim Heben und Senken des Tubus eine zusammenhängende unpaare Mittellamelle erkennen, wie es in der Zeichnung der Abb. 5 (Tafel 6), die den Eindruck mehrerer Bildebenen vereint, wiedergegeben ist.

Daß es sich bei den sekundären Membranen der herausgelösten Zellen um Zellulose handelt, werden wir später noch durch Färbungsversuche zeigen. Weitere Beweise dafür ergeben sich aber auch daraus, daß 1. die losgelösten Zellen nicht in schwachen Alkalien quellen; 2. die Doppelbrechung ihrer Membranschicht stärker als die der primären Membranen ist. Sie ist außerdem nicht, wie diese durch Säuren und Alkalien beeinflussbar. Und 3. ist die Lichtbrechung dieser sekundären Wandschicht während aller Quellungsstadien des Schnittes, also auch dort, wo die Zellen noch im Verband liegen, stärker als die ihrer Umgebung²⁾.

¹⁾ Wir folgen in der Nomenklatur des Zellwandsystems FREY-WYSSLING (1938). Dadurch ist der scheinbare Gegensatz zu Moss, die unsere Primärmembran als „Mittellamelle“ bezeichnet, zu erklären.

²⁾ Die BECKE'sche Linie wandert beim Anheben des Tubus stets nach innen, also in die sekundäre Membran hinein. Der Brechungsindex der Zellulose ist mit 1,596 (Na-Licht) sehr hoch und sinkt auch bei Quellung mit 25% nicht wesentlich (FREY-WYSSLING 1936 und W. J. SCHMIDT 1937).

Schnitte durch Haftorgane, die wir auf Grund ihres polarisationsoptischen Verhaltens als alginsäurefrei oder mindestens sehr arm an Alginsäure ansahen, zeigen auch gegenüber Alkali keine Veränderung. Sie verhalten sich dabei genau wie Schnitte aus Holundermark oder anderen Geweben, die nur Zellulosemembranen aufweisen. Ob kleinere Mengen von Zellulose in den primären Membranen enthalten sind (FREY-WYSSLING, 1936) konnte nicht sicher entschieden werden. Abb. 6, (Tafel 6) zeigt Spuren einer Blaufärbung auch innerhalb der primären Membranschichten der Stielzellen.

2. Färbungen

Schließlich versuchten wir, unsere durch Beobachtung des Quellvorganges gewonnenen Vorstellungen über die Lokalisation der Alginsäure in den primären Membranen auch durch färberische Methoden zu sichern. Wir gingen dabei von Modellversuchen aus, über die THIELE und ANDERSEN (1955 b, c) berichteten.

1. In Rutheniumrotlösung färben sich die angequollenen Fasern von Alginsäure kirschrot, solche von Ca-Alginat rosa. Je nach dem pH-Wert und dem Ca-Gehalt wechseln Farbschattierungen und Farbtiefe. Die gleiche Färbung wird aber auch bei Verwendung von Carragenin und Fucoidin erzielt, so daß die von KERTEZ (1951) hervorgehobene Unspezifität dieser Färbung bestätigt werden kann. Ganz ähnlich verhält sich Gentianaviolett, das auch B. MOSS (1948) verwandte. Für Rutheniumrot findet ANDERSEN (1954), daß alkoholische Lösungen sich besser bewähren als die gewöhnlich angewandten wässerigen, schwach ammoniakalischen Lösungen, da Alginat in diesen quillt und sich rote Farbschleier um das Präparat bilden.

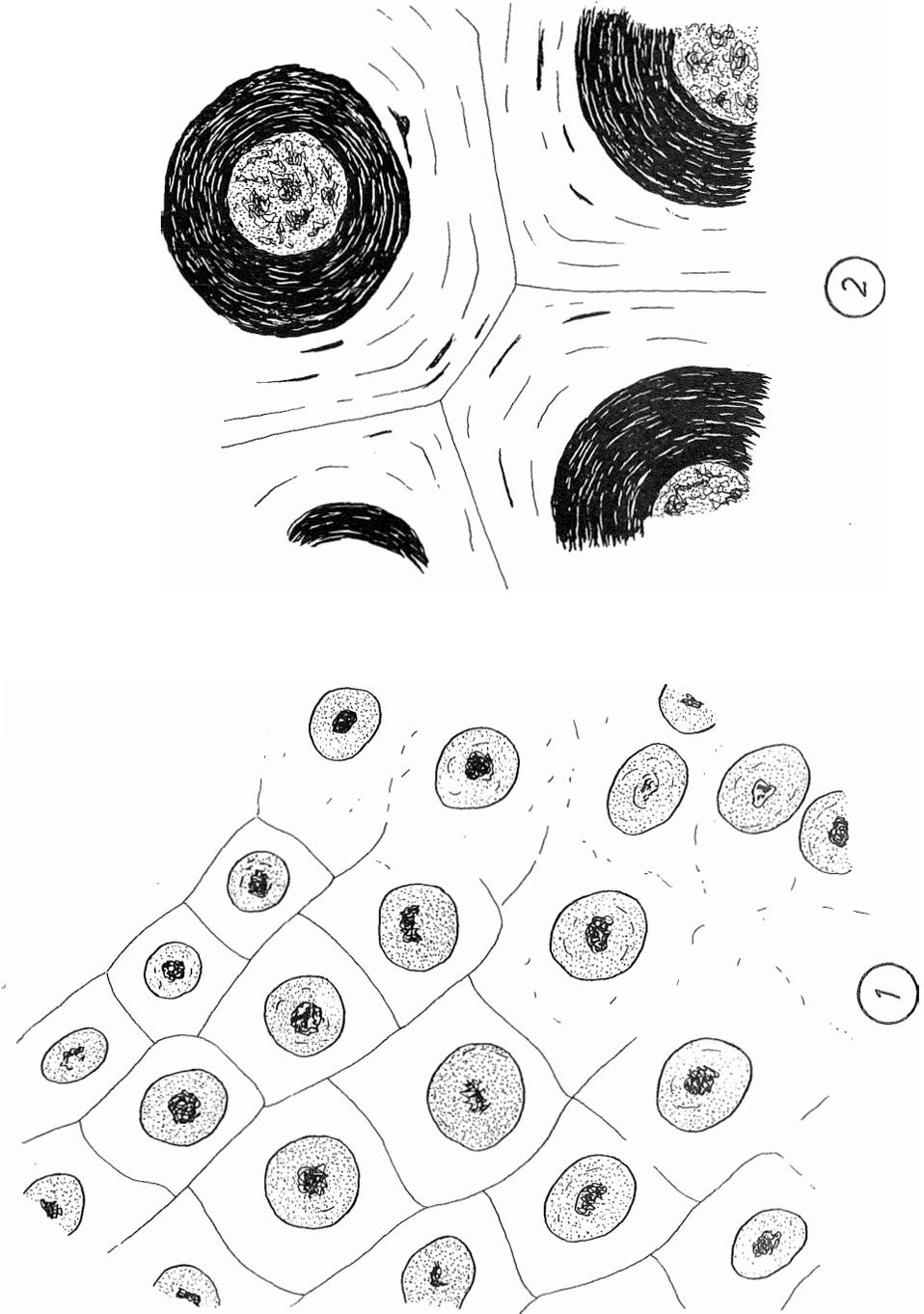
2. Mit Jod (KJ_3) bildet Alginsäure und Ca-Alginat eine Adsorptivfärbung, die nach Auswaschen mit Wasser wieder verschwindet. In Gegenwart von n-Schwefelsäure tritt jedoch bei Jodfärbung eine gelbbraune Färbung auf, die sich bei Anwendung von 72%iger Schwefelsäure vertieft. Die beiden letztgenannten Färbungen geben den Fasern einen Dichroismus von rotbraun bis farblos (vgl. ZIEGENSPECK, 1940). In der starken Schwefelsäure wird die Alginsäure bereits nach etwa einer halben Stunde fast vollständig bis auf einen schwärzlich granulierten Rückstand abgebaut. Alginschnitte müssen daher bei dieser Färbung rasch untersucht werden, eventuell unter Kühlung. Die Angabe KYLIN's (1913), daß Alginsäure mit Jod färbbar sei, ist also nur dann richtig, wenn Säure anwesend ist.

Nach den eben geschilderten Verfahren gelingt es nach einiger Übung, an Alginschnitten Differentialfärbungen zu erzielen. Die Zellulose wird dabei tiefblau, die Alginsäure gelblich-braun gefärbt. Bei Verminderung der Säurekonzentration wird der ganze Schnitt braun und Jod fällt aus.

Beobachtet man einen so gefärbten Schnitt im polarisierten Licht oder besser noch nach ZIEGENSPECK (1938) im halbpolarisierten Licht, so zeigt sich, daß alles blaugefärbte Gewebe doppelbrechend ist, aber nicht alles doppelbrechende Gewebe blau gefärbt ist. Die Doppelbrechung verändert sich bei der Färbung quantitativ mit der Wellenlänge des Lichtes. Die an den koagulierten Zellinhalt direkt anliegenden, bei der Quellung erhalten bleibenden Membranteile färben sich, überwiegend liniert, blau, während die verquellenden Primärschichten gelblich-braun bleiben. Unsere oben auf Grund der Herauslösungsvorgänge gewonnenen Vorstellungen finden also durch die Differenzialfärbung eine volle Bestätigung.

Legende zu den nebenstehenden Abbildungen (Taf. 6)

Abb. 5: Skizze der Auflösungszone des Schnittes von Abb. 3 und 4 bei starker Vergrößerung ca 500 \times .
Abb. 6: Querschnitt durch den Stiel von *Laminaria*. Starke Blaufärbung nach Jod-Schwefelsäure-Behandlung (Zellulosereaktion) in den sekundären Membranschichten. Vereinzelte blaue Streifen auch innerhalb der Primärschichten.



Tafel 6

Mit der von uns angewandten Jod-Schwefelsäure-Methode arbeiteten auch NAYLOR und RUSSELLS (1934) und B. MOSS (1948), doch konnten diese Autoren ihre Befunde nur hinsichtlich der Zellulose auswerten. Ihre Ergebnisse hinsichtlich der Verteilung dieses Membranbausteins bei *Fucus* und *Laminaria* finden auch in unseren Befunden eine Bestätigung. Die Zellulosereaktion ist bei den Zellen des Meristoderms und der äußeren Rinde am stärksten, bei den Hyphen des Markes am schwächsten. Die Zellulose scheint also in dem Maße abzunehmen, wie das Alginat zum Mark hin zunimmt. Nach erfolgter Alginatextraktion mit Jod-Schwefelsäure behandelte Gewebeteile lassen sich wie bei MOSS nicht völlig homogen anfärben. Wir machen aber dafür nicht wie diese Autorin eine weitere, nicht anfärbare unbekannt Substanz verantwortlich, sondern die Heterogenität der Zellulose (FREY-WYSSLING, 1936; SCHAEDE, 1940; STRUGGER, 1940). Die Frage, ob es sich dabei um Unterschiede des Kristallisationsgrades, der Dichte oder anderer submikroskopischer Verschiedenheiten handelt, muß offenbleiben. Bei starker Vergrößerung erweist sich auch polarisationsoptisch die Zellulose als nicht homogen.

Färbungen extrahierter Gewebeteile mit Gentiana-Violett zeigten ebenfalls wie bei MOSS eine rot-blaue schmale Randzone um die einzelne Zelle. MOSS, die den Lösungsvorgang selbst nicht beobachtet hat, schloß daraus, daß an den Zellen des Markes keine Veränderungen während der Extraktion vor sich gegangen sind. Wir denken in diesem Zusammenhang eher an das Vorhandensein von Oxyzellulosen in den äußeren Zonen der sekundären Membranen. Auch könnten sich in den Intermicellarräumen der Zellulose noch Alginatreste befinden, die der Extraktion entgangen sind und die rot-blauen Randzonen der Färbung bedingen.

Bei *Fucus* ließen sich die entwicklungsgeschichtlich von der zellulosereichen Epidermis abzuleitenden Zellen, die die Konzeptakel auskleiden, intensiv und vollständig blau färben. Sie quellen nicht bei einer Alkalizugabe und erweisen so ihren hohen Zellulosegehalt, obwohl sie ringsum von alginatreichen Geweben umgeben sind. Die Paraphysen zeigten unterschiedliches Verhalten. Die Hyphenzellen im Mark sind erst von der 5. Zelle an vom Thallusscheitel aus gerechnet blau färbbar. Man könnte daraus schließen, daß die jungen Hyphenzellen zellulosearm sind. Beobachtungen über die Quellung einzelner Zellelemente des Markes sind aber nur schwer durchführbar.

E. Schlußbetrachtung

Wir konnten in den vorstehenden Abschnitten zeigen, daß es möglich war, mit Hilfe polarisationsoptischer Untersuchungen und von Farbreaktionen auf Grund der von THIELE und ANDERSEN (1955 a-c) durchgeführten Modellversuche an Alginsäurepräparaten genaue Angaben über die Verteilung und den Bindungszustand der Alginsäure in den Fucaceen und Laminariaceen zu geben. Es ließ sich weiterhin zeigen, daß in Analogie zu den pektischen Substanzen der höheren Pflanzen, die Alginsäure in den Primärmembranen enthalten ist. Diese werden nach FREY-WYSSLING „gewöhnlich mit zur sogenannten „zusammengesetzten“ Mittellamelle gerechnet, die eigentlich aus drei Blättern besteht: der ursprünglichen, bei der Zellteilung aus der Zellplatte hervorgegangenen unpaaren Mittellamelle und den beiden an diese angelagerten Primärhäuten“ (FREY-WYSSLING, 1938, pg. 213). Im Gegensatz zu den höheren Pflanzen gewinnen allerdings diese Primärmembranen bei den Braunalgen insbesondere bei den untersuchten Gruppen schon sehr frühzeitig während der Entwicklung besondere Bedeutung, da sie schon bei jungen Keimlingen im Zentralkörper durch Verquellen zu den „Schleimsubstanzen“ werden, die zum anfänglichen Dickenwachstum der Keimlinge wesentlich beitragen. Auf allen Abbildungen, die Schnitte durch den Zentralkörper der Laminariaceen und Fucaceen wiedergeben, fallen diese oft ansehnlichen Schleimmassen, die vielfach von Zellbrücken und Hyphen durchsetzt sind, auf (vgl. OLTMANNs. Bd. II 1922). Diese verquollenen Schleimsubstanzen sind es auch, die die

Frage nach der Lokalisation des Fucoidins so schwierig gestalten. Eine Möglichkeit, Fucoidin direkt polarisationsoptisch nachzuweisen, besteht leider nicht (ANDERSEN, 1954). Aus dem Verhalten des Markes bei Säurezugabe kann aber geschlossen werden, daß die gequollene Substanz überwiegend aus Alginaten von Ca, Mg und einwertigen Kationen besteht. Einer Lösung der Frage wäre vielleicht dadurch näherzukommen, daß man an jungen Keimlingen untersuchte, ob allein die verquollene Mittellamelle die Zellen im Zentralkörper der Keimlinge voneinander trennt, wie das bei der Annahme eines kontinuierlichen Verquellens der primären Membranen zumindestens für frühe Keimlingsstadien zu erwarten wäre. Schon KYLIN (1913) nimmt an, daß das Fucoidin nur in den Schleimgängen lokalisiert ist, und MRWA (1940) hält auch deren Inhaltstoffe für besonders fucoidinreich. Bei Keimlingen fehlen aber solche Gänge fast ganz und auch bei erwachsenen *Laminarien* finden sie sich vorzugsweise in der äußeren Rinde. Wir halten es daher für unwahrscheinlich, daß bei den im Mark auftretenden Schleimstoffen Fucoidin eine wesentliche Rolle spielt. Allerdings entnehmen wir einer Arbeit von BLACK (1953), daß der Autor den „Interzellulärschleim“ fucoidinreich findet und sogar in seinem Fucoidingehalt eine jahreszeitliche Abhängigkeit aufzeigen kann. Ob es sich dabei um Schleime handelt, die aus den Schleimgängen stammen, oder um die besonders im Mark verquollenen Primärschichten der Zellmembranen, läßt sich wohl nur durch mikrochemische Untersuchungen an mikroskopischen Schnitten entscheiden. Aufarbeitungen von Massenmaterial wird hierbei nur in seltenen Fällen eine Entscheidung zulassen.

Schließlich sei noch kurz auf den auch sonst in der algologischen Literatur (z.B. OLTMANN, FRITSCH, MOSS u.a.) viel angewandten Ausdruck „Interzellulärschleim“ eingegangen. Der Ausdruck beschreibt lediglich topographisch den Lageort des Alginatschleims ohne über seine Entstehung etwas auszusagen. Bei Interzellulärschleimsubstanzen kann es sich aber um direkte Ausscheidungen des Plasmas durch die Zellhaut handeln, wie das z.B. in tierischen Bindegeweben der Fall ist, oder es handelt sich um verquollene Membranen, wie wir es für die untersuchten Braunalgen zeigen konnten. Die Alginat erweisen sich dann aber als wesentliche Bestandteile der Zellmembranen.

F. Zusammenfassung

Mit Hilfe polarisationsoptischer Untersuchungen konnte auf Grund der von THIELE und ANDERSEN (1955 a-c) durchgeführten Modellversuche an Alginsäure gezeigt werden, daß auch in Gewebeschnitten von Laminarien und Fucaceen die Alginsäure optisch anisotrop vorliegt.

Durch ionotrope Umrichtungen war es möglich, Alginsäure neben der Zellulose polarisationsoptisch nachzuweisen und ihre Verteilung im Algenthallus zu studieren. Das Verhältnis Alginat zu Zellulose ist im Mark gegenüber der Rinde stark zu Gunsten des Alginates verschoben.

Der Herauslösungsvorgang der Alginsäure wird polarisationsoptisch verfolgt. Es wird nachgewiesen, daß die Alginsäure vorzüglich in den Primärschichten der Zellmembran gelagert ist, während die unmittelbar ans Plasma angrenzenden Sekundärschichten aus Zellulose bestehen. Durch Differentialfärbung mit Jod-Schwefelsäure konnten die beiden Zellwandbestandteile nebeneinander nachgewiesen und die polarisationsoptischen Befunde bestätigt werden.

Literaturverzeichnis

AMBRONN, H. und A. FREY, 1926: Das Polarisationsmikroskop. Leipzig. — ANDERSEN, G., 1954: Bildung und Verhalten geordneter, anisotroper Gele von Polyuronsäuren. Diss. Kiel. — BAAS-BECKING, L. G. M. und E. GALLIKER, 1931: Wallstructure and Mineralisation in Corallin Algae. J. Phys. Chem. 1931, 476. — BLACK, W., 1953: Biochemistry 5. Constituents of the Marine Algae. Ann. Rep. of the Chemical Soc. (London) 50, 1953. — BURA, G. M. and P. HAAS, 1931: On the

Nature of the cellwallconstituents of brown Algae. *Biochem. J.* **25**, 403. — CAMERON, M. C., ROSS, A. G. und PERCIVAL, E. G., 1948: Methods for the Routine Estimation of Mannitol, Alginate Acid and combined Fucose in Seaweeds. *Journ. Soc. Chem. Ind.* **67**, 161. — DEWAR, E. T., 1951: Chemicals from brown Algae. *Manufact. Chemist* L. Hill Ltd. London. — FÖRSTER, K., 1950: Gewebsspannungen und Luftblasenbildung bei *Fucus*. *Planta* **38**, 280. — FREY-WYSSLING, A., 1936: Der Aufbau der pflanzlichen Zellwand. *Protoplasma* **25**, 261. — FREY-WYSSLING, A., 193: Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate. Berlin 1938. — FREY-WYSSLING, A., 1940: Der Feinbau der Zellwände. *Naturwiss.* **28**, 385. — FRITSCH, F. E., 1945: The Structure and Reproduction of the Algae. Vol. II, Cambridge. — KERTESZ, Z. I., 1951: The pectic substances. *Intersc. Publ. Inc.* New York. — KYLIN, H., 1913: Untersuchungen über die Biochemie der Meeresalgen. *Z. physiol. Chemie* **83**, 171 und **94**, 337, 1915. — MIWA, T., 1941: Biochemische Studien über die Zellwände von Braun- und Rotalgen. *Jap. Journ. Bot.* **11**, 41. — MOSS, B. L., 1948: Studies in the Genus *Fucus*. Part I. *Ann. Bot.* **12**, 267. — NAYLOR, G. L. und RUSSELLS, 1934: On the presence of Cellulose in the Cellwalls of Brown Algae. *Ann. Bot.* **48**, 635. — NICOLAI, E. und FREY-WYSSLING, A., 1938: Über den Feinbau der Zellwand von Chaetomorpha. *Protoplasma* **30**, 410. — NICOLAI, E. und PRESTON, R. D., 1952: Cellwall studies in the Chlorophyceae. A General Survey. *Proc. Roy. Soc.* **B 140**, 244. — OLTMANN, F., 1922: Morphologie und Biologie der Algen. Bd. II, 2. Aufl. Jena 1922. — PAPPENFUSS, G. F., 1951: in SMITH: *Manual of Phycology*. Waltham, Mass. — SCHAEDE, R., 1940: Über den Feinbau von Parenchymmembranen. *Ber. deutsch. Bot. Ges.* **58**, 275. — SCHMIEDEBERG, 1885: *Ges. d. Naturf. u. Ärzte. Tageb. d. Vers.* **58**, 427. — SCHMIDT, W. J., 1924: Die Bausteine des Tierkörpers im polarisierten Licht. Bonn 1924. — SCHMIDT, W. J., 1937: Die Doppelbrechung des Karyo-, Meta- und Cytoplasmas. Berlin. — SCHMIDT, W. J., 1941: Über die Ermittlung von Grundtexturen. *Kolloid-Z.* **96**, 140. — SMITH, G. M., 1951: *Manual of Phycology*. Waltham, Mass. — SPONSLER, O. L., 1931: Orientation of cellulose space lattice in the cellwalls of *Valonia*. *Protopl.* **12**, 241. — STANFORD, E. C. C., 1883: Algin, a new substance obtained from some of the commoner species of marine algae. *Chem. News* **47**, 254 und *Pharm. Journ.* **14**, London. — STRUGGER, S., 1940: Ref. über SCHAEDE: Über den Feinbau der Parenchymmembranen. *Protoplasma*, Bd. **35**. — THIELE, H. und G. ANDERSEN, 1955a: Ionotrope Gele von Polyuronsäuren. I. Bildung und Verhalten. *Kolloid-Z.* **140**, 76. — THIELE, H. und G. ANDERSEN, 1955b: Ionotrope Gele von Polyuronsäuren. II. Ordnungsgrad. *Kolloid-Z.* **142**, 5. — THIELE, H. und G. ANDERSEN, 1955c: Ionotrope Gele von Polyuronsäuren. III. Alginat und Pektin in der Pflanze (in Vorbereitung). — WASSERMANN, A., 1948: The Cation Absorption of Brown Algae. *Ann. Bot.* **13**, 87. — WILLE, N., 1897: Beiträge zur physiologischen Anatomie der Laminarien. *Festkrift til Hans Oskar*. II. *Kong. Reg. Jub.* 1897. — ZIEGENSPECK, H., 1938: Halbpolarisiertes Licht. Ref. bei W. J. SCHMIDT. 1938. — ZIEGENSPECK, H., 1940: Dichroskopie und Metachroskopie. *Protopl.* **35**, 237.