

BAUER, SONJA

Aufnahme und Transport von Lucifer Yellow CH in Drüsentakel von *Drosera capensis*

Univ., Dipl.-Arb.,
Wien
1998



books2ebooks.eu

digitalisiert an der
Universitätsbibliothek
Wien

digitised at Vienna
University Library

books2ebooks – Millions of books just a mouse click away!



European libraries are hosting millions of books from the 15th to the 20th century. All these books have now become available as eBooks – just a mouse click away. Search the online catalogue of a library from the eBooks on Demand (EOD) network and order the book as an eBook from all over the world – 24 hours a day, 7 days a week. The book will be digitised and made accessible to you as an eBook. Pay online with a credit card of your choice and build up your personal digital library!

What is an EOD eBook?

An EOD eBook is a digitised book delivered in the form of a PDF file. In the advanced version, the file contains the image of the scanned original book as well as the automatically recognised full text. Of course marks, notations and other notes in the margins present in the original volume will also appear in this file.

How to order an EOD eBook?



Wherever you see this button, you can order eBooks directly from the online catalogue of a library. Just search the catalogue and select the book you need.

A user friendly interface will guide you through the ordering process. You will receive a confirmation e-mail and you will be able to track your order at your personal tracing site.

How to buy an EOD eBook?

Once the book has been digitised and is ready for downloading you will have several payment options. The most convenient option is to use your credit card and pay via a secure transaction mode. After your payment has been received, you will be able to download the eBook.

Standard EOD eBook – How to use

You receive one single file in the form of a PDF file. You can browse, print and build up your own collection in a convenient manner.

Print

Print out the whole book or only some pages.

Browse

Use the PDF reader and enjoy browsing and zooming with your standard day-to-day-software. There is no need to install other software.

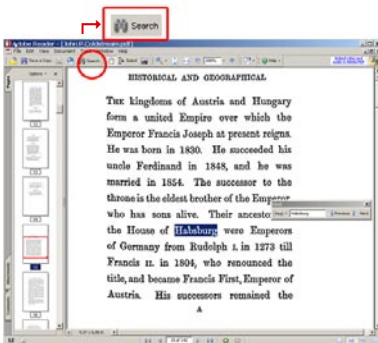
Build up your own collection

The whole book is comprised in one file. Take the book with you on your portable device and build up your personal digital library.

Advanced EOD eBook - How to use

Search & Find

Print out the whole book or only some pages.



With the in-built search feature of your PDF reader, you can browse the book for individual words or part of a word.

Use the binocular symbol in the toolbar or the keyboard shortcut (Ctrl+F) to search for a certain word. "Habsburg" is being searched for in this example. The finding is highlighted.

Copy & Paste Text



Click on the “Select Tool” in the toolbar and select all the text you want to copy within the PDF file. Then open your word processor and paste the copied text there e.g. in Microsoft Word, click on the Edit menu or use the keyboard shortcut (Ctrl+V) in order to Paste the text into your document.

Copy & Paste Images



If you want to copy and paste an image, use the “Snapshot Tool” from the toolbar menu and paste the picture into the designated programme (e.g. word processor or an image processing programme).

Terms and Conditions

With the usage of the EOD service, you accept the Terms and Conditions. EOD provides access to digitized documents strictly for personal, non-commercial purposes.

Terms and Conditions in English: <http://books2ebooks.eu/odm/html/ubw/en/agb.html>

Terms and Conditions in German: <http://books2ebooks.eu/odm/html/ubw/de/agb.html>

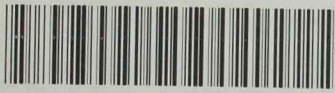
More eBooks

More eBooks are available at <http://books2ebooks.eu>

Universitätsbibliothek Wien

II

1,251.884



DIPLOMARBEIT

zur Erlangung d. akadem. Grades

Magister

~~pharm.~~

rer. nat.

Begutachter: ~~Prof.~~ LICHTSCHEIDL

AUFNAHME UND TRANSPORT

VON LUCIFER YELLOW CH

IN DRÜSENTENTAKEL

VON

DROSER A CAPENSIS

DIPLOMARBEIT ZUR ERLANGUNG
DES AKADEMISCHEN GRADES
MAG. RER. NAT.
AN DER FORMAL- UND
NATURWISSENSCHAFTLICHEN
FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT WIEN

eingereicht von

Sonja Bauer
✓

WIEN 1998

II

1,251.884

Video - Benützung in Söndeleeseraum

INHALTSVERZEICHNIS

I. Teil: Einleitung

1. Ziel der vorliegenden Arbeit	1
2. <i>Drosera capensis</i>	4
2.1. Objektwahl	4
2.2. Blattmorphologie	5
2.3. Blattentwicklung	5
2.4. Anatomie der Drüsентentakel	6
2.5. Funktion der Blätter	8
2.6. Die Bedeutung der Drüsентentakel für <i>Drosera capensis</i>	11
2.7. Über die Notwendigkeit des Insektenfanges für <i>Drosera capensis</i>	12
2.8. Faktoren, die die Stoffaufnahme beeinflussen können	13
3. Drüsencytologie	16
3.1. Die Aufgabe der Drüsenzellen	17
3.2. Das Drüsenköpfchen von <i>Drosera capensis</i>	18
3.2.1. Der Aufbau des Drüsenköpfchens	18
3.2.2. Die Cuticula	19
3.2.3. Die Kommunikation zwischen Drüsenköpfchen und Tentakelstiel	19
3.2.4. Die Endodermis	20
3.2.5. Der Tracheidenstrang	21
3.3. Die Aktivität der Golgi-Vesikel in Drüsenzellen	22
3.4. Die Absorption der Drüsenköpfchen	25



4. Die Endocytose	27
4.1. Der Vorgang der Endocytose	27
4.2. Endocytoseformen	28
4.2.1. Die Phagocytose	28
4.2.1. Die Pinocytose	29
4.3. Coated vesicles	30
4.4. Die Endocytose als Membranrecycling	31
4.5. Die Endocytose bei <i>Drosera capensis</i>	32
5. Der Endocytosemarker Lucifer Yellow CH	33
5.1. Die Notwendigkeit eines Endocytosemarkers	33
5.2. Die Anwendung von LYCH	33
5.3. Die Aufnahme von LYCH in pflanzliche Zellen	34

II: Teil: Material und Methoden

1. Versuchsmaterial	36
2. Kultivierung	36
3. Präparation der Blätter	37
4. LYCH als Hauptreagens	38
4.1. Der Chemismus von LYCH	38
4.2. LYCH als Fluoreszenzfarbstoff	39
5. Fluoreszenzmikroskopie	39
5.1. Das Fluoreszenzmikroskop	41
6. Dokumentation	43

III. Teil: Versuche und Ergebnisse

1. Die Eigenfluoreszenz von <i>Drosera capensis</i>	45
2. Die Aufnahme von LYCH in <i>Drosera capensis</i>	49

2.1. Endocytose in den Tentakeln von Drosera c.	49
2.1.1. Stammlösung	50
2.1.2. Versuchsdurchführung	50
2.1.3. Versuchsergebnisse	52
2.2. Isolation des Drüsenköpfchens von Drosera c.	66
2.2.1. Versuchsdurchführung	66
2.2.2. Versuchsergebnisse	68
2.3. Manipulation des Drüsenköpfchens durch lokale Verstümmelung	71
2.3.1. Versuchsdurchführung	72
2.3.2. Versuchsergebnisse	72
2.4. Manipulation des Drüsenköpfchens durch heiße Vaseline	76
2.4.1. Versuchsdurchführung	77
2.4.2. Versuchsergebnisse	77
3. Hemmung der Endocytose durch das Atemgift Cyanid	81
3.1. Versuchsdurchführung	81
3.2. Versuchsergebnisse	82
4. Die Aufnahme von LYCH nach dem Auslösen der Aggregation	85
4.1. Versuchsdurchführung	85
4.2. Versuchsergebnisse	86
5. Versuche mit CytochalasinD	91
5.1. Versuchsdurchführung	91
5.2. Versuchsergebnisse	91

IV. Teil: Diskussion

1. Die Endocytose in <i>Drosera capensis</i>	93
1.1. Die Aufnahme des Endocytosemarkers durch das Drüsenköpfchen von <i>Drosera c.</i>	93
2. Die diffuse Fluoreszenz des Protoplasmas	97
2.1. Entleerung der Endocytose-Vesikel	97
2.2. Der Transport von LYCH durch Anionencarrier	98
3. Die Anfärbung der Zellwände	102
4. Der Transport von LYCH durch den Tentakel	104
4.1. Die Möglichkeiten für den Transport eines Farbstoffes von Zelle zu Zelle	104
4.2. Der Transport durch den Tracheidenstrang	107
5. Die Aufnahme durch die sessilen Drüsen	111
6. Versuche mit Cyanid	113
7. Versuche mit Pepsin	115

V. Teil: Anhang I

1. Zusammenfassung	118
2. Überlegungen zu weiteren Versuchen	120
3. Literaturliste	121
4. Danksagungen	125
6. Lebenslauf	126

VI. Teil: Anhang II

Manipulation der Chloroplasten mit der
optischen Pinzette in *Drosera capensis*
Einführung, Material und Methoden, Ergebnisse
BEILAGE: VHS-VIDEObAND

I. Teil: Einleitung

1. Ziel der vorliegenden Arbeit

Im Zentrum meiner Beobachtungen standen die Drüsenzellen von *Drosera capensis*. Die ursprüngliche Idee war es herauszufinden, ob und in welcher Weise die Drüsenzellen im Köpfchen der großen Blattemergenzen, den Drüsentakel, und auch die sitzenden Drüsen an den Tentakelstielen für die Aufnahme und den Transport von Proteinen verantwortlich sind.

Ich wollte herausfinden, ob das Köpfchen mit seinen Drüsenzellen einen gesonderten Aufgabenbereich bei der Verdauung und Aufnahme von Proteinen übernimmt, ob sich hier also das „Zentrum“ für Aufnahme und Transport befindet und ob diese Aufnahme durch Bildung von Endocytosevesikel oder durch direkte Membranpassage erfolgt. In diesen Zellen laufen nämlich mehrere ganz unterschiedliche Prozesse neben- und hintereinander ab; es wird ein Fangschleim produziert und sezerniert; die Zellen reagieren auf mechanischen und chemischen Reiz von einem Tier und erzeugen ein Verdauungsssekret, welches zwecks Zerlegung der tierischen Proteine ebenfalls ausgeschieden wird; und schließlich werden die verdauten tierischen Substanzen so wie wahrscheinlich auch die verbrauchten Exkrete resorbiert.

Während die Bildung von Fangschleim und Verdauungsenzymen durch elektronenmikroskopische Untersuchungen recht gut dokumentiert ist (siehe Schnepf, Kap. 3, Drüsencytologie), gibt es nur wenige zum Teil widersprüchliche Untersuchungen über die Resorption von eigenen und fremden organischen Substanzen in *Drosera*.

Es ist nicht bekannt, wo tierisches Eiweiß vom Droserablatt aufgenommen wird. Ob diese Aufnahme durch die großen Drüsenköpfchen der Tentakel, oder auch durch die sitzenden Drüsen am Tentakelstiel und an der Blattbasis erfolgt, ist nicht geklärt. Und es ist auch nicht bekannt, wie Aminosäuren und Oligopeptide in die Zellen gelangen, ob es Carrier und Transportproteine in der Plasmamembran von Drüsenzellen gibt, oder ob extracorporale Vesikel durch Endocytose ins Plasma gelangen.

Auch über die Funktion der kleinen sitzenden Drüsen ist sehr wenig bekannt, was sicherlich auf die sehr schwere Beobachtung und Manipulation aufgrund ihrer Kleinheit zurückzuführen ist. Auch ich mußte mich mit der bloßen Beobachtung derselben zufriedenstellen, da sich eine Isolation dieser kleinen Papillen, vor allem für die lichtmikroskopische Methode, als nahezu unmöglich herausstellte.

Einer der Hauptgründe für das rege Interesse unseres Institutes an den Pflanzenvertretern der Gattung *Drosera* ist das Phänomen der „Aggregation“; Darwin hat diesen Begriff im Zuge seiner Untersuchungen über insektenfressenden Pflanzen geprägt (Darwin, 1875).

Im Mittelpunkt von Darwins Betrachtungen stand zunächst die einheimische *Drosera rotundifolia*. Er beschreibt, daß der normalerweise homogene, rote Zellsaft nach chemischer oder mechanischer Reizung zerfällt. Es bilden sich kleine, dunkelrot gefärbte Massen, die in einer farblosen Flüssigkeit suspendiert sind. Er konnte beobachten, daß diese Strukturen beweglich waren, sich zu größeren vereinigen, wieder zerteilen und ihre Form verändern. Nach Beendigung des Reizes stellte sich der ursprüngliche Zustand wieder ein. Darwin stellte die These auf, daß es sich dabei um Plasmaeinheiten handle, und prägte dementsprechend den Begriff der Aggregation, also eine Zusammenballung des Protoplasmas.

Schimper konnte diese Annahme widerlegen, indem er bewies, daß es sich bei den stark rot gefärbten Anhäufungen um Vakuolen handelt, die in einem gequollenen Plasma liegen (Schimper, 1882). Bei dem Vorgang der Aggregation handelt es sich also nicht um eine Plasmazerklüftung, sondern um eine Plasmaquellung, die eine Vakuolenzerklüftung zur Folge hat

In diesem Zusammenhang ist es verständlich, daß der Begriff der Aggregation irreführend und daher stark umstritten ist. In unserer Arbeitsgruppe haben wir lange nach einem anderen Namen für dieses Phänomen gesucht, sind allerdings zu dem Entschluß gekommen, daß die Einführung eines neuen Begriffes zu weiteren Verwirrungen führen würde. Außerdem wurde dieser Begriff von bedeutenden Wissenschaftlern aufgenommen und in diesem Sinne weiterverwendet und ist dementsprechend ein Pseudonym für eine bekannte Tatsache geworden.

Unsere Betreuerin, Prof. Dr. Irene Lichtscheidl, hat sich in mehreren Anläufen mit diesem Phänomen auseinandergesetzt. Es sind vor allem die elektronenmikroskopischen Arbeiten (Lichtscheidl et al., 1990), die sie gemeinsam mit Hepler in den USA durchgeführt hat, und der in Zusammenarbeit mit dem Institut für wissenschaftlichen Film in Göttingen entstandene Film über Plasmaquellung (Lichtscheidl, 1987), die die Grundlagen und Ausgangspunkte für unsere Versuche bildeten. Wir, das sind meine Kollegen Barbara Weigel, Björn Sieberer und ich, haben es uns zum Ziel gesetzt, durch einerseits klar abgesteckte Arbeitsbereiche, aber andererseits höchstmöglichen Informationsaustausch und Zusammenarbeit, die Ergebnisse von Prof. Dr. Lichtscheidl zu vervollständigen und auszubauen.

2. *Drosera capensis*

2. 1. Objektwahl

Drosera capensis – eine carnivore Pflanze aus der Familie der Droseraceen – ist eine südafrikanische Art. Wir haben uns für diesen Vertreter entschieden, da die Blätter im Gegensatz zu der einheimischen *Drosera rotundifolia* relativ groß, lang und einheitlich sind. Außerdem weisen die Blätter einen einheitlichen Tentakelbesatz auf, was für die Versuche von Vorteil war. Schlußendlich ist auch noch hinzuzufügen, daß dieser südafrikanische Vertreter eine Vegetationsperiode aufweist, die ganzjährig verläuft und dementsprechend nahezu durchgehende Versuchsreihen möglich gemacht hat.



Abb.: *Drosera capensis*

2. 2. Blattmorphologie

Eine erwachsene Pflanze von *Drosera capensis* ist ungefähr 15 cm hoch. Von der Basis ausgehend stehen die Blätter wirtelig angeordnet. Diese Blätter sind länglich und weisen entsprechend den carnivoren Eigenschaften besondere anatomische Merkmale auf. Sie tragen auf ihrer Oberseite Emergenzen mit einem Drüsenköpfchen, die sogenannten „Drüsententakel“, deren Aufgaben sowohl die Fangschleimausscheidung, die Aufschließung gefangener Insekten, sowie auch wahrscheinlich die Resorption der verdauten Materialien ist.

Die einzelnen Tentakeln können auch mit freiem Auge gut erkannt werden. Ihre Größe ist nahezu konstant. Grundsätzlich muß allerdings zwischen den kurzen Tentakeln im Zentrum des Blattes unterschieden werden, die ca. 0,5 mm lang werden, und den langen zum Rand des Blattes hin, die bis zu 5 mm groß werden. Obwohl also zwischen zentralen und marginalen Tentakeln eine gewaltige Größendifferenz besteht, konnten keine ultrastrukturellen Unterschiede nachgewiesen werden (R. Outenreath und M. Dauwalder, 1982). Die Drüsenköpfchen ihrerseits weisen eine durchgehende Länge von ca. 0,1 mm auf.

2.3. Blattentwicklung

Junge Blätter sind zunächst an der Spitze eingerollt. Die Entwicklung dieser Blätter kann täglich beobachtet werden. Die vollständige Entstehung des Blattes bis zur Funktionstüchtigkeit der Tentakel und Drüsenköpfchen dauert etwa sieben Tage. Nur die Entfaltung des jungen eingerollten Blattes von der Basis bis zum Apex benötigt zwei oder drei Tage davon. Zunächst steht das eingerollte Blatt noch horizontal zum Blattstiel. Während die Spitze des Blattes noch eingerollt ist, sind die Tentakel an der Blattbasis schon voll entwickelt, was an der Absonderung des Fangschleimes deutlich beobachtet

werden kann. In diesem Falle besitzt jeder einzelne Tentakel ein Schleimtröpfchen rund um sein Drüsenköpfchen. Obwohl die zentral lokalisierten Tentakel, die im Gegensatz zu den äußeren extrem kurz sind, sich nicht entfalten, beginnt die Schleimsekretion zur selben Zeit wie bei den benachbarten langen Tentakel. Das bedeutet, daß die Schleimproduktion parallel zur Entfaltung des Blattes, also entlang der Linie zwischen Basis und Apex verläuft.

Die Stadien der Entwicklung sind von Blatt zu Blatt und auch von Pflanze zu Pflanze verschieden. Um einheitliches Versuchsmaterial zu bearbeiten, müssen also gewisse Richtlinien und Standardisierungen eingehalten werden. Es ist am besten, das fast entwickelte Blatt, das nahezu vertikal liegt, dessen Spitze allerdings noch nicht ganz entfaltet ist, in drei Regionen einzuteilen: Zunächst die Spitze des Blattes, wo die Drüsen noch leicht an die Blattoberfläche gepreßt sind und noch kein Schleim vorhanden ist; dann der mittlere Abschnitt mit Tentakeln in unterschiedlichen Stadien der Entfaltung, und dementsprechend auch mehr oder weniger Schleimproduktion; schließlich die Blattbasis mit voll entwickelten Tentakeln und Fangschleimabsonderung.

2.4. Anatomie der Drüsententakel

Die Tentakelstiele bestehen aus einem durchgehenden zentralen Tracheidenstrang. Er ist umgeben von einer Schichte Parenchymzellen, daran anschließend folgt eine Reihe von Epidermiszellen. Diese sind von einer dicken Cuticula bedeckt. Der Übergang zum Köpfchen ist durch einen Endodermis-Halskranz gekennzeichnet. Das Köpfchen selbst ist aus dem zentralen Tracheidenkomplex, der daran anliegenden Endodermis, sowie aus einer inneren und einer äußeren Drüsenzellschichte aufgebaut. Eine Cuticula mit zahlreichen Poren schützt das Köpfchen nach außen hin.

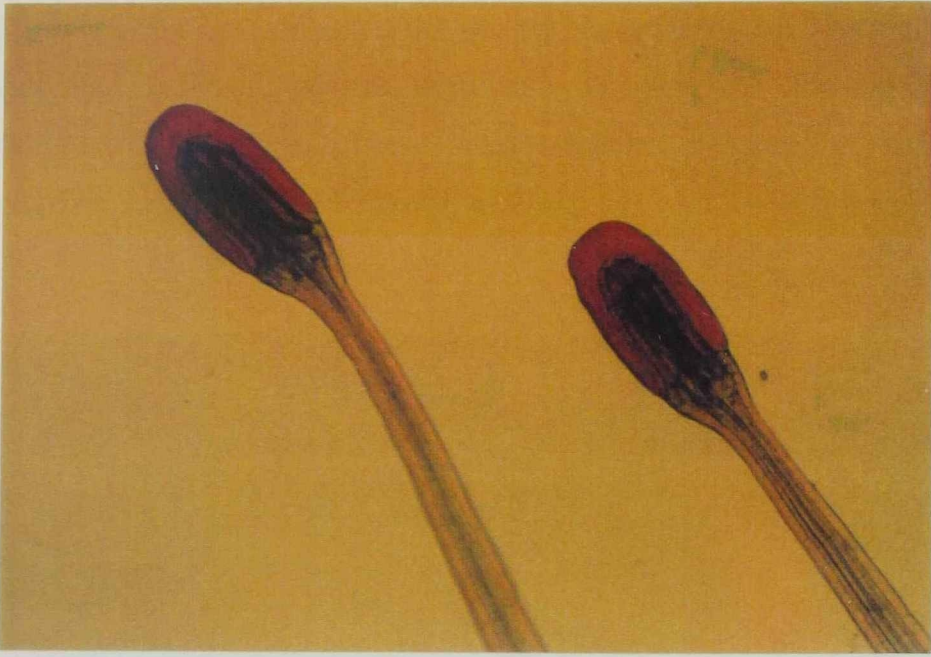


Abb.: *Drosera capensis* x 60, Tentakel im Hellfeld und Blaufilter

Auffällig sind die sogenannten sessilen Drüsen, die sowohl am Blattgrund als auch am Tentakel selbst aufsitzen. Sie sind zwei- oder vierzellig. Ihre Funktion ist weitgehend unbekannt.



Abb.: *Drosera capensis* x 1400, sessile Drüse am Tentakelstiel, primäre Fluoreszenz, 420nm

Abgesehen von diesen sessilen Drüsen, die blasenförmig auf Tentakelstiel und Blattgrund aufsitzen, gibt es auch noch Papillen, die ausschließlich am Blattgrund vorkommen. Diese sind gestielt, siebenzellig und etwas komplizierter gebaut als die sitzenden Drüsen.

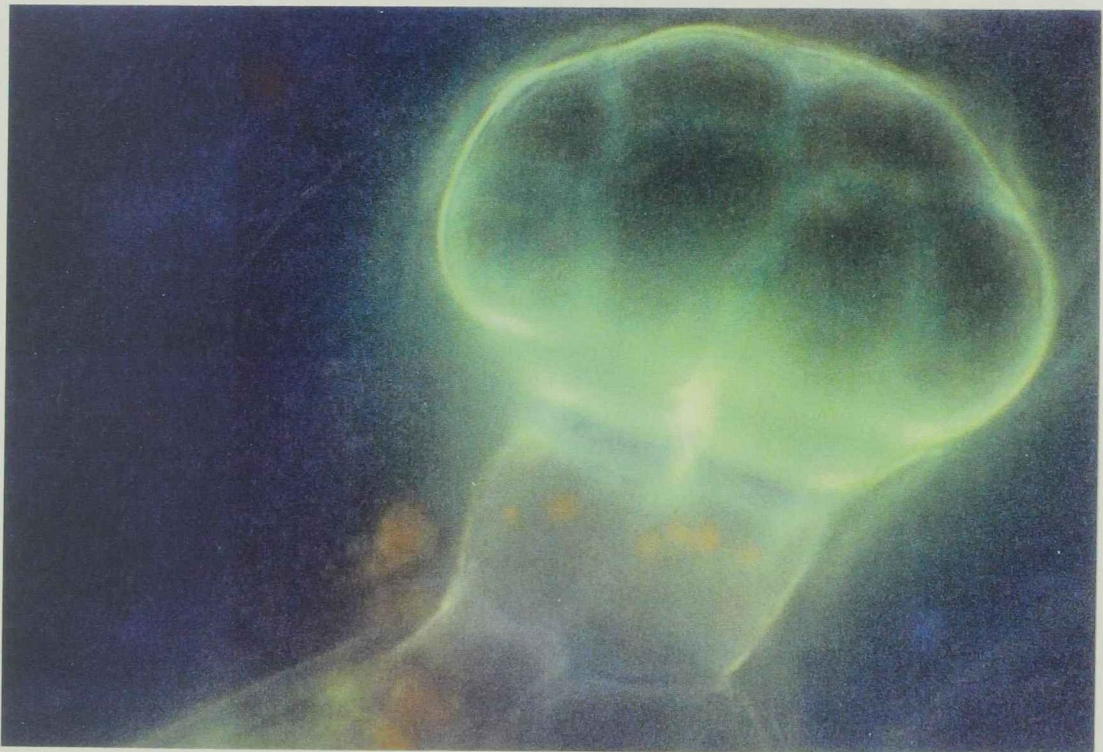


Abb.: *Drosera capensis* x 1600, gestielte Drüsen am Blattgrund, Sekundärfluoreszenz LYCH, 420nm

2.5. Funktion der Blätter

Die Gesamtheit der Tentakel funktioniert als Klebefalle. Die Drüsenköpfchen sondern glitzernde Tropfen eines klebrigen Sekrets ab, das kleine Tierchen anlockt. Diese bleiben an den Drüsen hängen, kommen bei ihrem Befreiungsversuch mit weiteren Drüsen in Berührung und werden dadurch um so fester gehalten. Durch den Berührungszreiz veranlaßt, erzeugen die Drüsenzellen zunächst noch mehr Fangschleim, wodurch das gefangene Tier festgehalten wird und seine Atmungsorgane verklebt werden. Außerdem

krümmen sich die Tentakel gegen die Blattmitte und drücken das gefangene Insekt gegen die Blattfläche. Dann werden in den gleichen Köpfchendrüsenzellen Verdauungsenzyme gebildet, im Wesentlichen saure Hydrolasen und Phosphatasen, welche das tierische Eiweiß zerlegen. Die überschüssigen Drüsensekrete wie auch die Verdauungsprodukte werden resorbiert, wobei sowohl der Ort der Aufnahme wie auch die Art der Resorption weitgehend ungeklärt sind. Die Bedeutung der Drüsenzellen im Köpfchen und auch im Besonderen der sessilen Drüsen am Blattgrund und am Tentakelstiel standen daher im Zentrum meiner Beobachtungen. Es galt herauszufinden, ob und in welcher Weise diese Drüsen für die Aufnahme von tierischen Eiweiß verantwortlich sind.

2.6. Die Bedeutung der Drüsententakel für *Drosera capensis*

Der Gedanke, daß es Pflanzen gäbe, die aus Insekten, welche sie mit ihren Blättern fangen, Stoffe aufnehmen, die von Bedeutung für die Ernährung der Pflanze sind, ist schon alt. Im Jahre 1769, also bereits zehn Jahre bevor Jan Ingenhousz die Funktion des grünen Laubblattes feststellte, sprach John Ellis, ein englischer Botaniker, die Vermutung aus, daß *Dionaea muscipula* in ihren Blättern Organe besäße, die es ihr ermöglichten, sich aus den gefangenen Insekten Nahrung zu verschaffen.

Anfangs fand diese Annahme wenig Anhänger. Bis zu jener Zeit hatte man es als ein Vorrecht von Menschen und Tieren betrachtet, Pflanzen zu verzehren. Daß es Pflanzen gäbe, die Tiere als Nahrung zu sich nähmen, bedeutete eine Umkehr in der Ordnung der Natur.

Im Jahre 1782 war es A. W. Roth, der zum ersten Mal eine analoge Erscheinung bei *Drosera* erwähnte. Er hat wahrgenommen, daß die gestielten Drüsen zweier europäischen Sonnentauarten, *Drosera rotundifolia* und *Drosera*

longifolia, oft über tote Insekten hingebogen waren. Absichtlich auf das Blatt gebrachte Insekten bewirkten gleichfalls eine Krümmung der Tentakel.

Bahnbrechende Arbeiten auf dem Gebiet der insectivoren Pflanzen wurden von Ch. Darwin (Insectivorous Plants, 1875) geleistet, und obgleich er selbst noch nicht direkt die Bedeutung des Insektenfangs für diese Pflanzengruppe dargelegt hat, hat er sie, namentlich auch durch den Nachweis eines einweisspaltenden Enzyms, sehr wahrscheinlich gemacht.

Seit Darwin die Aufmerksamkeit auf die Besonderheiten von Drosera-Vertretern gelenkt hatte, haben sich zahlreiche Wissenschaftler dieser Pflanze gewidmet. Im Zentrum der Interesse standen Überlegungen hinsichtlich der tatsächlichen Notwendigkeit des Insektenfanges, wie dies bei canivoren Pflanzen ganz allgemeinen zu diskutieren ist. Dementsprechend wurden zahlreiche Versuche gemacht, die zeigen sollten, ob der Insektenfang für diese Pflanzengruppe grundsätzlich notwendig ist, oder ob es sich dabei nur um einen zusätzlichen Nährstoffeintrag handelt, der zu besserem Wachstum führt.

In seiner Abhandlung „Die insektenfressenden Pflanzen“ in Schenks „Handbuch der Botanik“ (1882) sagt Drude: „Als eine weitere Lücke, deren Ausfüllung zur genaueren Kenntnis unserer interessanten Pflanzen wünschenswert wäre, kann die mangelhafte Kenntnis von der Absorption der gelösten animalischen Substanzen durch die Verdauungsorgane bezeichnet werden; wie die entstandene konzentrierte Lösung veranlaßt wird, durch die Drüsen oder die Epidermiszellen in das Innere des Blattes zurückzuwandern, und wie sie dort zur Ernährung weiter verwendet wird das sind ebenso wichtige als interessante Fragen.“

1936 hat J. Oudman in seiner Arbeit „Über Aufnahme und Transport N-hältiger Verbindungen durch die Blätter von *Drosera capensis*“ eben diese Worte zitiert. Er hat seinerseits gemeint, daß die Frage, welche Organe eine wichtige Rolle bei der Stoffaufnahme durch die Blätter von *Drosera* spielen, bis zu dieser Zeit ungelöst blieben. Er hat festgestellt, daß die Wissenschaft

auf diesem Gebiet eigentlich seit Darwin kein bißchen weitergekommen war. Aber auch heute, mehr als 60 Jahre später, ist man diesem Problem nicht auf den Grund gekommen.

2.7. Über die Notwendigkeit des Insektenfanges für *Drosera capensis*

Darwin (1875) war der erste, der durch Experimente nachgewiesen hat, daß Insektivoren aus den von ihnen gefangenen Insekten Stoffe aufnehmen, die in den Prozeß des Stoffwechsels einbezogen werden und so das Wachstum der Pflanzen fördern. Er ist zu dem Schluß gekommen, daß es auf Grund verschiedener Erscheinungen wie Tentakelkrümmung, Aggregation und Absonderung eines eiweißspaltenden Enzyms tatsächlich eine Insektivorie gibt.

Über die Natur der aus den Insekten aufgenommenen Stoffe sind die Ansichten zu dieser Zeit auseinandergewichen. Darwin und seine Zeitgenossen haben an N-haltige Verbindungen gedacht. Stahl (1900), Weyland (1912), und Ruschmann (1914) außerdem auch an mineralische Nährstoffe.

In der Arbeit von J. Oudman und J. C. Schoute (1935) hat man sich dem Problem der N-haltigen Substanzen gewidmet. Oudman hat dabei *Drosera capensis* in einer solchen Weise isoliert, daß Insektenfang nicht möglich war. Diese Pflanzen sind zunächst ausschließlich mit destilliertem Wasser bzw. mit N-freier Lösung versorgt worden. Es hat sich herausgestellt, daß in diesen Fällen wenig oder gar kein Wachstum eingetreten ist. Bei Versorgung mit einer Knop'schen Lösung ist allerdings gutes Wachstum eingetreten. Oudman ist also zu dem Schluß gekommen, daß wenn der Nährboden genügend Nährsalze enthält, *Drosera capensis* auch ohne Insektenfang imstande ist, sich gut zu entwickeln.

Des weiteren hat er den Pflanzen, welche sich auf Nährstoff-freiem Boden befanden, lokal N-hältige Substanzen in Form von Asparagin, Pepton oder Knop'sche Lösung auf die Blätter appliziert. Aus dem ausgezeichnetem Wachstum dieser Pflanzen hat er geschlossen, daß die Blätter befähigt sind, N-hältige Verbindungen aufzunehmen. Als Aufnahmeorgane hat er die Tentakel, die auf dem Blatt befindlichen Papillen und die Epidermis für möglich gehalten.

2.8. Organe, die für die Aufnahme verantwortlich sind

Aus den Erscheinungen, die nach Ernährung in den Tentakel von *Drosera* auftreten, nämlich Aggregation und Granulation, haben Darwin und Pfeffer (1929) geschlossen, daß Stoffe durch die Tentakel aufgenommen werden. Pfeffer weist dabei aber auf die Möglichkeit hin, daß die Stoffe nur eine auslösende Wirkung hätten, so daß sich daraus nicht eine bedeutende Aufnahme folgern läßt.

Eine andere Erscheinung, die auf Stoffaufnahme durch die Tentakel hinweisen könnte, ist das Auftreten von Veränderungen in der Kernstruktur in den Tentakelzellen nach Ernährung. L. Huie (1899), O. Rosenberg (1899), K. Konopka und H. Ziegenspeck (1929) sind der Meinung, daß dies auf eine Stoffaufnahme durch die Tentakel hinweist. Dabei soll es vor allem in den Drüsenzellen, aber weiter auch in geringerem Maße in den Zellen der Parenchymglocke, der Tracheiden und der Parenchymzellen im Stiel zu diesen Veränderungen des Kerns kommen. Es kommt zu Ansammlungen von Chromatin, die dem Kern das Aussehen eines sich in einem Teilungsstadium befindlichen Kerns geben. Der Kern wird kleiner ebenso wie der Nukleolus. Die Kernwand wird beinahe oder ganz unsichtbar. Bis vor kurzem dachte man, daß die Veränderung vor allem darin bestünde, daß Kerne, die im ungereiztem Zustand spindelförmig sind, sich nach der Ernährung abrunden. Hier hat aber meine Kollegin Barbara Weigel zeigen können, daß dies nicht

der Fall ist, sondern daß die Kerne spindelförmig bleiben und höchstens etwas bauchiger werden (Weigel, 1998).

Für die Stoffaufnahme kommen entweder die Drüsenköpfchen oder auch die sessilen Papillen auf Tentakelstiel und Blatt in Betracht. Die Epidermis selbst als Aufnahmeorgan, wie von Oudman vorgeschlagen war, kommt jedenfalls nicht in Frage, da sie von einer dicken Cuticula bedeckt ist. Oudman ist allerdings davon ausgegangen, daß die Epidermis im Gegensatz zum Drüsenköpfchen keine Cuticula besitzt.

Die Annahme, daß der Tentakel für die Stoffaufnahme bedeutend ist, ist immer nahe gelegen. Allerdings würde diesem Organ dann eine außerordentlich komplizierte Funktion zu Grunde liegen. Denn nicht nur die Aufnahme der Nährstoffe, sondern auch die Krümmung selbst, die Aussonderung des Fangschleimes und der Verdauungssekrete zählen zu seinen Aufgaben.

Diese Überlegungen lenkten dann die Aufmerksamkeit auf die Papillen, also die sessilen Drüsen, die sowohl auf der oberen und unteren Seite des Blattes als auch auf den Tentakelstielen vorkommen. Man findet in der Literatur mehrere Hinweise, daß diese Papillen eine wichtige Rolle bei der Stoffaufnahme spielen. Darwin hat gezeigt, daß deren Inhalt sich mit Goldchlorid und Silbernitrat schnell schwarz färbt und daß sich diese Erscheinung in den darunter gelegenen Geweben fortpflanzt. Rosenberg hat eine schnellere Anfärbung mit Methylblau der sessilen Drüsen gesehen, als das bei den Drüsenzellen selbst der Fall war.

Auch Oudman hat versucht herauszufinden, welche Strukturen für die Aufnahme von N-haltigen Substanzen verantwortlich sind. Dazu hat er Drosera-Blätter mit der Rückseite auf ein Objektglas befestigt. Auf die Drüsenköpfchen der Randtentakel hat er ein Gemisch aus Agar und Asparagin gespritzt. Auf diese Weise waren nur die Randtentakel in der Lage Asparagin

aufzunehmen. Eine zweite Blätterreihe hat diesen Stoff nur auf der Rückseite des Blattes erhalten, wo sich keine Tentakel, wohl aber Papillen befinden. Anhand der Zunahme des Frischgewichts hat Oudman feststellen können, daß sowohl durch die Tentakel als auch durch die Rückseite des Blattes Asparagin aufgenommen werden kann.

2.9. Faktoren, die die Stoffaufnahme beeinflussen können

Bei Darwin findet man bereits den Hinweis, daß das Eindringen einiger Stoffe sehr schnell vor sich gehen kann und so durch Faktoren wie z. B. die Temperatur beeinflusst wird (Darwin, 1875). Oudman hat dann beweisen können, daß die Temperatur einen bedeutenden Einfluß auf die Aufnahme ausübt. Er hat wieder die Asparagin-Agar-Mischung verwendet und bei unterschiedlichen Temperaturen 24 Stunden lang auf die Tentakel wirken lassen. Bei 5°C hat sich eine Zunahme des Frischgewichts von 0,39 % ergeben, während es bei 35°C bereits 2,13 % waren (Oudman, 1935).

Des weiteren hat sich J. Oudman mit dem Faktor der Konzentration beschäftigt (Oudman, 1935). Er hat die Randtentakel mit unterschiedlicher Asparagin-Konzentration bedeckt und nach 40 Stunden das Frischgewicht überprüft. Es hat sich herausgestellt, daß die Asparaginaufnahme bei höherer Konzentration größer ist, jedoch nicht proportional der Konzentration. Bei einer 16 mal höheren Konzentration war die Aufnahme nur 2 mal so groß.

Außerdem hat Oudman beweisen können, daß von Koffein eine größere Menge als von Asparagin aufgenommen werden kann. Interessant in diesem Zusammenhang sind seine Versuche, bei denen er die Drüsenköpfchen einiger Tentakel entfernt hat. Dabei hat er festgestellt, daß sich die Aufnahme verringert, sobald das Drüsenköpfchen nicht mehr vorhanden ist, und das sowohl bei Koffein als auch bei Asparagin. Oudman ist davon ausgegangen,

daß es vor allem die größere Oberfläche ist, die diese erhöhte Aufnahme beim Vorhandensein des Köpfchens ausmacht. Im Anschluß hat er allerdings Berechnungen im Sinne der Oberflächenverhältnisse durchgeführt und ist zu folgendem Ergebnis gekommen: Obwohl die absolute Zunahme bei den Blättern, deren Drüsenköpfchen entfernt worden waren, geringer ist als bei denjenigen, wo dies nicht der Fall war, so ist doch die Zunahme je Oberflächeneinheit dort viel höher. Er hat sich dann die Frage gestellt, ob eine regulierende Wirkung vom Köpfchen ausgehen kann. Allerdings hat er dabei nicht an Strukturen im Köpfchen selbst gedacht, sondern viel mehr an seine Umgebung, und so als eine mögliche Ursache für die Hemmung der Stoffaufnahme den Sekretionsprozeß in Betracht gezogen. Es war zu diesem Zeitpunkt (Darwin, 1875) bereits bekannt, daß nach Ernährung oft eine reichliche Sekretion stattfindet. Nachher läßt sich nur wenig oder gar keine Sekretion am Drüsenköpfchen nachweisen. Trotzdem schreibt er in seiner Arbeit von 1935: „Es könnte noch eine zweite Möglichkeit geben, nämlich, daß das Drüsenköpfchen selbst die Aufnahme auf irgendeine Weise reguliert. Über eine regulierende Wirkung dieses Organs ist aber nichts bekannt.“

Natürlich hat Oudman nicht an die Möglichkeit einer Selbstregulierung im Köpfchen denken können. Noch vor dem Aufkommen der Lipid-Filter-Theorie war es schon verwunderlich genug beobachten zu können, daß Koffein als größeres Molekül schneller aufgenommen werden kann als Asparagin. Dementsprechend war man nicht auf den Gedanken gekommen, daß Proteine unter Umständen nicht frei durch die Plasmamembran dringen können. Der Vorgang der Endocytose macht die Aufnahme unterschiedlichster Substanzen verständlich. Heute haben wir nicht nur die Möglichkeit die Endocytose zu verstehen, sondern wir können sie auch mit Hilfe von Endocytosemarkern sichtbar machen und verfolgen. Daraus ergibt sich die Hauptaufgabe meiner Arbeit. Bei meinen Versuchen habe ich im wesentlichen ähnliche Methoden wie schon Oudman im Jahr 1935 angewandt, aber eben mit dem heutigen Verständnis und den heutigen Hilfsmitteln.

3. Drüsencytologie

Es sind die Drüsenzellen, denen in meiner Arbeit im Zusammenhang mit der Endocytose das Hauptaugenmerk zukommt. Ältere Arbeiten haben deutlich gezeigt, daß zumindest der Tentakel als Gesamteinheit für die Stoffaufnahme verantwortlich gemacht werden kann (Oudman, 1936). Es gibt deutliche Anzeichen, daß das Köpfchen selbst dabei eine regulierende Rolle spielt (Oudman, 1936; Arisz, 1952).

Oudman hat zunächst gezeigt, daß *Drosera capensis* Stickstoff, sobald dieser nicht im Boden ist, durch die Blätter aufnehmen kann. Des weiteren hat er feststellen können, daß bei einer isolierten Applikation von Asparagin auf die Tentakel mehr von diesem Stoff in das Blatt gelangt, als bei isolierter Applikation auf der Rückseite eines *Drosera*-Blattes. Daraus haben sich für ihn zwei Möglichkeiten ergeben: Einerseits, daß sich das Köpfchen weit besser zur Stoffaufnahme eignet als die Blattepidermis. Andererseits, daß die Blattrückseite nur an bestimmten Stellen zur Stoffaufnahme befähigt ist. Dabei dachte er an die Papillen, die Darwin (1875) und Rosenberg (1899) zuvor schon als zur Stoffaufnahme befähigt beschrieben hatten.

Somit haben wir es bei *Drosera* mit zwei verschiedenen Drüsentypen zu tun: Die Drüsenzellen an der Spitze des Köpfchens und die sessilen Drüsen am Blattgrund und am Tentakelstiel. Nach der Meinung der meisten Autoren ist das Auftreten zweier verschiedener Drüsentypen mit der getrennten Ausscheidung zweier verschiedener Sekrete verknüpft (Schnepf, 1962). Allerdings wurden die sessilen Drüsen seit Darwin und Rosenberg nicht mehr behandelt, sondern mehr oder weniger übersehen. So sagt zum Beispiel Whitacker (1964): „Man muß jedoch berücksichtigen, daß *Drosera* nur eine Art von Drüsen besitzt, wenn man von den winzigen Papillen absieht, die vor allem an den Tentakelstielen sitzen.“

Oudman schreibt in seiner Arbeit von 1936: „Infolge der Tatsachen aus der Literatur (Darwin, Rosenberg), aus denen sich ergibt, daß die Erscheinungen, die bei Ernährung in den Papillen und in den Taktakeln auftreten, einander gleich sind, scheint mir die Annahme, daß die Papillen für die Aufnahme durch die Blattepidermis befähigt sind, am ehesten auf der Hand zu liegen. Technische Schwierigkeiten hielten mich aber davon ab, mich weiter auf dieses Problem einzulassen.“

3.1 Die Aufgabe der Drüsenzellen

Grundsätzlich dienen Drüsen der Ausscheidung von Exkreten und Sekreten. Als Exkrete werden unbrauchbare oder gar schädliche Stoffwechsel-Endprodukte bezeichnet. Sekrete dagegen greifen im Dienste der Ernährung wieder in den Stoffwechsel ein. Dementsprechend unterscheidet man auch zwischen sezernierenden und exzernierenden Zellen (Schnepf, 1974).

Jene Zellen der canivoren Pflanzen, die für die Schleimaußsonderung verantwortlich sind, gehören somit eindeutig zu den sezernierenden Zelltypen. Trotz großer Unterschiede in der Funktion und in der Form sind die Carnivoren-Drüsen im Prinzip alle ähnlich aufgebaut (Schnepf, 1960). Sie bestehen aus den eigentlichen Drüsenzellen und einer Scheide, der Endodermis, die diese vom übrigen Körper trennt.

Die Besonderheit bei Drüsen der Drosera-Vertretern ist die Mannigfaltigkeit der Funktionen. Abgesehen von der Absonderung des Fangschleimes haben die Drüsen auch noch die Aufgabe, die Verdauungsenzyme zu sezernieren und die Verdauungsprodukte zu resorbieren. Andere Insektivoren besitzen für verschiedene Funktionen unterschiedliche, spezialisierte Drüsen.

Zahlreiche Wissenschaftler haben sich mit dem Problem der Funktion der Drüsen von Drosera beschäftigt. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie ist es

mittlererweile sicher geworden, daß die Drüsenzellen im Köpfchen durch ihre hohe Golgi-Aktivität für die Schleimabsonderung verantwortlich sind. Gerade diese hohe Vesikel-Aktivität und die Ergebnisse, die Oudman bereits 1936 präsentiert hat, machen es für mich so wichtig zu untersuchen, ob die Stoffe durch Endocytose in die Köpfchen gelangen könnten, oder ob sie frei durch die Plasmamembran permeieren.

3.2. Das Drüsenköpfchen von *Drosera capensis*

3.2.1. Der Aufbau des Drüsenköpfchens

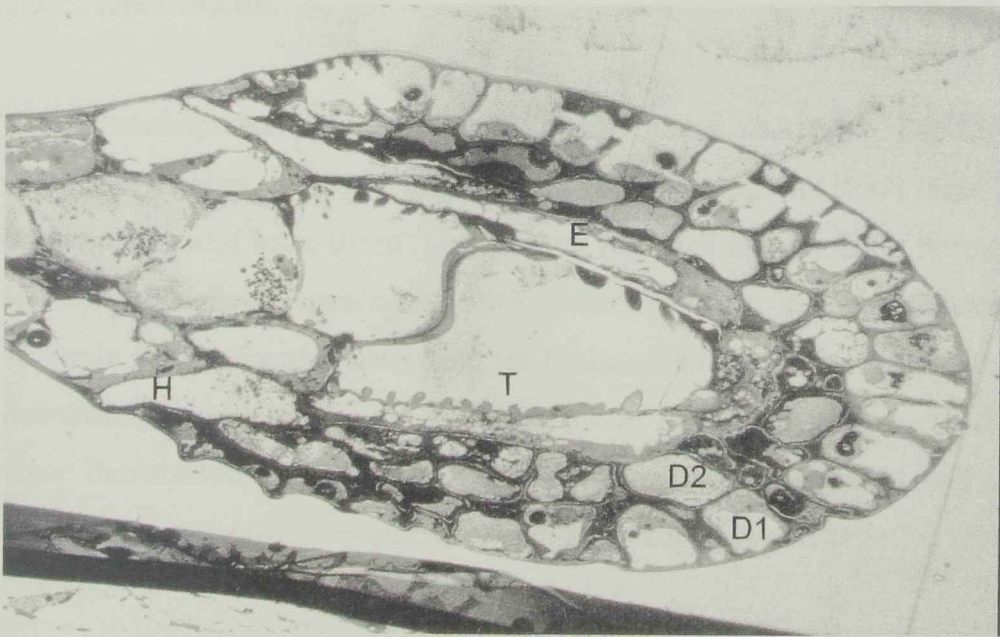


Abb.: Drüsenköpfchen x 220 im Elektronenmikroskop, T: Tracheidenkomplex, E: Endodermiszellen, D1: äußere Drüsenzellen, D2: innere Drüsenzellen, H: Halskranzzellen

Der zentrale Teil des Drüsenköpfchens von *Drosera* ist von einem Tracheidenkomplex erfüllt. Daran anschließend befindet sich eine Lage von Endodermiszellen, die sich kreisförmig um den Tracheidenkomplex anlegen. Diese Endodermiszellen ziehen sich durch das gesamte Köpfchen und treten an der Basis aus. Diese austretenden Endodermiszellen, die hier mit den zentralen Zellen des Tracheidenkomplexes zusammenkommen, bilden mit jenen eine Einheit, die nach Fenner (1904) als Halskranz oder Genickzellen bezeichnet werden. Sie stellen im Wesentlichen die Verbindung zwischen Kopf und Stiel dar. Der Endodermis aufgelagert folgen zwei Reihen von Drüsenzellen, eine innere und eine äußere. Bei den Drüsenzellen unterscheiden wir zwischen den apicalen und den lateralen.

3.2.2. Die Cuticula

Das Drüsenköpfchen ist durch eine Cuticularschicht überzogen. Die Cuticula soll nach Angaben von Haberlandt (1901) und Ziegenspeck (1932) feine Poren besitzen. Schnepf hatte deren Vorkommen zunächst als Artefakte bezeichnet, selbst nach seinen eigenen Arbeiten. Schließlich hat er die Pflanzen mit Albumin gefüttert und konnte dann im Elektronenmikroskop sehen, daß diese Substanz hängengeblieben ist und sich bis in die Poren hineinzieht. Er hat diese Beobachtungen dann auch bei sehr jungen Drüsen gemacht und sah in den Durchbrechungen möglicherweise bevorzugte Austrittsstellen für den Schleim.

3.2.3. Die Kommunikation zwischen Kopf und Stiel

Im Elektronenmikroskop kann man dort, wo die untersten inneren Köpfchenzellen mit den zentralen Tracheiden zusammenstoßen, also am Halskranz, labyrinthförmige Zellwandfortsätze beobachten. Diese weisen ein

ähnliches Profil und eine ähnlich Elektronendichte wie die Transferzellen von Blattadern auf, die von Gunning und Pate (1969) beschrieben wurden. In den Genickzellen von *Drosera* findet man auch oft einen Leerraum zwischen dem Plasmalemma und dem Zellwandfortsatz. Daraus hat Juniper geschlossen, daß diese Genickzellen mit den Zellwandfortsätzen Transferzellen darstellen.

In diesem Zusammenhang möchte ich auf die Arbeit von Williams und Spanswick (1976) hinweisen, die Überlegungen bezüglich der Fortsetzung des Elektronenpotentials zur Reizübermittlung bei *Drosera* angestellt haben. Sie haben festgestellt, daß sich die meisten Plasmodesmen zwischen den äußeren parenchymatischen Köpfchenzellen im Halsbereich befinden, sowohl in den Längs- als auch in den Querwänden. Sonst sind sie aber nur spärlich vorhanden. Sie haben die Plasmodesmen zunächst als Möglichkeit zur Übermittlung des elektrischen Reizes in Betracht gezogen, mußten aber feststellen, daß dieser Weg aufgrund der Verteilung derselben nicht wirklich ausreichend sein kann. Diese Menge an Plasmodesmen zwischen Kopf und Stiel dürften dementsprechend eher mit dem Transport zusammenhängen.

3.2.4. Die Endodermis

Die Endodermiszellen zeigen einen klassischen Caspary'schen Streifen, der jenen in Wurzelendodermen sehr ähnlich ist. Er befindet sich in jeder Endodermiszelle in radialer Anordnung, bedeckt allerdings nur die äußeren zwei Drittel jener Wände, die mit den Drüsenzellen in Kontakt stehen. Er verläuft sich langsam beim Kontakt mit den inneren Tracheidenkomplex. Der Caspary'sche Streifen gewährleistet einen effektiven Stop des apoplastischen Transportes. Soll irgendein Material die Endodermis durchkreuzen um ins Innere zu gelangen, dann steht ausschließlich der symplastische Weg zur Verfügung.

Nach Schnepf (1961) spielen die Endodermiszellen bei der Sekretion eine besondere Rolle, da sie den Stofftransport zwischen Blatt (Tentakelstiel) und Drüsenzellen vermitteln. Durch ihr Plasma strömt das Wasser und bewegen sich die Zucker. Der Weg über die Zellwand ist versperrt. Ähnlich wie bei den „echten“ Endodermiszellen der Wurzel finden sich jedoch keine strukturelle Hinweise auf ihre besondere Funktion. Im Caspary'schen Streifen sieht Schnepf eine mögliche physiologische Aufgabe, den Abfluß des Fangschleimes nach außen zu erzwingen.

Im Elektronenmikroskop kann man deutlich Plasmodesmen in der Endodermis erkennen. Diese befinden sich sowohl in tangentialer als auch in radialer Ausrichtung. Zwischen der Endodermis und den inneren Köpfchenzellen sind sie meist in kleinen Gruppen von zwei bis vier vorhanden (Schnepf, 1961). Zwischen den basalen Endodermiszellen und den daran anschließenden Epidermiszellen des Stieles sind sie durchaus zahlreich vorhanden; ebenso zwischen der Endodermis und den Transferzellen an der Basis der Köpfchens.

3.2.5. Der Tracheidenstrang

Der Tracheidenstrang zieht sich durch den gesamten Tentakelstiel. Er mündet im Drüsenköpfchen als zentraler Tracheidenkomplex mit weiten Zellen, die von palisadenartigen Zellwänden umgeben sind. Definitionsgemäß ist der plasmatische Inhalt des Spiralgefäßes abgestorben. Seine Hauptfunktion besteht wahrscheinlich in der Wasserleitung und stellt somit eine Verbindung zwischen Blattbasis und Köpfchen dar, die einen umfangreichen Transport erlaubt. Oudman hat gezeigt, daß Fluoreszein, wenn es ausschließlich am Köpfchen appliziert wird, nicht in den Tracheidenstrang gelangt und hat damit einen basipetalen Transport ausgeschlossen (Oudman, 1935). Juniper dagegen hält einen vesikulären Transport, der von den Drüsenzellen ausgeht, und über den Tracheidenstrang nach unten verläuft, für durchaus möglich (Juniper et al., 1987).

3.3. Die Aktivität der Golgi-Vesikel in Drüsenzellen

Schleim ausscheidende Zellen kommen besonders häufig in den Fangorganen einiger canivorer Pflanzen vor, so auch bei *Drosera capensis*. In diesem Fall handelt es sich um klar abgegrenzte Drüsen. Diese Drüsen haben bei *Drosera* auch noch die Aufgabe, die Verdauungsenzyme zu sezernieren und die Verdauungsprodukte zu resorbieren. An der Sekretion des Fangschleimes ist der Golgi-Apparat wesentlich beteiligt. Untersuchungen in verschiedenen Aktivitätsstadien haben gezeigt, daß die Golgi-Vesikel den Fangschleim oder seine unmittelbaren Vorstufen enthalten (Schnepf, 1960).

Auf dem Gebiet des Fangschleimes von Insektivoren, vor allem dessen Bildung und Funktion, ist Schnepf mit seinen Arbeiten am weitesten vorgedrungen. In seiner Arbeit von 1961 hat er gezeigt, daß der Fangschleim in Drüsenzellen von Insektivoren in Vesikeln des Golgi-Apparats gebildet wird. Die Golgi-Vesikel können als Sekret-Vesikel angesehen werden. Er hat diese Arbeit vor allem mit *Drosophyllum* durchgeführt, die sowohl sitzende als auch gestielte Drüsen besitzen. Der Fangschleim wird hier nur von den gestielten Drüsen abgegeben. Da, wie schon erwähnt, der Aufbau sämtlicher Drüsen von Insektivoren sehr ähnlich ist, lassen sich diese Ergebnisse für *Drosera* übernehmen, zumal sie vor allem die hohe Golgi-Aktivität in Drüsenzellen erläutern sollen:

Die Bläschen besitzen einen im Elektronenmikroskop erkennbaren Inhalt, allerdings nur in den Zellen, die direkt an der Schleimausscheidung beteiligt sind, nämlich in der äußeren Drüsenschichte. Er fehlt in den anderen Drüsenzellen. Hier sind die Bläschen kleiner und es kommen wesentlich weniger Dictyosomen vor. Diese Golgi-Vesikel treten nur dann auf, wenn die Tentakeln wirklich sezernieren, sie fehlen in sehr jungen, noch nicht schleimbildenden und in alten, nicht mehr arbeitenden Drüsen. Wenn die Intensität der Sekretion durch Erhöhen oder Erniedrigen der Versuchstemperatur verändert wird, zeigt sich eine gleichsinnige Zu- bzw.

Abnahme auch in der Anzahl der Golgi-Vesikel. Wassermangel bringt die Schleimaussonderung sofort zum Erliegen. Auch hier spiegelt sich die Aktivitätsveränderung, wenn auch etwas verzögert, in den Gogi-Strukturen wider. Die Vesikelbildung ist abhängig von der Sekretsynthese. Wenn diese aus Mangel an Rohstoffen nachläßt, vermindert sich jene ebenfalls. Sie unterbleibt, wenn die Atmung durch Sauerstoffentzug oder durch Inhibitoren gestört wird. Es handelt sich also um einen Energie verbrauchenden Prozeß (Schnepf 1960).

Die in den äußeren Drüsenzellen der *Drosophyllum*-Tentakel von den Dictyosomen gebildeten Bläschen besitzen eine Umhüllung, die etwa so dick wie die Membran einer Zisterne ist. Hinzu kommt, daß sie nach einer Osmiumfixierung einen elektronenmikroskopisch erkennbaren Inhalt haben. *Drosera* besitzt in den äußeren Drüsenzellen der Tentakel ebenfalls Golgi-Vesikel mit grau erscheinendem Inhalt (Schnepf, 1961).

Die Dictyosomen sind polar gebaut. Golgi-Vesikel lösen sich nur an der einen Seite ab. Diese Sekretionsseite ist durch die Sacculi mit dem kleinsten Lumen gekennzeichnet. Die abgelösten Vesikel wandern durch das Plasma. Dabei reift ihr Inhalt. Auch die Vesikelmembran verändert sich und wird der Plasmamembran ähnlich. Schließlich öffnen sich die Vesikel nach außen, indem ihre Membran mit dem Plasmalemma verschmilzt. Der Schleim wandert in den Raum zwischen Plasmalemma und Zellwand. Jedesmal, wenn sich ein Vesikel von einem Dictyosom löst, wird etwas von dessen Membransubstanz verbraucht. Diese Membran wird in das Plasmalemma eingebaut.

Outhenreath und Dauwalder (1982) haben sich direkt mit den Drüsen von *Drosera capensis* auseinandergesetzt. Sie haben auf ultrastrukturellem Weg die Entwicklung von Drüsenzellen dokumentiert. Junge, nicht sezernierende Drüsen zeigen nur kleine Golgi- Vesikel und relativ wenige Zisternen. Sie haben gezeigt, daß sich in den Drüsenzellen eine erhöhte Sekretionsaktivität

ergibt, wenn diese zur Reife kommen. Diese erhöhte Aktivität ist von einer großen Anzahl von Golgi-Vesikeln und einer ansteigenden Zahl von Zisternen begleitet, die allerdings nur in den äußeren, apikalen Drüsen zu beobachten sind. In diesem Stadium ist der Großteil des Cytoplasmas mit unzähligen Vesikeln ausgefüllt, die mit dem Golgi-Komplex assoziiert sind und ein feines, fibrilläres Material beinhalten. Dieses ist dem auf der Oberfläche erscheinendem Schleim sehr ähnlich. Die zahlreichen Dictyosomen stehen mit Vesikeln in Verbindung, welche sich zu großen sekundären Vesikeln vereinigen. Diese Anhäufung ist als Initialphase der Schleimsynthese zu betrachten. In der nächsten Phase wandern die sekundären Vesikel zu der Zelloberfläche und verschmelzen mit der Plasmamembran. Der Schleim befindet sich nun in Portionen entlang der Plasmamembran, ist der Köpfenoberfläche zu orientiert und fehlt eindeutig in den angrenzenden inneren Drüsenzellen. Ist die vollständige Reifung erlangt, verschwindet der Großteil der Sekretions-Vesikel und die Sekretionsaktivität schrumpft auf ein Minimum (Dauwalder und Outenreath, 1982).

Nach Darwin ist es den gereiften Drüsen durchaus möglich, ihre ursprüngliche Aktivität wieder zu erlangen. Er hat dies durch die erhöhte Schleimmenge begründet, die er nach Reizung ausgereifter Tentakel beobachtet hat (Darwin, 1875). Obwohl dies für Jahrzehnte bekannt war, fehlten doch jegliche ultrastrukturelle Beweise. Outenreath und Dauwalder konnten diese Beweise 1987 nachliefern. Sie haben gezeigt, daß nach einer etwa einstündigen Stimulation zahlreiche große Vesikel vom Golgiapparat kommen und beinahe das gesamte Cytoplasma ausfüllen. Diese Vesikel gleichen in ihrem Aussehen genau jenen, die bei Schleimsynthese in den Zellen zu beobachten waren. Nach zwei bis vier Stunden Stimulation sind keine Sekretvesikel mehr zu sehen, allerdings dafür zahlreich Golgistapel, die mit kleineren Vesikeln assoziiert sind. Interessant dabei ist die Beobachtung, daß, wenn die Stimulation mit nicht lebendem Material erfolgt, zwar zahlreiche Golgi-Einheiten vorhanden sind, die Vesikel selbst aber fehlen.

3.4. Absorption der Drüsenköpfchen

Was eine mögliche Aufnahme durch das Köpfchen von *Drosera* betrifft, gibt es leider nicht viele neue Untersuchungen. Gilchrist und Juniper (1974) konnten bei *Drosera* folgendes Phänomen beobachten: Kurz nach dem Füttern mit Milch kam es zu Einfaltungen des Plasmalemmas innerhalb der Endodermiszellen in Richtung Tracheidenkomplex. Sie brachten diesen Vorgang mit einem erhöhten Bedarf an Membranmaterial, welches für den Transport benötigt werden könnte in Verbindung.

Oudman hat nachgewiesen, daß N-Verbindungen unter Umständen nicht frei in die Zelle permeieren können (Oudman, 1935). Daß es einen besonderen Mechanismus geben muß und daß das Drüsenköpfchen dabei eine Rolle spielt war ihm durchaus klar. Die hohe Golgi-Aktivität im Köpfchen, die Poren in der Cuticula und nicht zuletzt die hohe Spezialisierung der Drüsenzellen von *Drosera* im Allgemeinen machen einen Zusammenhang der Drüsenköpfchen mit der Stoffaufnahme immer wahrscheinlicher. Die Frage ist nun, wie Substanzen in die Zellen aufgenommen werden können. Prinzipiell gibt es folgende drei Möglichkeiten:

- Zunächst durch Permeation durch die Plasmamembran, was einen geeigneten Molekülbau voraussetzt.
- Dann durch spezifischen Transport durch die Plasmamembran mittels Membranproteinen, also mit Hilfe von Carriern und ATPasen
- Und schließlich durch Endocytose, bei der sich Teile der Membran ins Zellinnere hineinwölben. Das Außenmedium kommt ins Innerer dieser Wölbungen zu liegen. Dann schnürt sich die Membran ab und bildet einen Vesikel, der dann mit anderen Zellkomponenten verschmelzen kann. Das

Außenmedium jedenfalls kommt auf diesem Wege als Vesikelinhalt in die Zelle.

Dieser Mechanismus der Endocytose ist in tierischen Zellen gut erforscht und sehr häufig, bei erwachsenen und ausdifferenzierten Pflanzenzellen aber nur in Ausnahmefällen beobachtet worden. Daß die Drüsenköpfchen von *Drosera* Substanzen aufnehmen ist, wie ich aufgezeigt habe, schon oft beschrieben worden. An die Möglichkeit einer Stoffaufnahme in Form von Endocytose hat man wahrscheinlich gedacht, sich damit aber nicht weiter auseinandergesetzt. Wie Outenreath und Dauwalder (1985) bewiesen haben, zeigen die apikalen Zellen der äußeren Drüsenreihe die höchste physiologische Aktivität. In dieser Region sind auch die meisten Cuticularporen gefunden worden. Genau an dieser Stelle vermute ich eine Möglichkeit zur Stoffaufnahme durch Endocytose. Es gilt nachzuweisen, ob Stoffe auf diese Weise in die Tentakel eindringen können. Diesem Problem möchte ich nun mit einem Endocytosemarker, also einer Substanz, die nicht frei durch die Membran permeieren kann, auf den Grund gehen. Zuvor aber noch einige wichtige Punkte, die den Vorgang der Endocytose verdeutlichen sollen.

4. Endocytose

4.1 Der Vorgang der Endocytose

Wenn an der Plasmamembran durch deren Einstülpung Partikel ins Innere der Zelle gebracht werden, spricht man von Endocytose. Sie ist formal gesehen die Umkehrung der letzten Exocytose-Schritte, bei der Golgi-Vesikel mit der Plasmamembran verschmelzen und auf diesen Weg verschiedene Substanzen aus der Zelle schaffen können. Bei der Endocytose wölbt sich die Plasmamembran ein und damit kann das Außenmedium in diese Grube vordringen. Die Membran löst sich dann schließlich als Vesikel ab. Diese Vesikel beinhalten nun die jeweiligen Substanzen und können weitertransportiert werden. Meist kommt es zu einer Verschmelzung dieser Endocytose-Vesikel mit primären Lysosomen. Die dabei entstehenden Kompartimente können zu ihren jeweiligen Bestimmungsorten wandern.

Zellen höherer Pflanzen zeigen normalerweise nur selten Endocytose-Aktivität. Einer der Hauptgründe dafür liegt in den festen Zellwänden. Aber dennoch spielt diese Form der Stoffaufnahme auch bei Pflanzen eine wichtige Rolle. Trotzdem wurde die Endocytose hauptsächlich in tierischen Zellen beschrieben. Stark ausgeprägt ist Endocytose bei Protozoen und bestimmten Zellen von Metazoen. Dabei werden die aufzunehmenden Teilchen zunächst an der Außenseite der Membran durch spezifische Erkennungsmerkmale gebunden und gemeinsam mit ihnen durch Endocytose internalisiert (siehe Kap. 4.2.)

4.2. Endocytoseformen

Eine grobe Einteilung der Endocytose erfolgt in zwei Typen: Einerseits die Phagocytose, andererseits die Pinocytose. Diese beiden Begriffe kommen aus dem Untersuchungsbereich von tierischen Organismen und unterscheiden sich im wesentlichen nicht grundsätzlich voneinander. Von der Phagocytose spricht man bei der Aufnahme von festen Stoffen in die Zelle, während bei der Pinocytose flüssige Substanzen einverleibt werden.

4.2.1. Phagocytose

Die Phagocytose beschreibt die Aufnahme von festen Substanzen, dementsprechend wird sie in der Literatur auch oft als „cell eating“ bezeichnet. Sie findet meist in tierischen Zellen statt, wie bei Leucocyten, verschiedenen Protozoen oder Amöben. Die Feststoffe werden nach der Berührung mit der Plasmamembran von dieser umschlossen und als Phagosom ins Innere der Zelle gezogen. Die Vesikel haben einen Durchmesser von mehr als 0,5 μm . Die Vesikelmembran kann den Festkörper ganz eng umschließen oder zusätzlich Flüssigkeit aufnehmen.

Die Plasmamembran hat in dem Bereich, in dem Phagocytose stattfindet, eine im Vergleich zur übrigen Membran veränderte biochemische Zusammensetzung, vor der Abschnürung der Endocytosevesikel kann sich die Plasmamembran nämlich verändern, indem in diesem Bereich bestimmte Membrankomponenten, wie z. B. Membranrezeptoren, akkumuliert werden (Ulsamer et al., 1971).

4.2.2. Pinocytose

Kommt es zur Aufnahme verschiedener flüssiger Medien durch Endocytosevesikel, spricht man von Pinocytose. Der Begriff „cell drinking“ ist so verständlich. Die Flüssigkeiten können Lösungen oder Suspensionen sein und aufgenommen werden. Bei der Pinocytose wird weiters in die „fluid-phase endocytosis“ und in die „absorptive endocytosis“ unterschieden. Während der „fluid phase endocytosis“ werden Flüssigkeiten oder Ähnliches unspezifisch, also nur aufgrund ihrer Anwesenheit im Außenmedium aufgenommen. Im Gegensatz dazu müssen bei der „absorptive endocytosis“ Stoffe aktiv an die Plasmamembran binden, um in die Zelle aufgenommen zu werden (Robinson und Hilmer, 1990).

Die absorptive Endocytose kann äußerst spezifisch ablaufen, wenn spezielle Liganden an bestimmte Rezeptoren binden und damit die Invagination induzieren. In diesem Falle spricht man von einer „receptor mediated endocytosis“. Der aufgenommene Stoff wird als Ligand-Rezeptor-Komplex in Vesikel gepackt (Robinson und Hilmer, 1990).

Auf der anderen Seite konnte man auch eine weniger spezifische absorptive Endocytose beobachten, wo der Ligand unterschiedlich sein kann und dementsprechend weniger selektiv an den Rezeptor bindet. Diese Endocytoseform wird als „constitutive endocytosis“ bezeichnet. Ein Beispiel dafür ist das Binden des Kations Ferritin an ein Anion der Plasmamembran (Benga 1985).

Vor allem bei der „receptor mediated endocytosis“ zeichnen sich die Endocytosevesikel durch eine charakteristische Hülle aus und werden als „coated vesicles“ bezeichnet.

4.3. Coated Vesicles

Bei Protozoen und vielen anderen Zellen des Tierkörpers spielt Endocytose eine wichtige Rolle. Nahrungspartikel werden phagocytiert; Makromoleküle, Peptidhormone, Lipoproteinpartikel und sogar Viren werden zunächst durch spezifische Rezeptoren an der Außenseite der Membran festgehalten und zusammen mit den Rezeptoren als sogenannte „coated vesicles“ in Lysosome verlagert.

„Coated vesicles“ finden sich auch in Pflanzenzellen relativ häufig. Sie gehören mit einem Durchmesser von ca. 50 - 100 nm zu den kleinsten Kompartimenten der Zelle. Ihr auffälliges, aus Fünf- und Sechsecken gebildetes Membranskelett, der „coat“, wird von dem Strukturprotein Clathrin gebildet. Die Bildung von „coated vesicles“ wird durch die Anlagerung von Clathrin an der Innenseite der Plasmamembran in Form eines Wabenmusters eingeleitet. Das Clathrinmolekül bildet ebene oder polygonale Verstrebungsmuster an der Membran und umgibt die abgeschnürten Membranbereiche wie ein Netz (Morris et al., 1989). Solche Bezirke werden als „coated membranes“ oder nach der Einsenkung der Membran als „coated pits“ bezeichnet. Es sind entsprechend des Vorganges der Endocytose relativ kurzlebige Strukturen. Immerhin können in Pflanzenzellen bis zu 7 % der Innenseite der Membran von Clathrin-Polygonen besetzt sein. Während der „receptor mediated endocytosis“ werden immer „clathrin coated vesicles“ gebildet, sie können aber auch im Rahmen der „fluid phase endocytosis“ ins Zellinnere abgeschnürt werden (Thanchak et al., 1984; Owen et al. 1991).

4.4. Die Endocytose als Membranrecycling

Bei der Endocytose werden also extrazelluläre Materialien in Form von kleinen Vakuolen oder Vesikeln ins Zellinnere aufgenommen. Dabei wölbt sich die Plasmamembran durch Invagination ins Cytoplasma, füllt sich mit dem Außenmedium und trennt sich dann vollständig von der restlichen Membran ab. Dadurch können Lösungen, Flüssigkeiten und auch feste Stoffe in die Zelle transportiert werden.

Neben der Aufnahme von Fremdstoffen in die Zelle, kommt es dementsprechend auch zu einer Verkleinerung der Plasmamembranfläche. Dieser Vorgang ist vor allem dann sinnvoll, wenn es durch Exocytose während intensiver Exkretionsvorgänge zu einem erhöhtem Membraneinbau in die Plasmamembran gekommen ist. So wird auch verständlich, warum die Endocytose als wichtiger Bestandteil des Membranrecyclings gesehen wird.

Das Phänomen der Endocytose im Dienste des Membranrecyclings ist vor allem im tierischen Bereich von Bedeutung. Steinman hat auf diesem Gebiet fundamentale Forschungsarbeit geliefert (Steinman et al., 1976). Sie konnte mit ihrer Arbeit die unglaublichen Ausmaße der Endocytose aufzeigen: Bei Mausfibroblasten wurde das „einverleibte“ Membranmaterial auf ein 0,5faches der Zelloberfläche pro Stunde eingeschätzt. Ein besonderes Extrem stellt *Acanthamoeba* dar. Pro Stunde wird hier ein 10 bis 40faches Äquivalent der Zelloberfläche durch Endocytose verbraucht (Steinman et al., 1976). Trotz dieses Prozesses kam es zu keiner Reduktion der Zelloberfläche, was bedeutet, daß das Membranmaterial in einer dementsprechenden Rate ersetzt werden muß. Es wird angenommen, daß eine erneute Synthese von Membranbestandteilen in diesen Geschwindigkeiten nicht erfolgen kann. In diesem Zusammenhang hat man herausgefunden, daß die Halbwertszeit von Membranproteinen mit 10 bis 100 Stunden relativ hoch ist. Durch Enzymmarkierung konnte man die langsame Degradation der meisten Membranproteine verfolgen (Morré et al., 1979).

4.5. Endocytose bei *Drosera capensis*

Wie ich in dem Kapitel Drüsencytologie schon dargelegt habe, wäre es möglich, daß die äußeren Drüsenzellen des Köpfchens von *Drosera* Endocytose betreiben, um die aufgeschlossenen Nahrungspartikel in die Zelle zu transportieren. Nachdem diese Zellen einerseits für die Aussonderung des Fangschleimes und der Verdauungsenzyme, sowie andererseits für die Aufnahme der überschüssigen Schleimprodukte und der Nahrung verantwortlich gemacht werden, liegt diese Vermutung nahe. Um der Sache auf den Grund zu gehen, habe ich meine Versuche mit einem Endocytosemarker durchgeführt. Das ist eine Substanz, die nicht frei durch die Membran permeieren kann, sondern nur durch Endocytose, also verpackt in Vesikel, in die Zelle gelangt. In diesem Fall handelt es sich folglich um eine „fluid phase endocytosis“ und der Endocytosemarker ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit dem Namen Lucifer Yellow.

5. Der Endocytosemarker Lucifer Yellow CH

5.1. Die Notwendigkeit eines Endocytosemarkers

Um beobachten zu können, welche Teile der Drosera-Tentakel für eine Stoffaufnahme verantwortlich sein könnten, war es notwendig ein geeignetes Reagens zu finden, einen Endocytosemarker. Diese Art von Substanzen, die nachweislich nur durch Endocytose in die Zelle gelangen können, ist schon relativ lange bekannt. Auf dem Gebiet der Insektivoren wurden sie meines Wissens allerdings noch nicht eingesetzt. Seit Darwin über das Phänomen der Aggregation und das Wesen der Insektivoren im Allgemeinen berichtet hat, ist die Wissenschaft nicht bedeutend weitergekommen. Es gibt zwar unzählige Untersuchungen über die Reizung der Pflanzen, über Fallmechanismen, Fangschleimzusammensetzung usw.; über die Stoffaufnahme allerdings ist seit Oudman (1936) nicht mehr viel veröffentlicht worden. Ein Endocytosemarker würde es mir ermöglichen, eine Tätigkeit der Zellen im Sinne einer aktiven Aufnahme zu beobachten und die Lokalisation und Dynamik der Absorption von zellfremden Substanzen zu beobachten und zu analysieren.

5.2. Die Anwendung von Lucifer Yellow CH

Einen Großteil meiner Versuche habe ich mit dem Fluoreszenzfarbstoff Lucifer Yellow CH durchgeführt. LYCH wurde zunächst vor allem in Versuchen mit tierischen Zellen verwendet. Im Bereich von pflanzlichen Material sind es primär die Arbeiten von Oparka, die gezeigt haben, daß LYCH hervorragende Ergebnisse auf dem Gebiet der Lichtmikroskopie liefert (Oparka 1988, 1990; Wright and Oparka 1989).

Die notwendigste Voraussetzung für einen Endocytosemarker ist, daß es ihm nicht möglich ist, die Plasmamembran durch passive Diffusion zu durchdringen. LYCH hat zwei negativ geladene Sulfonsäuregruppen, die es dieser Substanz nicht erlauben, durch die Plasmamembran zu permeieren (Steward 1981). Ein weiterer Vorteil besteht in der Tatsache, daß sich dieser Farbstoff als weitgehend ungiftig für das Plasma erwiesen hat, und das auch bei relativ hohen Konzentrationen.

Dieser Farbstoff würde also Vitaluntersuchungen an *Drosera* möglich machen. Weiters handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, was bedeutet, daß bei Anregung im UV-Bereich, ein gelbes Licht emittiert würde. Gerade dieses gelbe Emissionslicht würde sich bei *Drosera capensis* von der Autofluoreszenz (siehe Versuche) deutlich abheben.

5.3. Die Aufnahme von LYCH in pflanzliche Zellen

Die starken negativen Ladungen, die lipophoben Eigenschaften und der geringe pK_s -Wert der Disulphonatgruppen sind der Grund dafür, daß LYCH theoretisch impermeabel für Membranen ist (Steward 1981). Dementsprechend kann LYCH nicht passiv in die Zelle aufgenommen werden, sondern muß aktiv – in Vesikel verpackt – durch die Membran transportiert werden und wird dadurch ein perfekter Endocytosemarker.

Erstmals konnte Miller im Jahr 1983 die Impermeabilität von LYCH für biologische Membranen nachweisen. Daraufhin wurde dieser Farbstoff in zahlreichen Untersuchungen vor allem auf dem Gebiet der „fluid phase endocytosis“ verwendet.

Erst 1988 haben Oparka und Prior gezeigt, daß LYCH auch für die Anwendung an Pflanzen geeignet ist. Eigentlich wollten sie mit diesem Farbstoff den apoplastischen Transport in Wurzelzellen analysieren. Ihre

Beobachtungen haben allerdings gezeigt, daß LYCH eben durch Endocytose in die Zellen gelangt. Ein Durchkreuzen des Caspary'schen Streifens ist der Substanz weder auf dem symplastischen, noch auf dem apoplastischem Wege möglich gewesen. Dadurch haben sie bewiesen, daß LYCH nur durch die aktive Aufnahme der Endocytose die Membran passieren kann.

Da LYCH auch nicht in den Zellen abgebaut wird, wollte ich es als Analogon zu den tierischen Substanzen verwenden, die natürlicherweise von den Drosera- Drüsententakeln aufgenommen werden; dadurch konnte ich die Möglichkeit der Aufnahme, der Ausbreitung und des Transportes im apoplasmatischen und symplastischen Raum analysieren.

II. Teil: Material und Methoden

1. Versuchsmaterial

Nach anfänglichen Versuchen mit *Drosera alba* und *Drosera rotundifolia* haben wir uns für den südafrikanischen Vertreter *Drosera capensis* entschlossen. Die Begründung dafür liegt vor allem in den langen, einheitlich mit Tentakel besetzten Blättern, der langen Vegetationsperiode und nicht zuletzt darin, daß für bisherige Untersuchungen ebenfalls *Drosera capensis* sehr häufig verwendet worden ist.

2. Kultivierung

Unsere Pflanzen stammen fast alle aus der Gärtnerei der Bundesersatzgärten Schönbrunn. Die durch Wurzelvermehrung gezogenen Pflanzen wurden im Kalthaus verwahrt und uns dankenswerter Weise im erwachsenen Zustand überlassen. An unserem Institut brachten wir die Pflanzen in einem umgewandeltem Terrarium unter. Saure Torferde und ausschließlich destilliertes Wasser bewirkten das notwendige saure Milieu. Eine automatisch geschaltete Pflanzenlampe half uns durch die dunkle Jahreszeit. Auf diese Weise vermehrten sich die „Drosen“ fortlaufend und lieferten uns ständig einheitliches Versuchsmaterial. Allerdings muß ich hinzufügen, daß die Vitalität und physiologische Fitneß regelmäßig im Dezember nachließ und somit eine Versuchspause von ca. drei Monaten bis März notwendig war. Während dieser Zeit änderte unser Versuchsmaterial, abgesehen von verminderter Schleimabgabe, zwar nicht das Aussehen, allerdings wiesen die herabgesetzte Anthocyanbildung in den Tentakeln, sowie die allgemeine physiologische Reaktionsträgheit auf eine Ruhepause im Vegetationszyklus

hin. Um möglichst einheitliche Bedingungen für unsere Versuche zu schaffen, vermieden wir dementsprechend diese Zeit.

3. Präparation der Blätter

Man kann das Drosera-Blatt in drei Abschnitte gliedern: Den untersten basalen Abschnitt, der die ältesten Tentakel trägt; jenen Abschnitt in der Mitte des Blattes; und schließlich die Blattspitze, die am längsten eingerollt auch die jüngsten Tentakel trägt.

Ich habe für meine Versuche jene Blätter gewählt, die entweder gerade „fertig“ entfaltet waren, oder bei denen die Blattspitze noch gerade ein wenig eingerollt war. Außerdem habe ich darauf geachtet, daß zumindest die untersten Tentakeln satte Sekrettröpfchen auf ihren Köpfchen trugen. Auf diese Weise konnte ich davon ausgehen, daß ich gesundes, vitales und vor allem relativ einheitliches Material zur Verfügung hatte.

Die Blätter wurden vorsichtig mit einer Schere von der Mutterpflanze entfernt und sofort in eine Schale mit a. dest. überführt. Ein Problem, daß sich dabei oft ergab war jenes der Tentakelkrümmung. Bei mechanischer Reizung klappen die Tentakel sofort zusammen und eine Beobachtung, ohne diese mit brutalen Mitteln wieder auseinanderzuklappen, war unmöglich geworden. In einem solchen Fall blieb nichts anderes übrig, als das Blatt in einer möglichst großen Schale mit a. dest. solange schwimmen zu lassen, bis sich die Tentakel wieder ausbreiteten. Dieser Vorgang konnte zwar einige Stunden in Anspruch nehmen, trotzdem änderte er nichts an der Vitalität des Blattes.

4. Lucifer Yellow CH als Hauptreagens

4.1. Der Chemismus von LYCH

Lucifer Yellow CH (LYCH) ist ein 3,6-disulphonat 4-aminonaphtalimid, dessen Stickstoff mit einem $\text{CH}_6\text{N}_3\text{O}$ -Rest verbunden ist. Es handelt sich dabei um ein Heterocyclin aus drei Cyclohexylringen. Zwei dieser Ringe besitzen konjugierte Doppelbindungen. Im dritten Ring steht in der Ersten Position anstelle des Kohlenstoffatoms eine Stickstoffatom, dessen benachbarte Kohlenstoffatome mit je einer Oxogruppe verbunden sind. Die anderen Ringe haben an ihren randständigen Kohlenstoffatomen in Position 5 und 9 eine SO_3^- Gruppe gebunden, und in Position 8 ist das Kohlenstoffatom mit einer Amino (NH_2)-Gruppe substituiert.

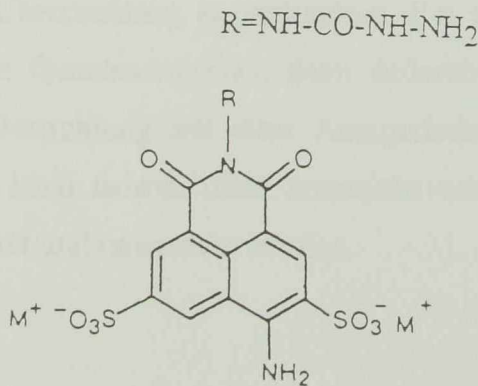


Abb.: Formel LYCH

LYCH ist im allgemeinen eine relativ reaktionsträge Substanz. Seine freie Hydrazidgruppe kann allerdings bei Raumtemperatur mit aliphatischen Aldehyden reagieren (Steward 1981). Die Dissoziationskonstante der Verbindung liegt bei $7 \cdot 10^{-11}$ und macht LYCH in Fetten unlöslich. Dagegen

ist LYCH in Wasser löslich und bleibt für mehrere Monate in Lösung stabil. Da die Verbindung ungiftig ist, kann sie für Vitalfärbungen gut verwendet werden.

4.2. LYCH als Fluoreszenzfarbstoff

Der Farbstoff LYCH besitzt Absorptionsmaxima bei 280 nm und 430 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 540 nm. Die Quantenausbeute von 0,25 ist dabei relativ hoch und ermöglicht es somit, auch noch geringe Konzentrationen von Farbstoffen nachzuweisen. Außerdem bleiben die fluoreszierenden Eigenschaften über einen weiten pH-Bereich konstant (Steward 1981).

LYCH wird mit UV-Licht angeregt und zeigt ein gelbes Emissionslicht. Die Fluoreszenz erweist sich als relativ stark, dementsprechend waren immer einige Waschvorgänge mit a. d. notwendig, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen und Überstrahlung zu verhindern. Ein weiterer Vorteil ergibt sich durch die stabile Quantenemission, denn dadurch wird der Farbstoff auch nach längerer Bestrahlung mit dem Anregerlicht kaum ausgebleicht. Das gefärbte Objekt kann nahezu ohne Intensitätsverlust über mehrere Stunden hinweg beobachtet und untersucht werden.

5. Fluoreszenzmikroskopie

Bestrahlt man bestimmte Stoffe mit Licht, so werden sie zur Lichtemission angeregt. Erfolgt diese Lichtemission nur während der Bestrahlung, spricht man von Fluoreszenz. Wird dagegen noch Licht ausgestrahlt, wenn die Bestrahlung schon eingestellt wurde, handelt es sich um Phosphoreszenz. Fluoreszenz und Phosphoreszenz werden unter dem Begriff Lumineszenz zusammengefaßt.

Bei der Fluoreszenz weist das vom fluoreszierenden Stoff ausgesandte Fluoreszenzlicht eine längere Wellenlänge auf, als das zur Bestrahlung verwendete Licht. Diese Erscheinung wird nach ihrem Entdecker Stok'sche Regel bezeichnet. Wenn der Stoff die eingestrahnten Lichtquanten absorbiert, geht deren Energie auf ihn über. Diese Energie kann dann bewirken, daß bestimmte Elektronen in den Atomen des fluoreszierenden Stoffes auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Dort verweilen die Elektronen aber in der Regel nur kurze Zeit. Sie fallen sehr bald auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück und setzen dabei Energie, die von den eingestrahnten Lichtquanten stammt, in Form von Lichtstrahlung frei. Bei diesem Vorgang wird aber nicht die gesamte eingestrahlte Energie wieder in Form von Licht abgegeben, da ein Teil davon beim Wechsel der Energieniveaus in andere Energieformen übergeht. Wenn nun beim Zurückfallen der Elektronen die frei werdenden Lichtquanten eine geringere Energiemenge als die eingestrahnten aufweisen, muß das emittierte Fluoreszenzlicht eine kleinere Frequenz als das eingestrahlte Licht haben.

Weisen bestimmte Objekte Strukturen auf, die bereits von sich aus Fluoreszenzlicht bei geeigneter Bestrahlung emittieren, spricht man von Primärfluoreszenz oder Eigenfluoreszenz.

Es besteht aber auch die Möglichkeit, nicht fluoreszierende Strukturen mit Farbstoffen anzufärben, die ihrerseits fluoreszenzfähig sind. Man spricht dann von Fluorochromierungen, wobei es sich um Sekundärfluoreszenz handelt.

5.1. Das Fluoreszenzmikroskop

Nachdem ich mich fast ausschließlich mit fluoreszierenden Substanzen beschäftigt habe, war das Fluoreszenzmikroskop mein Hauptinstrument. Da bei der Fluoreszenz das emittierte Licht langwelliger als das eingestrahlt ist, wird zur Beleuchtung des Präparates vornehmlich kurzwelliges Licht benutzt, nämlich Blau, Grün oder wie in meinem Fall langwelliges Ultraviolett. Die gewünschten Farben werden durch Erregerfilter aus dem von der Lichtquelle abgegebenen Licht isoliert.

Das Erregerlicht kann auf verschiedenen Wegen in das Präparat geleitet werden, wo es die Fluoreszenz auslöst. Das dabei emittierte Licht ist erheblich lichtschwächer als das eingestrahlt Erregerlicht. Wenn man das Fluoreszenzlicht wahrnehmen will, muß das Erregerlicht absorbiert werden, nachdem es seinen Zweck erfüllt hat. Das geschieht mit dem Sperrfilter.

In meinem Fall handelt es sich beim Weg des Fluoreszenzlichtes um eine Auflicht-Hellfeldanregung. Bei der Auflichtanregung wird das Erregerlicht durch das Mikroskopobjektiv auf das Präparat geschickt. Das Objektiv fungiert somit gleichzeitig als Kondensor. Daher ist die Auflichtfluoreszenzerregung besonders einfach einzustellen. Da das Objektiv zugleich als Kondensor fungiert, entfallen alle sonst notwendigen Zentrierungen am Kondensor. Weiterhin wird bei Auflichtfluoreszenz das Präparat intensiv mit Erregerlicht bestrahlt, was zu besonders hellen Fluoreszenz führt. Dabei ist auch der Kontrast ausgezeichnet, da von dem Erregerlicht nur ein sehr kleiner Teil ins Objektiv zurückkehrt. Außerdem trifft das Erregerlicht direkt auf die Präparatoberfläche und es kommt dort zur stärksten Fluoreszenz. Dieses Fluoreszenzlicht gelangt ohne jede weitere Beeinträchtigung ins Objektiv und das ist besonders für dickere Objekte, wie bei meinen Drosera-Tentakel, von großem Vorteil.

Ich habe mit einem Nikon-Labophot gearbeitet, das mit einer Xenon XPS100 Lichtquelle ausgestattet ist. Dabei habe ich für die LYCH-Anregung einen DM 400nm-Filterwürfel von Nikon verwendet

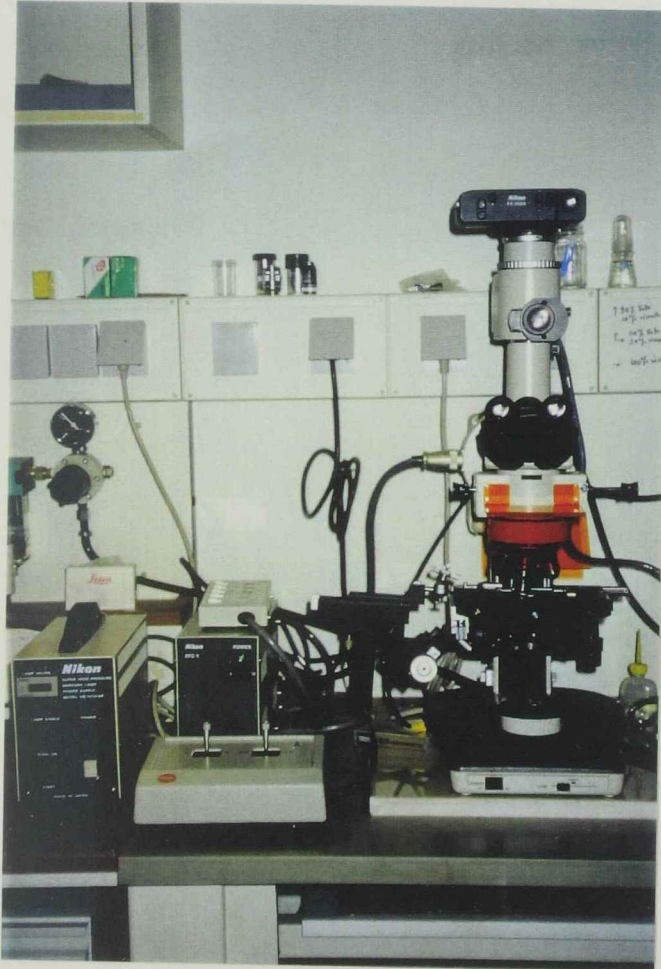


Abb.: Nikon Fluoreszenzmikroskop

6. Dokumentation

Ein Tritubus am Mikroskop machte das Anbringen eines Nikon-Gehäuses mit integriertem Belichtungsmesser möglich. Dementsprechend verwendetet ich zur Dokumentation meiner Arbeit vordergründlich Negativfilme aber auch Positivfilme:

- Kodak Royal 1000
- Agfa Professional 1600
- Fujichrome Sensia 400

III. Teil: Versuche und Ergebnisse

Als canivore Pflanze ist *Drosera capensis* mit der dementsprechenden anatomischen Grundausrüstung ausgestattet. Die wichtigste Funktion in diesem Zusammenhang kann den Tentakeln zugeschrieben werden. Durch die Aussonderung des Fangschleimes durch die Drüsenzellen der Drüsenköpfchen können Opfer angelockt und festgehalten werden, Krümmbewegungen machen ein Entkommen unmöglich und durch die Aussonderung von Verdauungsenzymen werden diese schließlich aufgeschlossen und verdaut.

Eine grobe Gliederung eines solchen *Drosera*-Tentakels in Tentakelstiel und Tentakelköpfchen läßt zunächst vermuten, daß der Tentakelstiel hauptsächlich für die Mechanik und das Tentakelköpfchen großteils für die physiologischen Vorgänge verantwortlich ist. Daher habe ich meine Versuche auch in einer Weise angelegt, die eine Trennung der Beobachtung dieser Vorgänge in Drüsenköpfchen und Tentakelstiel möglich machten. Allerdings sollten die Tentakel auch als physiologische und anatomische Einheit bewahrt werden. Das Ziel meiner Versuche bestand ja darin, daß ein natürlicher Schritt, nämlich die Aufnahme von tierischem Eiweiß, nachvollzogen werden sollte.

1. Die Eigenfluoreszenz von *Drosera capensis*

Die Voraussetzung beim Arbeiten mit einem Fluoreszenzfarbstoff besteht im Verständnis des prächtigen Farbenspieles, das einem oft beim Blick durchs Fluoreszenzmikroskop geboten wird.

Daher möchte ich zunächst auf die Eigenfluoreszenz von *Drosera capensis* eingehen. Wie bereits erwähnt spricht man dann von Eigenfluoreszenz oder Primärfluoreszenz, wenn Strukturen auch ohne Fluoreszenzfarbstoffe zur Lichtemission befähigt sind.

Die Anregung erfolgte mit einem 400nm-Filterwürfel von Nikon, also jene Wellenlänge, die auch für die Lucifer Yellow-Anregung erforderlich ist. *Drosera capensis* zeigt bei Bestrahlung mit dieser Wellenlänge folgende autonome Fluoreszenz:

Zunächst eine rote Fluoreszenz der Chloroplasten, wobei ich in diesem Zusammenhang anführen möchte, daß die Chloroplasten auch bei anderer Anregung, also bei grünem Licht mit 590nm oder blauem Licht mit 520nm eine solche rote Fluoreszenz zeigen (Abb.1, Abb.2).

Weiters eine bläuliche Fluoreszenz der Cuticula, somit zeigt das mikroskopische Bild eine bläuliche Umrandung der Tentakelstiele, des Drüsenköpfchens und der sessilen Drüsen. Man kann auch eine intensive violette Emission entlang den Halskranzzellen beobachten (Abb.1-6).

Zuletzt eine gelbe Fluoreszenz der kleinen, kugeligen Speichervakuolen, die sich mit Brown'scher Bewegung im Zellsaft der Parenchymzellen bewegen.

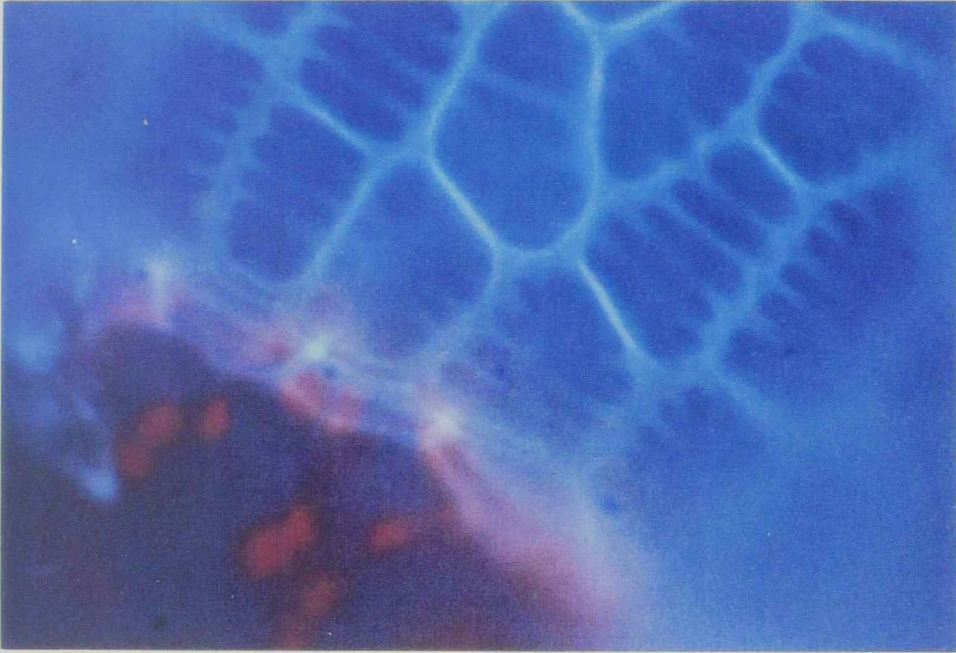


Abb.1: *Drosera capensis* x 1400, Basis des Drüsenköpfchens, Eigenfluoreszenz, 420nm

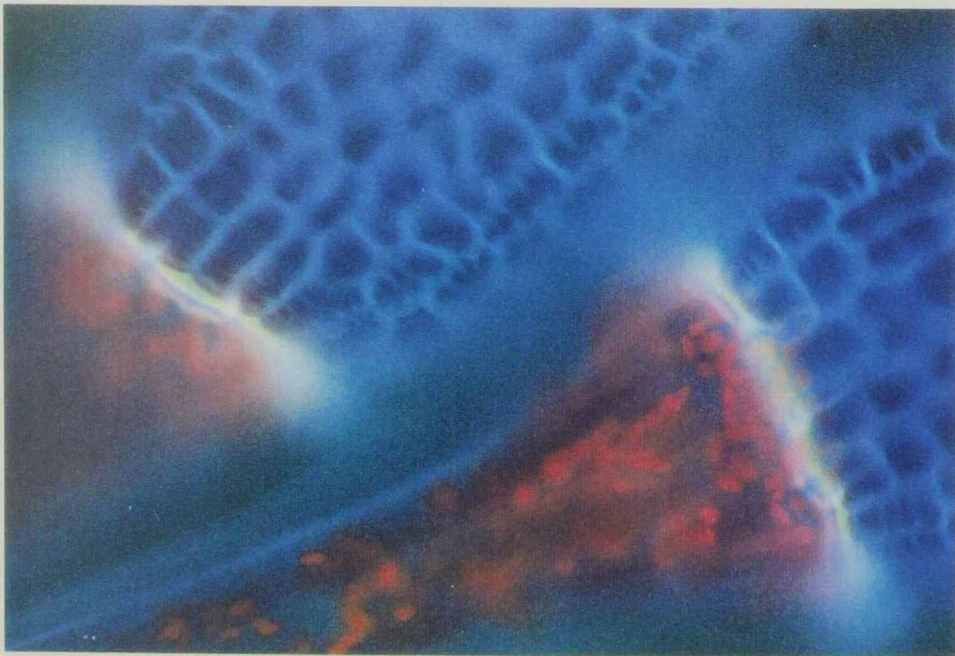


Abb.2: *Drosera capensis* x 600, Basis des Drüsenköpfchens und oberer Tentakelstiel, Eigenfluoreszenz, 420nm

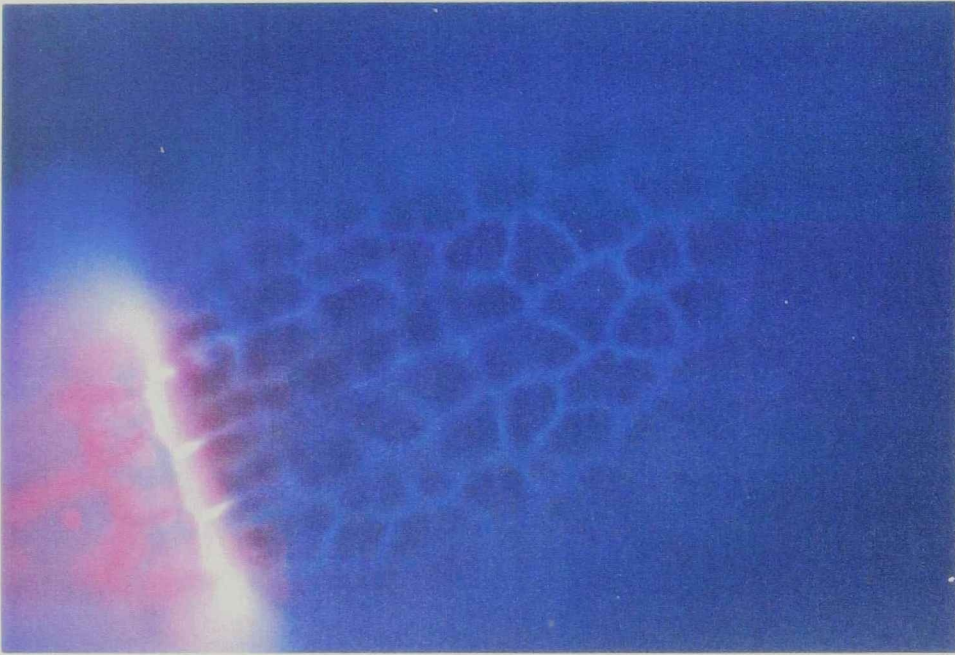


Abb.3: *Drosera capensis* x 600, Drüsenköpfchen,
Eigenfluoreszenz, 420nm

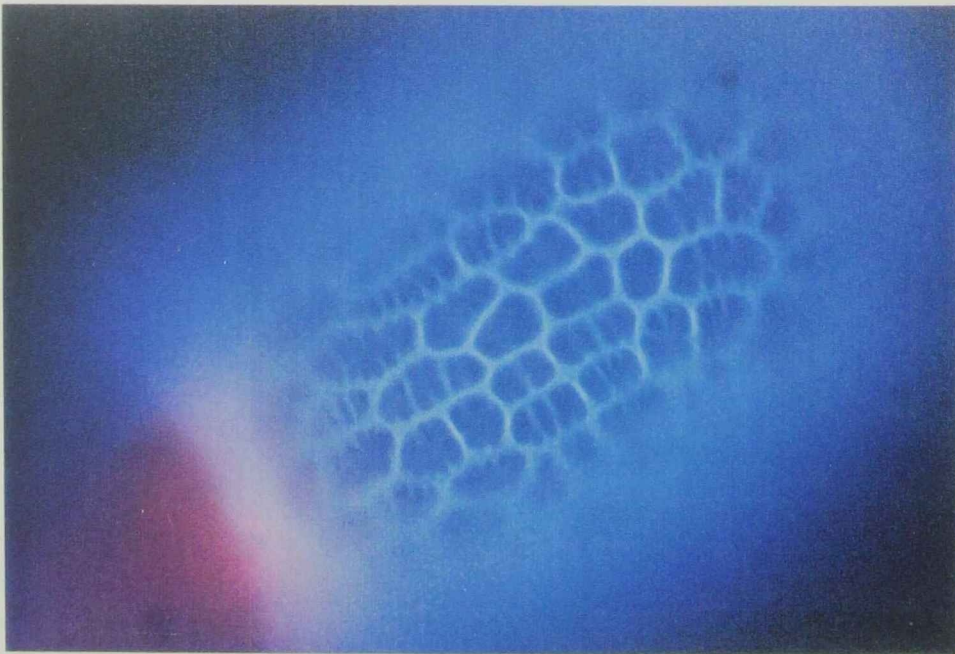


Abb.4: *Drosera capensis* x 600, Drüsenköpfchen,
Eigenfluoreszenz, 420 nm



Abb.5: *Drosera capensis* x 600, Tentakelbasis, sessile Drüsen und Chloroplasten in Eigenfluoreszenz, 420nm



Abb.6: *Drosera capensis* x 1400, sessile Drüse am Blattgrund, Eigenfluoreszenz, 420 nm

2. Die Aufnahme von Lucifer Yellow in *Drosera capensis*

Mit dieser Versuchsreihe konnte ich die Aufnahme von Lucifer Yellow in die verschiedenen Zellensorten der *Drosera*-Blätter beobachten. Die Frage war, ob Endocytose überhaupt möglich ist und wie bzw. wo Substanzen in den Tentakel dringen können.

Daß die Drüsenköpfchen von *Drosera* Substanzen aufnehmen ist schon oft beschrieben worden. Allerdings hat man sich in diesem Zusammenhang nie mit Endocytose beschäftigt. Sollte *Drosera* Aufnahmevesikel bilden, dann wird Lucifer Yellow als Membran impermeable Substanz aufgenommen und fluoreszieren. Die Lokalisation und die Kinetik, sowie die Größe und Dynamik der Endocytosevesikel können auf diese Weise erforscht werden. Ich wollte damit im wesentlichen jenen natürlichen Schritt der Pflanze nachvollziehen, bei dem die aufgeschlossenen Eiweißverbindungen zur Verdauung in das Blatt gelangen. Auf diese Weise sollte ich herausfinden, welche Teile des Tentakels zur Endocytose befähigt sind, und somit einen Hinweis erhalten, wie die Pflanze Stoffe aus der Umwelt aufnehmen kann und welche Organe dabei involviert sind.

2.1. Endocytose in den Tentakeln von *Drosera capensis*

In diesem ersten Teil meiner Arbeit präparierte ich die *Drosera*-Blätter auf verschiedene Arten und konnte sie so dem Endocytosemarker Lucifer Yellow unterschiedlichst zugänglich machen. Ich ging davon aus, daß es vor allem die Drüsenzellen des Köpfchens sind, die Endocytose betreiben, da hier auch im elektronenmikroskopischen Bild zahlreiche Microporen zu sehen sind, und somit der Stoff aus der Umgebung relativ leicht zur Plasmamembran gelangen kann. Die ersten Versuche zeigten sofort eine deutliche Aufnahme von Lucifer Yellow. Der Farbstoff schien in kleinste Vakuolen verpackt.

2.1.1. Stammlösung

Für alle Versuche hatte ich mir eine Stammlösung von 20mM LYCH in a. dest. vorbereitet. Nachdem der Farbstoff in Wasser sehr stabil ist, konnte ich diese Stammlösung monatelang ohne Probleme im Kühlschrank aufbewahren. Bei den ersten Endocytoseversuchen habe ich diese Stammlösung in einem Verhältnis 1:1 verdünnt und somit eine 10mM Lösung erhalten. Ich konnte aber relativ schnell beobachten, daß bei einer weiteren Verdünnung eine Konzentration von 5mM durchaus ausreicht und keine sichtbaren Unterschiede zu bemerken waren.

2.1.2. Versuchsdurchführung

Die Drosera-Blätter wurden vorsichtig von der Mutterpflanze abgeschnitten und sofort in a. dest. gelegt. Nachdem jede mechanische Reizung der Tentakel zu einer Tentakelkrümmung führt, mußte dieser Vorgang sehr sanft durchgeführt werden. Gekrümmte Tentakel führen einerseits zu einer erschwerten Präparation, andererseits sind sie wahrscheinlich einer der Auslöser für die Aggregation des Plasmas. Da ich für meine Versuche entspannte Zellen, also solche ohne Zerklüftung der Vakuolen, als Voraussetzung sah, wollte ich diese Reaktion unbedingt vermeiden. Kam es trotzdem zu einer Krümmung, bzw. zur Aggregation, blieb nichts anderes übrig als die Blätter solange im Wasser schwimmen zu lassen, bis eine Entspannung eintrat.

Die Blätter wurden dann in ca. 5mm breite Streifen geschnitten. Auf diese Weise entstanden rechteckige Blattpräparate, bei denen sich die Tentakeln an beiden Seiten der Blattränder ausbreiten. Diese Blattabschnitte legte ich dann in eine 10mM LYCH-Lösung ein. Die Blattquerschnitte wurden erst nach der Farbstoffeinwirkung und Reinigung in Wasser halbiert und für die lichtmikroskopische Untersuchung „zurechtgeschnitten“. Auf diese Weise

wollte ich verhindern, daß der Endocytosemarker auf verletzte Zellen trifft, und somit das passive Eindringen ins Gewebe durch tote Zellen möglich wird.

Zunächst wählte ich eine Einwirkungsdauer von 30 Minuten. Nach dieser Zeit konnte ich bereits eine deutliche Aufnahme beobachten. Ich reduzierte dann immer weiter um jeweils fünf Minuten. Ich konnte feststellen, daß eine sichtbare Aufnahme des Endocytosemarkers bereits nach 10 Minuten eintritt. Vor dieser Zeit war die Fluoreszenz nur äußerst schwach und nicht wirklich in einer aussagekräftigen Weise dokumentierbar. Andererseits war oft zwischen einer Aufnahmedauer von 10 Minuten und einer von 30 Minuten auch kein Unterschied festzustellen. Nachdem ich diese Versuche über ein Jahr hinweg durchführte, konnte ich einen Zusammenhang zwischen Vitalität der Pflanzen und ihrer allgemeinen Reaktionszeiten feststellen. In den Wintermonaten war zunächst die Schleimproduktion deutlich herabgesetzt, die Anthocyanbildung war erloschen und die Tentakel krümmten sich sofort bei der kleinsten Bewegung. Neben diesen äußeren Veränderungen konnte ich auch eine deutliche verlangsamte Aufnahme von LYCH feststellen, es kam zu keinen Endocytosekompartimenten, die mit jenen der Sommermonate vergleichbar gewesen wären und nicht zuletzt starben die Zellen relativ bald. Als beste Jahreszeit stellte sich das Frühjahr heraus. Zwischen März und Juli waren die Pflanzen am vitalsten und in einem gesunden Zustand. Diese Zeit wählte ich dann auch aus, um meine Versuche zu dokumentieren. Ich legte eine Einwirkungszeit von jeweils 20 Minuten fest. Dieser Zeitraum reichte für eine vollständige Reaktion aus. Versuche, bei denen ich die Präparate weit über eine Stunde in der Lösung ließ, zeigten auch keine anderen Ergebnisse. Leider stellte es sich als unmöglich heraus, den Endocytosevorgang von Anfang an lichtmikroskopisch zu beobachten. LYCH strahlt so stark, daß es keinen Sinn machte, die Präparate direkt in der Farbstofflösung dem Erregerlicht auszusetzen, und so war es immer erforderlich, die Schnitte vorher gründlich mit Wasser zu waschen. Das bedeutet allerdings, daß ich immer nur die „Ergebnisse“ der Endocytose, nicht aber den Vorgang selbst beobachten konnte.

2.1.3. Versuchsergebnisse

Nach einer Einwirkungsdauer von 20 Minuten und einer Konzentration von 10mM LYCH zeigte sich im Fluoreszenzmikroskop folgendes Bild:

Die sessilen Drüsen

Die sessile Drüsen, sowohl am Tentakelstiel als auch am Blattgrund, und die kleinen gestielten Drüsen am Blattgrund zeigten zwei unterschiedliche Erscheinungsbilder; teilweise sah man nur die bläuliche Fluoreszenz, die auf primäre Fluoreszenz schließen läßt. Hier hat keine Aufnahme stattgefunden.

Andererseits waren auch solche Drüsen zu beobachten, deren Cuticula gelbe Fluoreszenz zeigte. Diese waren entweder mit Farbstoff erfüllt, oder nur gelb umrandet. Diese Unterschiede konnte ich immer wieder beobachten, aber keinerlei Regelmäßigkeiten dabei erkennen. Unabhängig von der Lokalität der Drüsen und vom Zeitpunkt der Versuche schienen sie ohne Begründung einmal LYCH in ihr Inneres aufzunehmen und einmal nicht (Abb. 7-11).

Der Tracheidenstrang

Eine deutliche gelbe Emission zeigte immer der Tracheidenstrang, der sich durch den gesamten Tentakel zieht. Manchmal stärker, manchmal schwächer, war er immer als gelbe Spirale sichtbar. Bei diesem Element des Tentakels vermutete ich eine Transporttätigkeit, die vielleicht ebenfalls zur Verteilung und Leitung des Fluoreszenzfarbstoffes beitrug (Abb. 11+12).

Das Drüsenköpfchen

Im Drüsenköpfchen selbst konnte ich eine gelbe Fluoreszenz der Zellwände erkennen. Diese Emission ging vom Halskranz aus und zog sich über das gesamte Köpfchen (Abb. 13-16). Außerdem waren kleinste Vesikel mit gelbem Inhalt zu beobachten. Ganz anders als vermutet, waren diese kleinen Vesikel in allen Drüsenzellen über das gesamte Köpfchen verteilt. Ich suchte immer wieder nach einer Ansammlung derselben an der Spitze des Köpfchens, also dort, wo auch die Fangschleimproduktion am aktivsten ist und sich auch die meisten Poren befinden. Ich konnte dafür aber keine Anzeichen finden und muß daher davon ausgehen, daß alle Drüsenzellen zur Aufnahme durch Endocytose befähigt sind (Abb. 15).

Der Tentakelstiel

Im obersten Tentakeldrittel konnte ich die heftigsten Reaktionen beobachten: Vor allem die Epidermiszellen waren von kleinen und großen Vesikel mit leuchtend gelbem Inhalt erfüllt. Diese Vesikel waren sehr mobil und schienen sich im Laufe der Zeit zu größeren Strukturen zusammenzuschließen. Zumindestens konnte ich diesen Vorgang einige Male beobachten. Gleichzeitig kam es aber auch immer wieder zur Abgliederung kleiner Kügelchen, sodaß niemals eine „Riesenvakuole“ entstehen konnte (Abb. 17-24).

Abgesehen von diesen Strukturen, die ein mehr oder weniger rundes Erscheinungsbild aufwiesen, kam es zu folgenden Strukturen: Die Vakuolen schienen sich zu Schläuchen auszudehnen, die dann als gelbe längliche Strukturen durch das Plasma wanderten. Diese gelben Schläuche blieben ständig in Bewegung, dehnten sich aus, bis sie wieder in kleine Kügelchen zerfielen, zogen sich zusammen, bildeten Schleifen und andere Strukturen. Die Vesikel und die Schläuche möchte ich gemeinsam als „Lucifer-Yellow

Kompartimente“ bezeichnen. Sie befanden sich im obersten Tentakeldrittel direkt unter dem Köpfchen und zogen sich über ungefähr sieben Zellen bis zur Hälfte des Tentakels hin. Im unteren Tentakelbereich, also nahe der Basis, konnte ich keinerlei LYCH-Kompartimente erkennen (Abb. 17-24).

Neben den leuchtend gelben Strukturen in unterschiedlicher Form kam es auch immer wieder zu einer diffusen Fluoreszenz des Cytoplasmas. Diese konnte relativ stark sein, aber auch äußerst schwach. Aus meinen Beobachtungen konnte ich keine Gründe für diese unterschiedliche Emission erkennen. Außerdem reichte diese Erscheinung weiter in Richtung Tentakelbasis als die Vesikel und Schläuche. Manchmal zog sich die Plasmafluoreszenz durch den gesamten Tentakelstiel, so daß an einen Transport des Farbstoffes gedacht werden muß, der unabhängig von Vesikeln und ER funktioniert (Abb. 25-28).

Nach einer besonders langen Einwirkzeit von LYCH konnte ich eine Verlagerung des Farbstoffes beobachten. Nach 24 h in einer 5mM LYCH-Lösung hatte sich die aufgenommene Substanz in den Parenchymzellen akkumuliert. Die gelbe Emission ging nun nur noch von der großen Zentralvakuole der Parenchymzellen aus, während die Epidermis keine LYCH-Kompartimente mehr zeigte. Im Drüsenköpfchen hatte sich die Zahl der Vesikel vermindert und außerdem waren größere Vesikel zu sehen (Abbildung dazu siehe Diskussion, Kap.2.2.)

Aus diesen ersten Versuchen konnte ich schließen, daß Endocytose in *Drosera* möglich ist, und daß sich Lucifer Yellow als Endocytosemarker und als ein geeigneter Farbstoff für meine Beobachtungen herausgestellt hat. In den Vesikeln und anderen Strukturen im Köpfchen und im Tentakelstiel sah ich den Beweis für die Endocytose. Kein anderer physiologischer Vorgang konnte eine solche Ansammlung des membranundurchlässigen Farbstoffes erklären. Ich konnte aber mit meiner Methode nicht nachweisen, welcher Teil der Tentakel für die Endocytose verantwortlich gemacht werden kann.

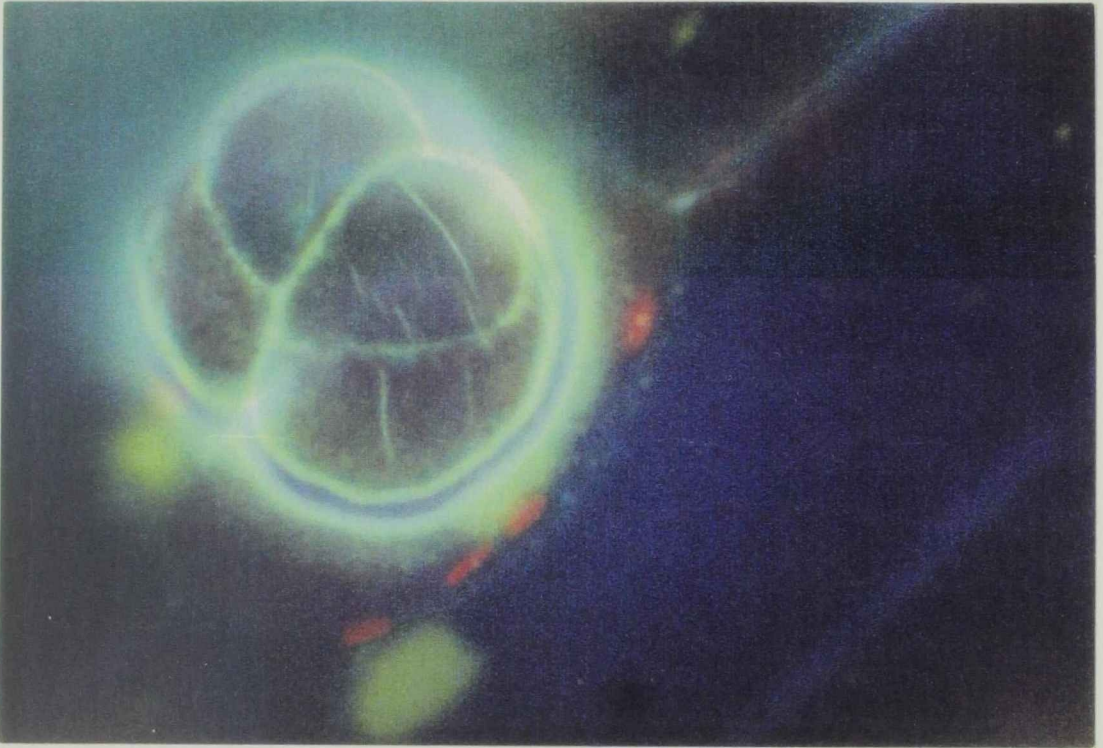


Abb.7: *Drosera capensis* x 1600, sessile Drüsen am Blattgrund nach LYCH-Aufnahme



Abb.8: *Drosera capensis* x 1600, sessile Drüse am Blattgrund nach LYCH-Aufnahme

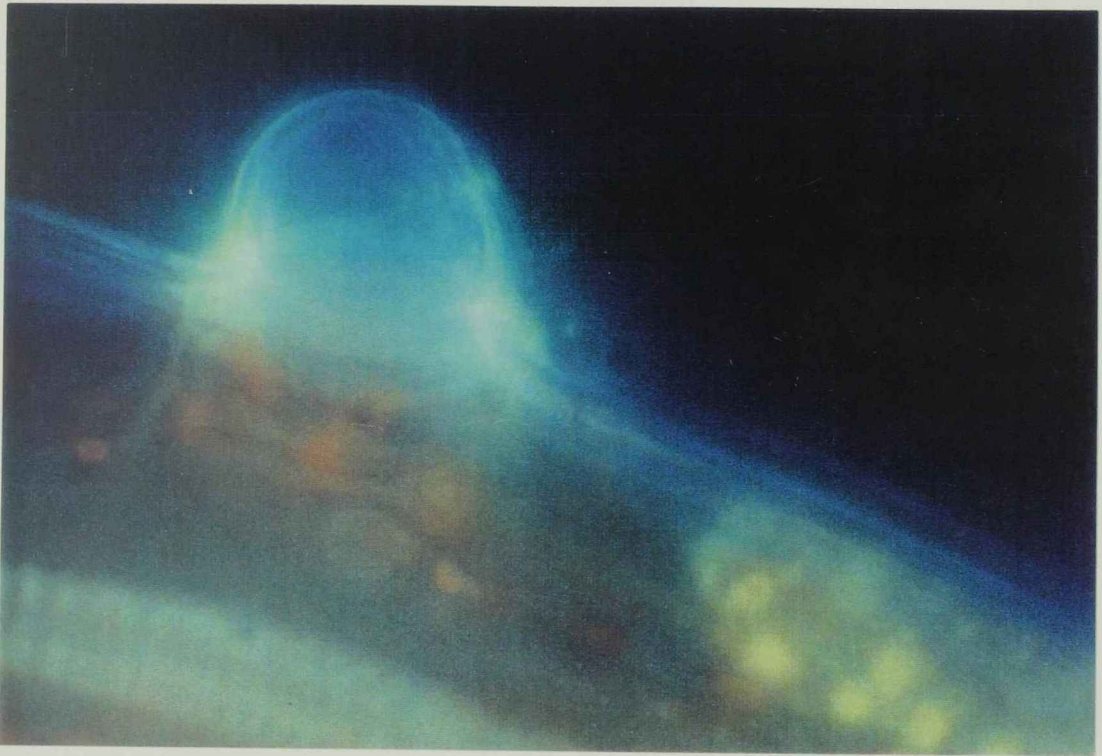


Abb.9: *Drosera capensis* x 1600, sessile Drüsen am Tentakelstiel
nach LYCH-Aufnahme



Abb.10: *Drosera capensis* x 800, sessile Drüse am Tentakelstiel
nach LYCH-Aufnahme

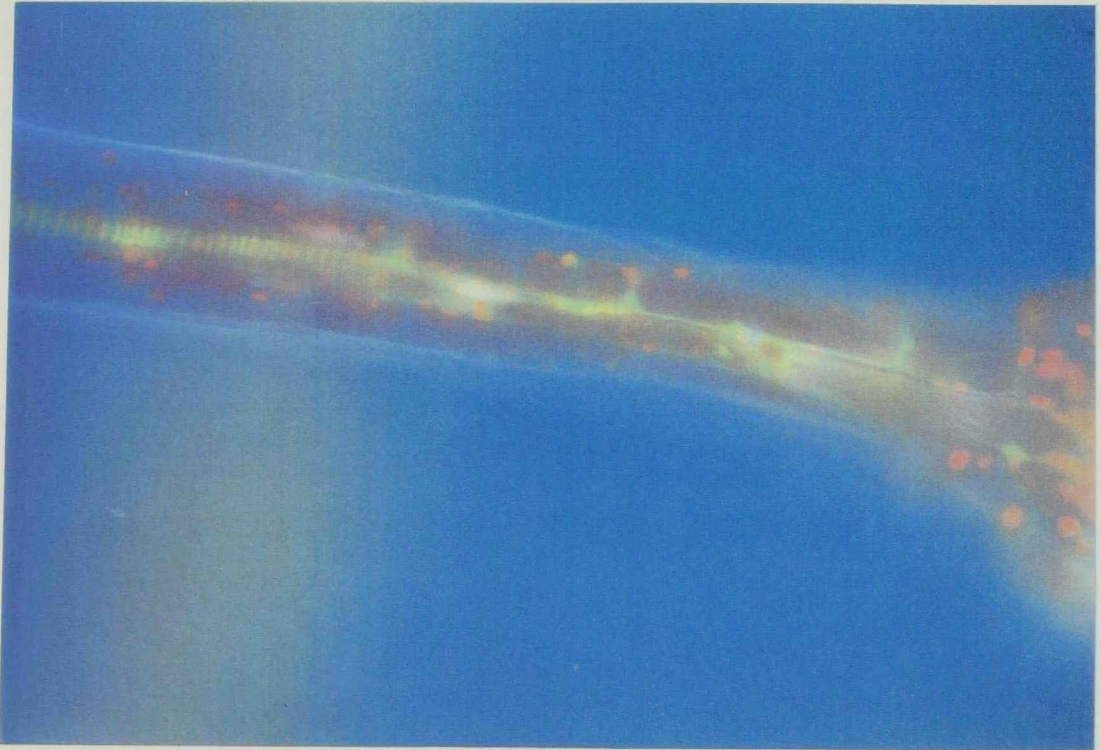


Abb.11: *Drosera capensis* x 800, oberer Tentakelstiel, fluoreszierender Tracheidenstrang und diffuse Plasmafluoreszenz

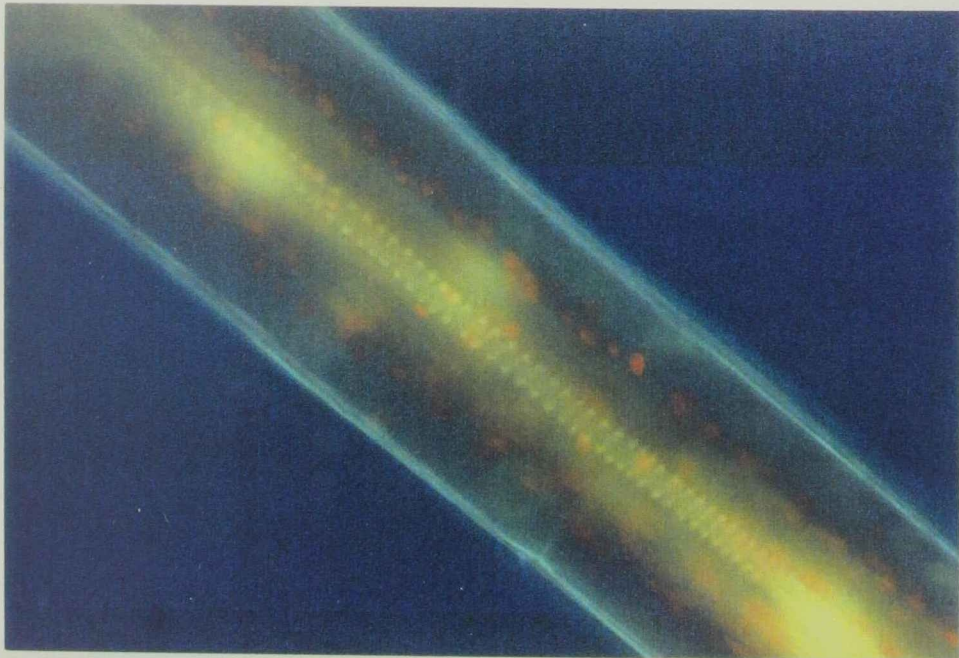


Abb.12: *Drosera capensis* x 600, mittlerer Tentakelstiel, fluoreszierender Tracheidenstrang nach LYCH-Aufnahme

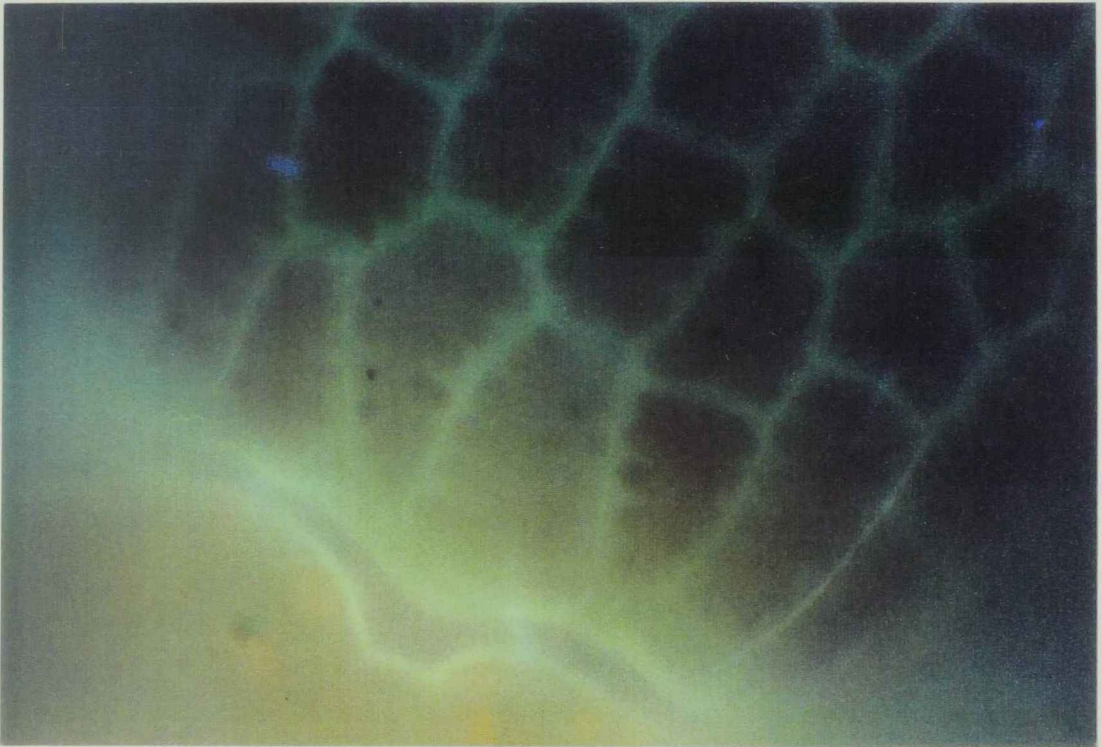


Abb.13: *Drosera capensis* x 1600, Basis des Drüsenköpfchens, fluoreszierender Halskranzbereich und Zellwände nach LYCH-Aufnahme

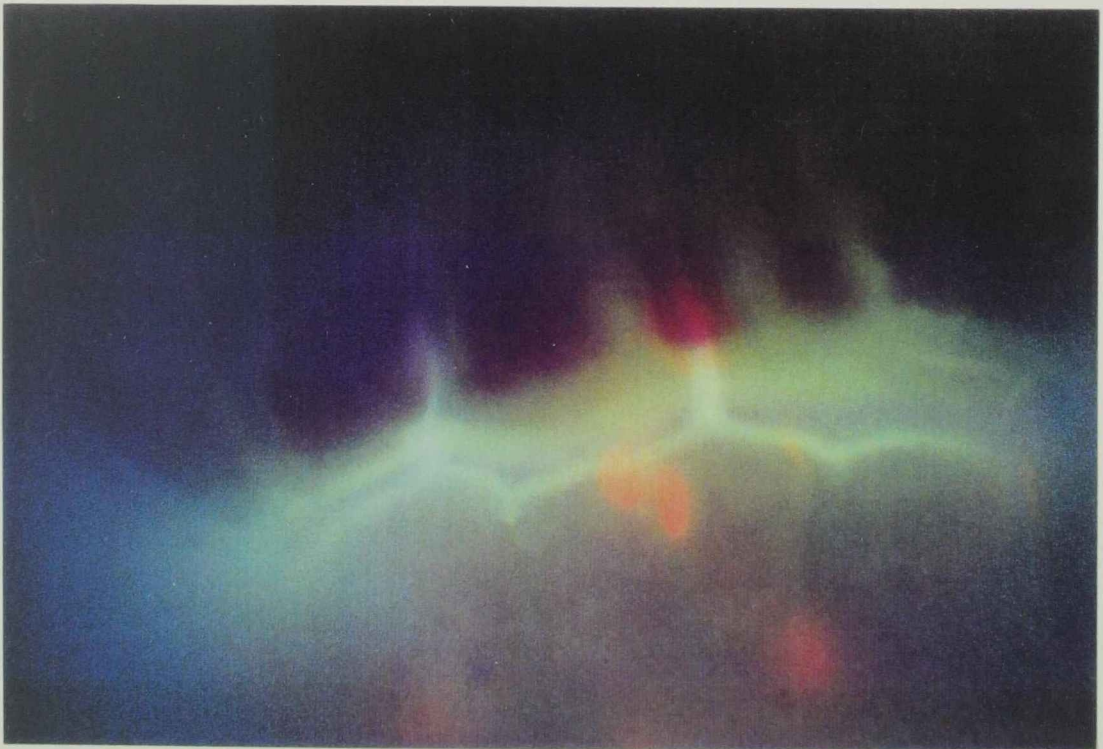


Abb.14: *Drosera capensis* x 1600, Basis des Drüsenköpfchens mit fluoreszierendem Halskranz nach LYCH-Aufnahme

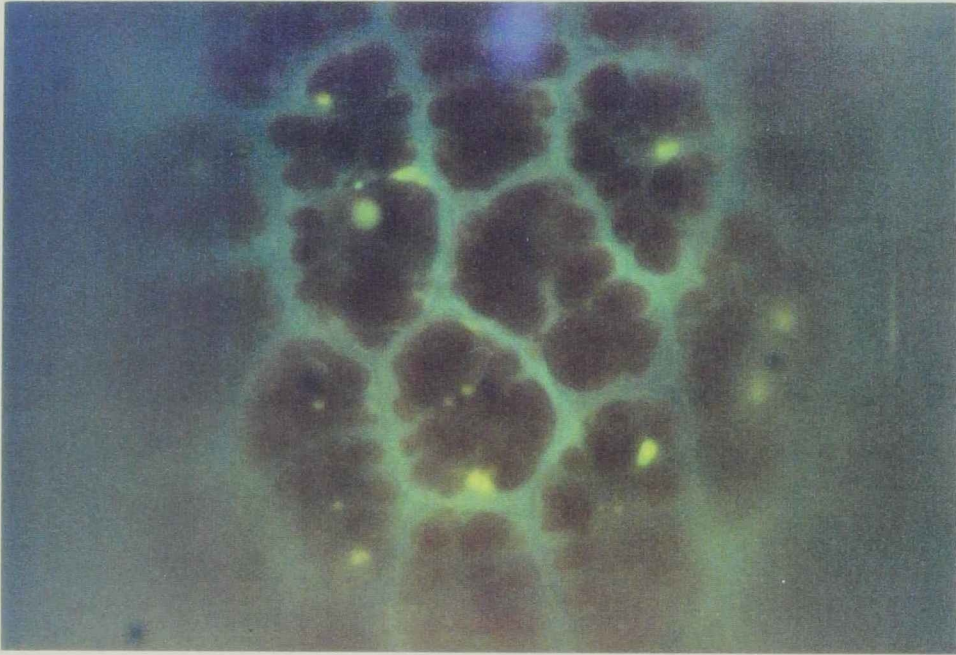


Abb.15: *Drosera capensis* x 1400, Drüsenköpfchen mit großen fluoreszierenden Endocytosevesikeln und Zellwänden



Abb.16: *Drosera capensis* x 1400, Basis des Drüsenköpfchens mit fluoreszierendem Halskranzbereich und Cytoplasma

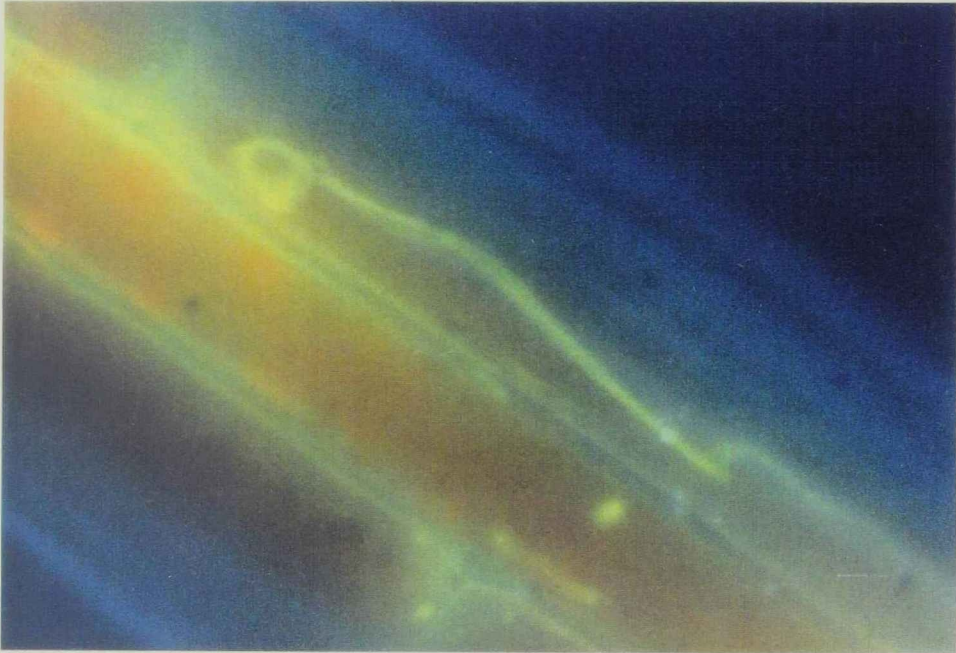


Abb.17: *Drosera capensis* x 1400, oberer Tentakelabschnitt mit fluoreszierenden LYCH-Kompartimenten in den Epidermiszellen

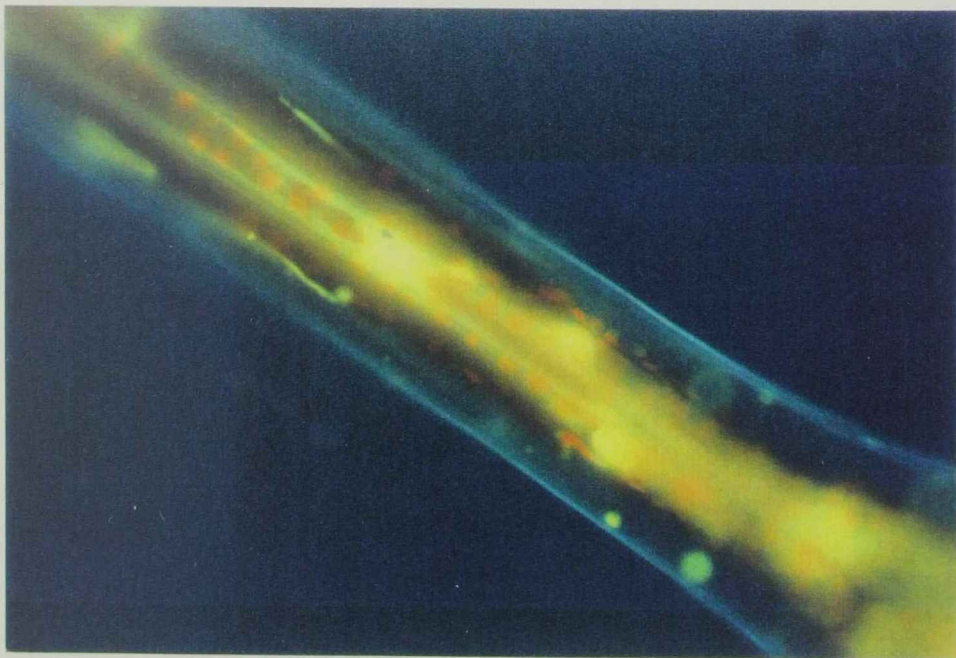


Abb.18: *Drosera capensis* x 600, oberster Tentakelabschnitt mit fluoreszierenden LYCH-Kompartimenten

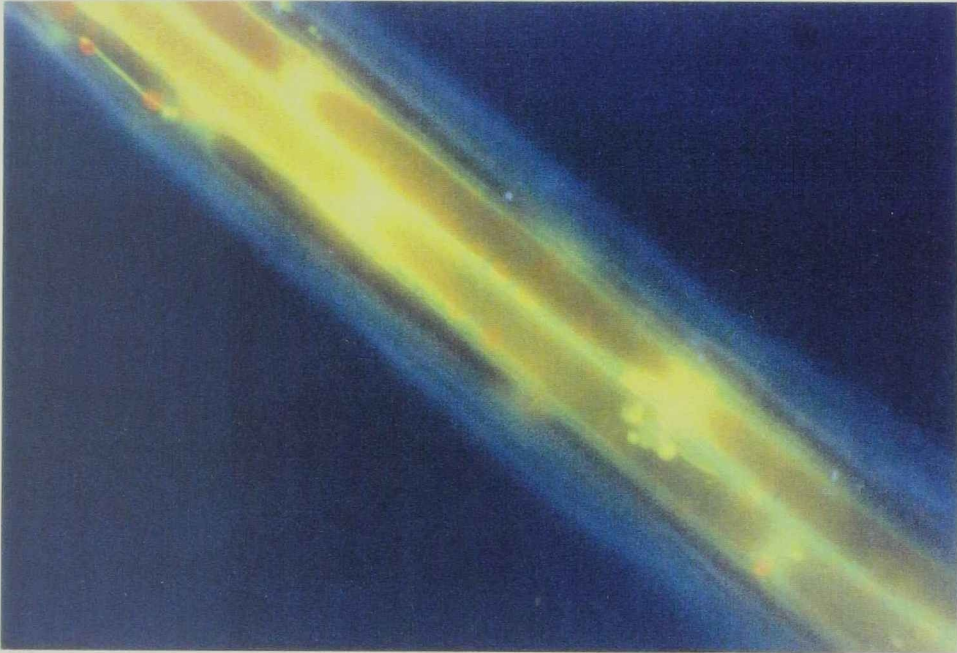


Abb.19: *Drosera capensis* x 600, mittlerer Tentakelabschnitt mit fluoreszierenden LYCH-Kompartimenten

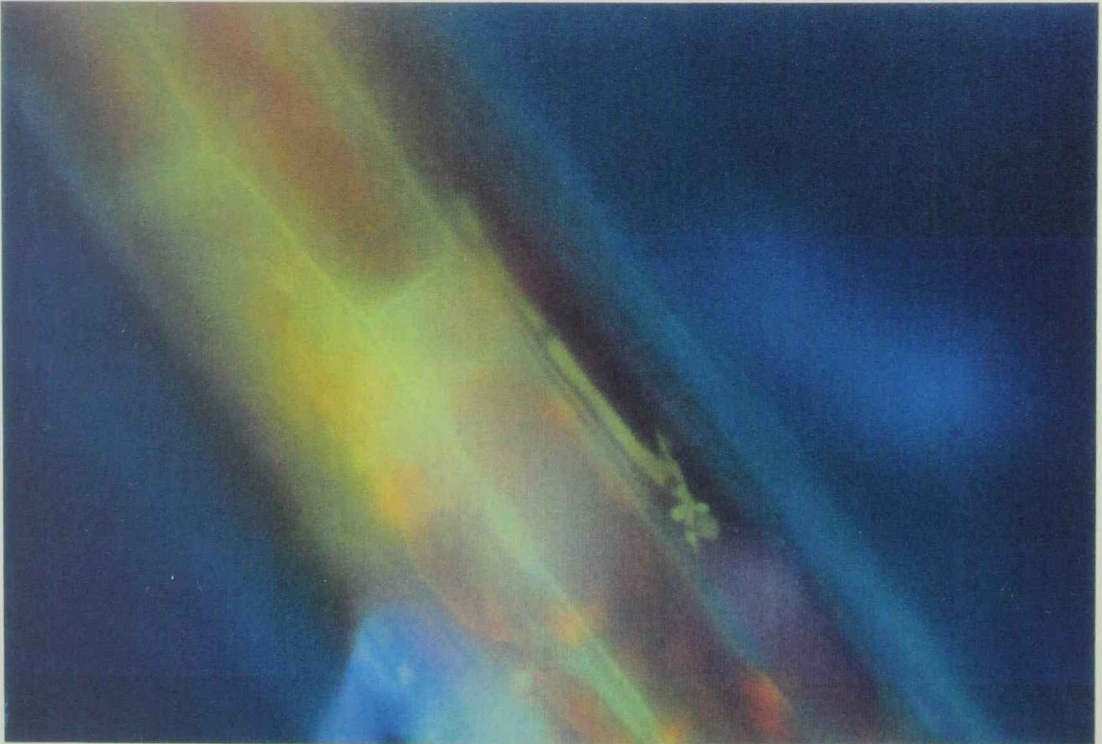


Abb.20: *Drosera capensis* x 1600, mittlerer Tentakelabschnitt, fluoreszierendes Plasma und LYCH-Kompartimente

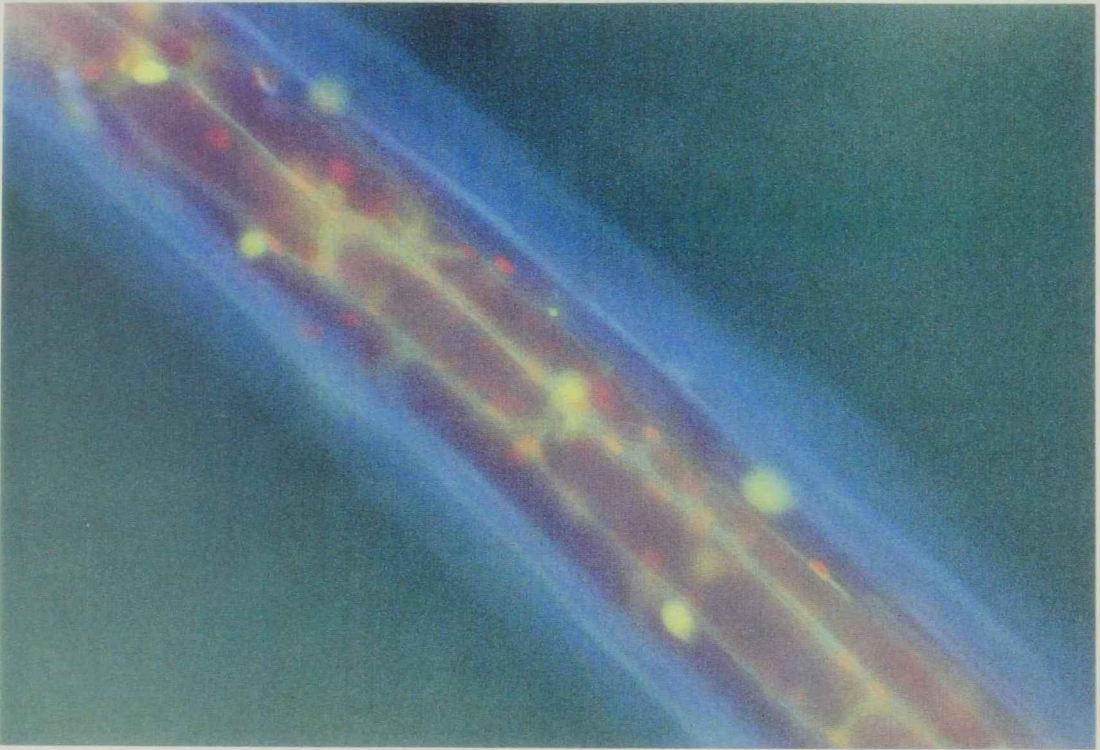


Abb.21: *Drosera capensis* x 800, mittlerer Tentakel mit LYCH-Vesikeln in den Epidermiszellen und fluoreszierendes Plasma

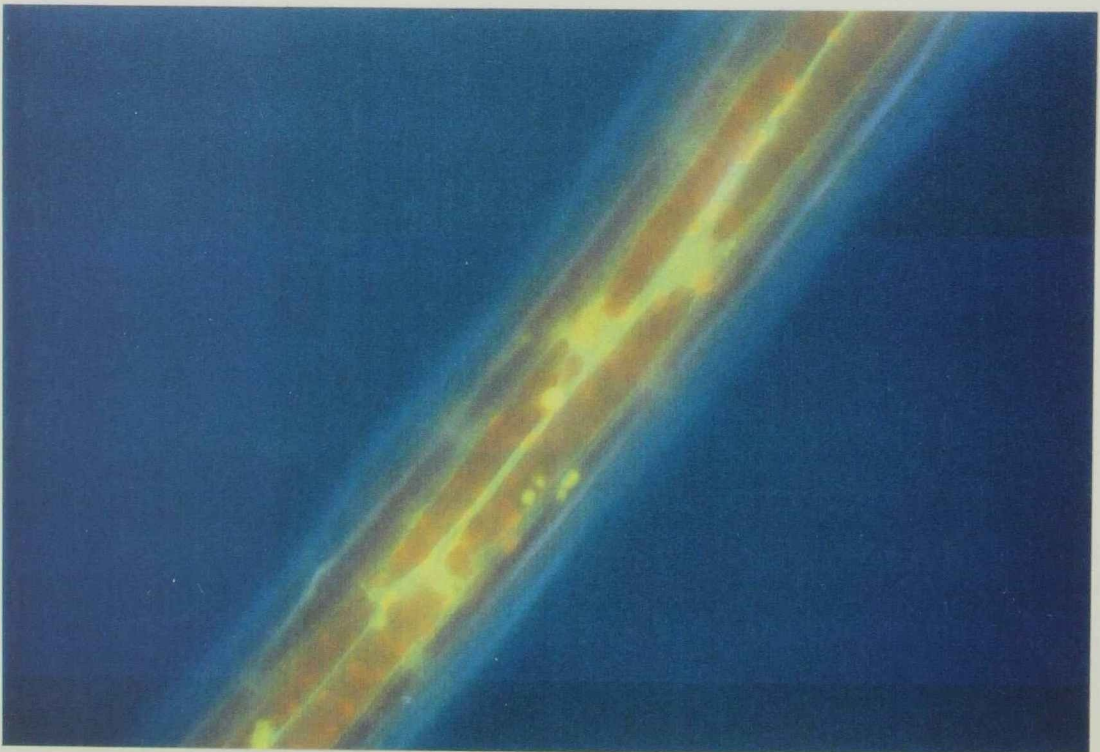


Abb.22: *Drosera capensis* x 800, mittlerer Tentakel mit fluoreszierenden Plasma und LYCH-Vesikeln in der Epidermis

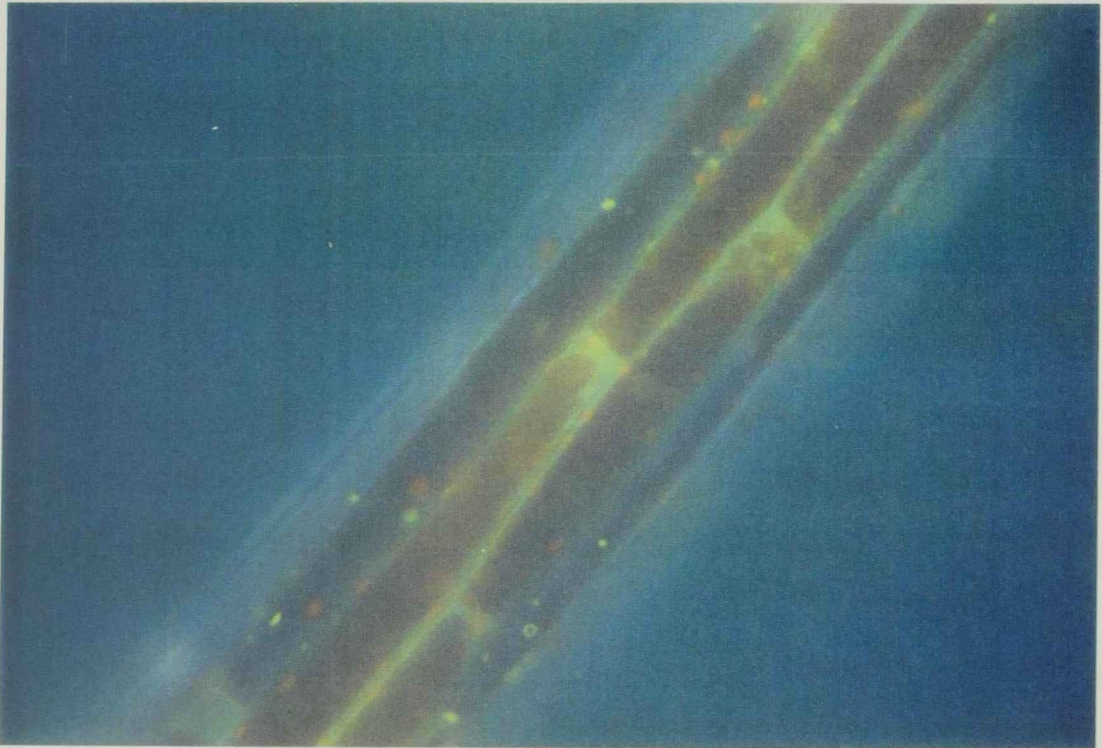


Abb.23: *Drosera capensis* x 800, oberes Tentakeldrittel mit fluoreszierenden Vesikeln und Plasma in der Epidermis



Abb.24: *Drosera capensis* x 1600, mittlerer Tentakelabschnitt mit LYCH-Kompartimenten und fluoreszierendes Plasma

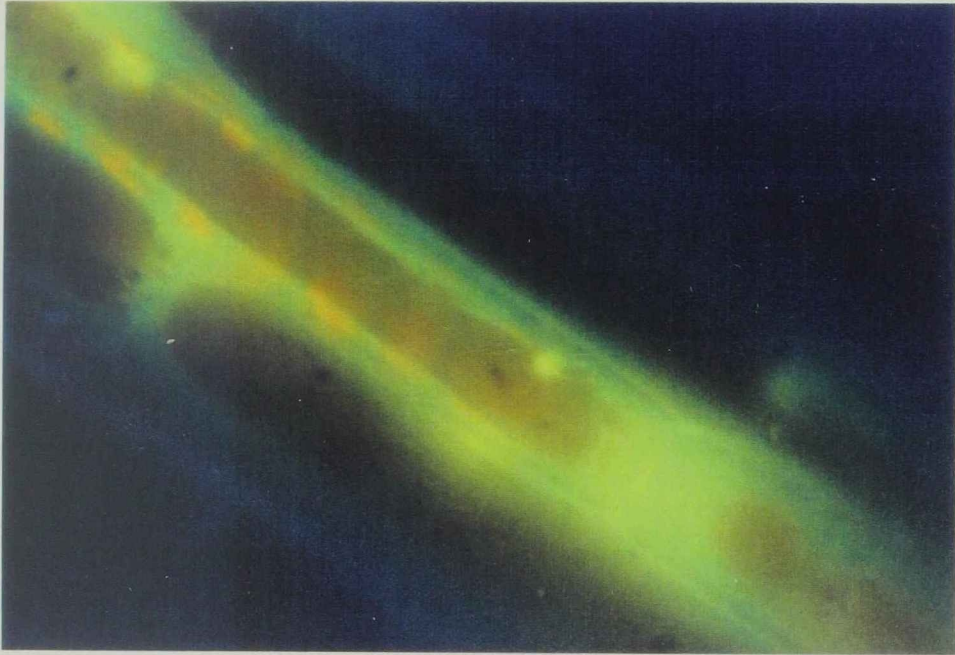


Abb.25: *Drosera capensis* x 1400, mittlerer Tentakelabschnitt mit fluoreszierender Cytoplasmamatrix

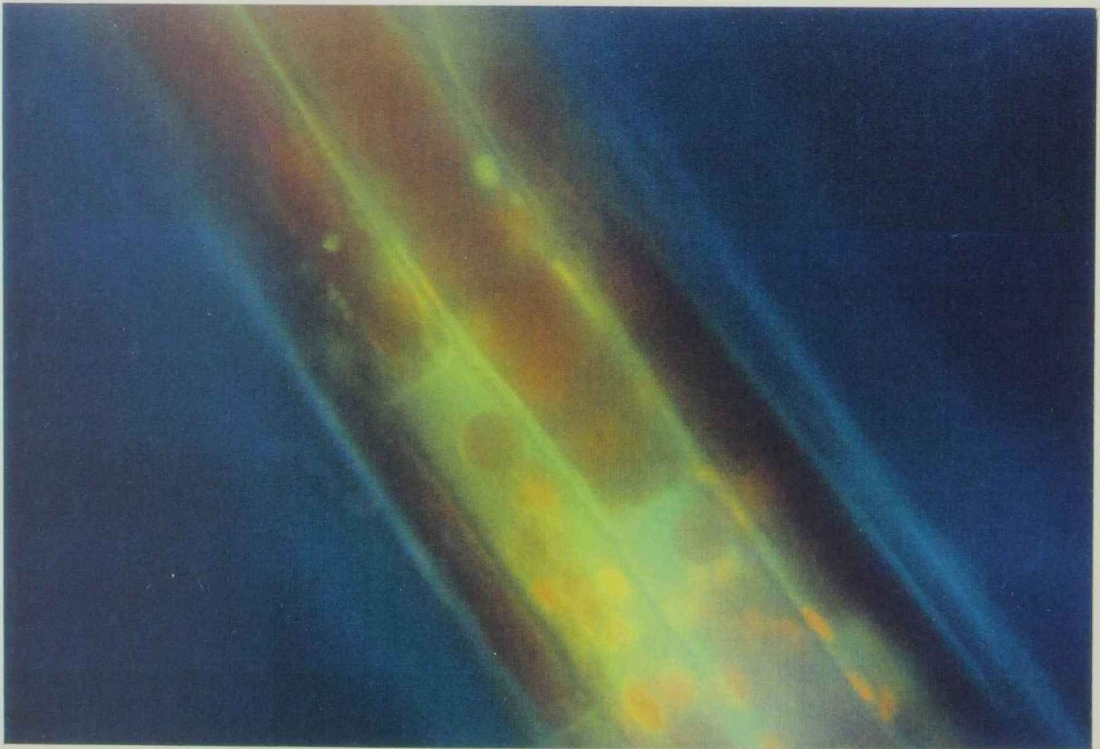


Abb.26: *Drosera capensis* x 1600, mittlerer Tentakelabschnitt, fluoreszierendes Plasma in der Epidermis

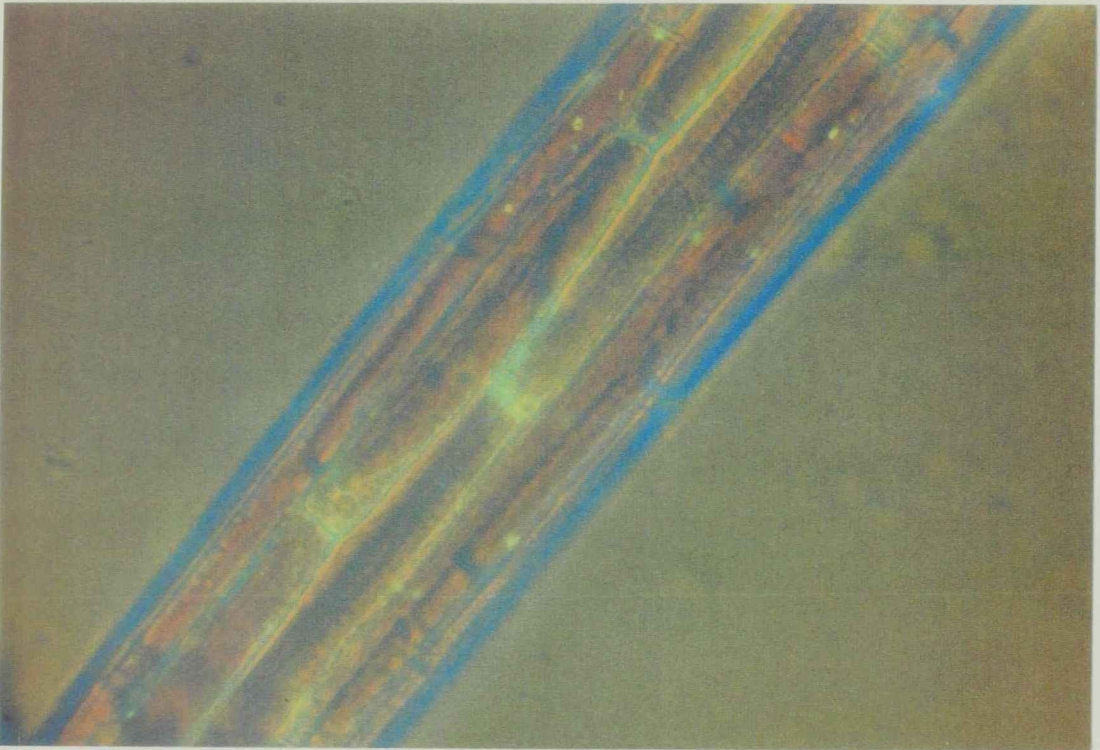


Abb.27: *Drosera capensis* x 800, oberer Tentakelstiel, fluoreszierende Cytoplasmamatrix, 420nm und Hellfeld

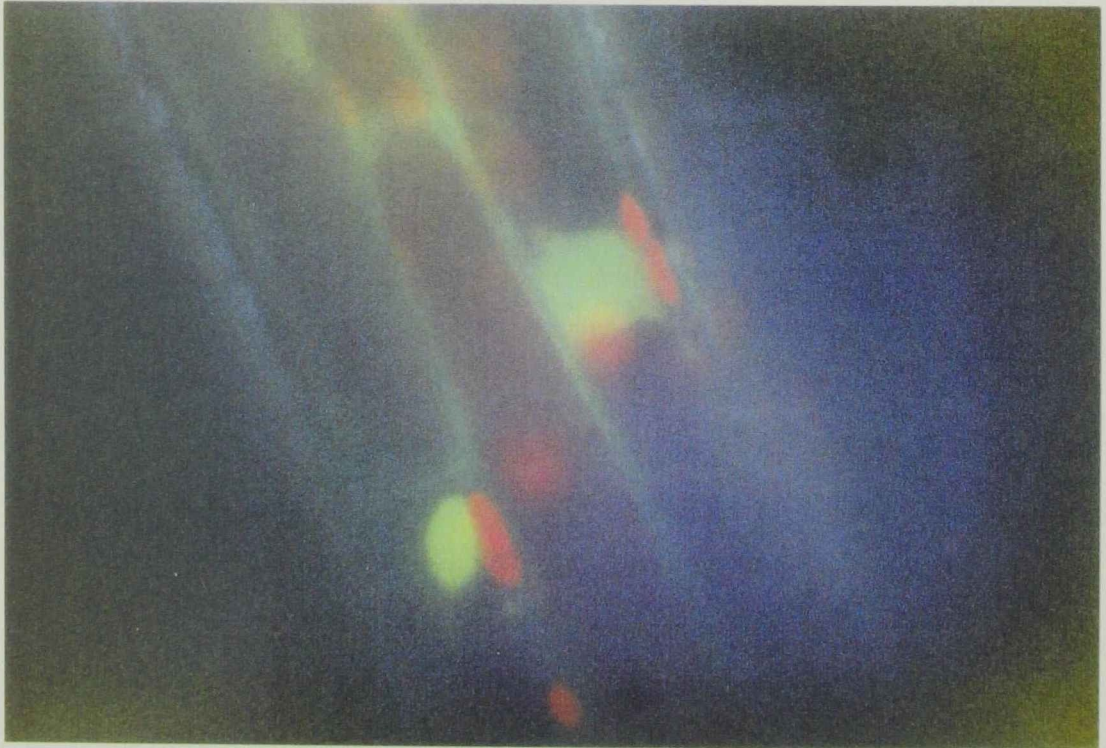


Abb.28: *Drosera capensis* x 1600, mittlerer Tentakelstiel, fluoreszierende LYCH-Vesikel und leichte diffuse Fluoreszenz des Plasmas

2.2. Isolation des Drüsenköpfchens von *Drosera capensis*

Nachdem ich sicher sein konnte, daß Lucifer Yellow vor allem durch Endocytose in die Tentakel gelangt, und es sich bei den leuchtenden Vesikeln um Endocytoseprodukte handeln muß, wollte ich herausfinden, ob die Drüsenzellen der Drüsenköpfchen alleine für diesen Vorgang verantwortlich sind. Dazu war es notwendig, den Endocytosemarker nur den Köpfchen zugänglich zu machen.

2.2.1. Versuchsdurchführung

Die Applikation von Lucifer Yellow erfolgte mit einer Glaskapillare, die ich mir selber anfertigte. Zunächst zog ich mir mit dem Nadelziehergerät eine Kapillare, so wie sie auch zur Mikroinjektion hergestellt wird. Diese zwickte ich dann vorsichtig an der Spitze ab. Die Öffnung sollte nicht viel größer als ein Drüsenköpfchen sein. Die Öffnung wurde dann noch vorsichtig abgeschliffen, denn die Köpfchen sollten nicht durch scharfe Glaskanten verletzt werden.

Die Kapillare sollte mit LYCH-Lösung gefüllt und über das Köpfchen gestülpt werden. Bei Einführen des Köpfchens würde die Lösung aber sofort über den Tentakel ablaufen und damit eine Isolierung hinfällig sein. Deswegen bereitete ich eine 1 %ige Agarmischung. Diese versetzte ich mit meiner bisher verwendeten Lösung von 10mM LYCH in einem Verhältnis von 1:1. Ich erhielt somit ein Gemisch von 0,5 %igem Agar und 5mM LYCH. Dieses ließ ich dann im lauwarmen Zustand in der Kapillare hochlaufen. Die Kapillare wurde im Kühlschrank kaltgestellt, damit sich der Agar verfestigen konnte.

Ich entnahm ein *Drosera*-Blatt und legte es auf einem angefeuchtetem Filterpapier unters Binokular. Ich hätte auch die vollständige Pflanze für diesen Vorgang verwenden können, wollte aber eine gleiche

Ausgangssituation wie in meinen vorherigen Versuchen erreichen. Die Kapillare wurde mit Hilfe eines mechanischen Mikromanipulators eingespannt und dann vorsichtig über das Köpfchen geschoben. Dabei achtete ich darauf, daß wirklich nur das Köpfchen im Agar zu liegen kam.

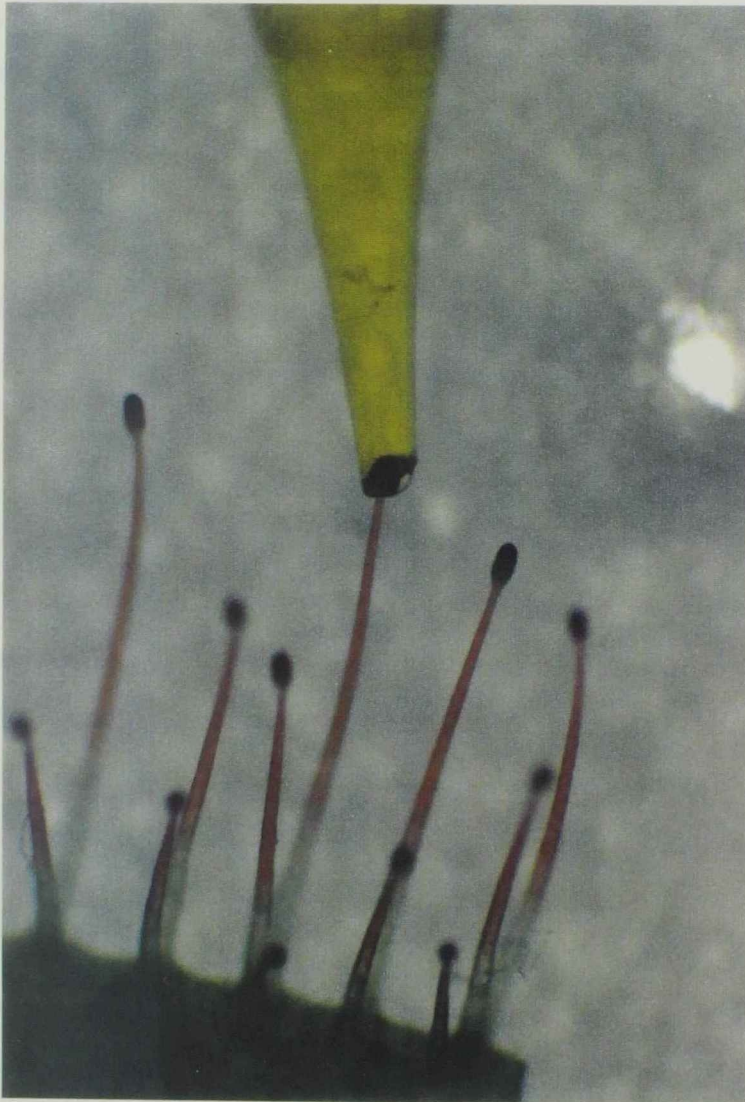


Abb.: Versuchsanordnung der Isolation des Drüsenköpfchens von *Drosera capensis*

Das Blatt ließ ich 20 Minuten in dieser Position. Es stellte sich aber bald heraus, daß diese Zeit für die Aufnahme aus Agar zu kurz bemessen war. Eine längere Einwirkdauer war jedoch auf Grund der Feuchtigkeit nur schwer möglich: Das Filterpapier trocknete relativ schnell aus und damit auch das Blatt selbst. Bei erneuter Wasserzugabe kam es ganz automatisch zur Positionsveränderung und damit rutschte oft der gesamte Tentakel in die Kapillare. Eine verlängerte Exposition von insgesamt 30 Minuten war allerdings möglich und schließlich auch ausreichend.

Ich entnahm das Blatt und merkte mir die ungefähre Position des entsprechenden Tentakels. Eine gründliche Reinigung konnte ich nicht durchführen, da es sonst zu einer Verlagerung des Farbstoffes kommen konnte, und das sollte ja nicht passieren.

2.2.2. Versuchsergebnis

Nach 20 Minuten in der Agar-LYCH-Lösung konnte ich beobachten, daß die Aufnahme von LYCH noch nicht so weit fortgeschritten war, wie gewohnt. Im Köpfchen selbst waren vereinzelte kleine Vesikel und schwach fluoreszierende Zellwände zu sehen. Auch die Endodermis strahlte gelbes Emissionslicht aus (Abb.29). Die Cytoplasmamatrix fluoreszierte nur sehr schwach, ebenso wie der Tracheidenstrang (Abb.30). Es waren im Tentakelstiel keinerlei Endocytose-Kompartimente zu beobachten. Ich erhöhte die Einwirkzeit auf eine halbe Stunde. Das Ergebnis blieb das gleiche.

Dieses Ergebnis war unerwartet, nachdem ich gerade im Köpfchen den Ort der Endocytose gesehen hatte, sollten auch LYCH-Kompartimente im Tentakelstiel zu sehen sein. Die Endocytosevesikel im Köpfchen waren zwar vorhanden, aber schwächer als zuvor. Das könnte bedeuten, daß einerseits die Endocytose selbst vermindert durchgeführt worden ist, oder andererseits nur der Transport in den Tentakelstiel nicht stattgefunden hat. Nachdem die

Endocytosevesikel aber eben nur vereinzelt im Köpfchen aufgetreten waren, nahm ich an, daß die Aufnahme gestört worden ist. Zur Kontrolle legte ich ein Drosera-Blatt auf einen Objekträger und brachte die Agar-LYCH-Mischung mit einer Pipette auf die Tentakel. Ich wollte sicher gehen, daß eine Aufnahme von LYCH in der Gegenwart von Agar überhaupt möglich ist. Das Ergebnis war überraschend:

Das Köpfchen zeigte nun neben den fluoreszierenden Zellwänden zahlreiche Endocytosevakuolen. Im Tentakel selbst allerdings konnte ich nun, abgesehen vom leicht fluoreszierendem Plasma, auch zahlreiche Schläuche mit gelben Inhalt sehen. Die LYCH-Kompartimente glichen den bereits vorher (Abschnitt 2.1.) beschriebenen und befanden sich wie gewohnt in den Epidermiszellen im oberem Tentakeldrittel.

Eine Aufnahme des Farbstoffes war also aus einer Agar-Lösung durchaus möglich. Daraus mußte ich eigentlich schließen, daß doch nicht das Köpfchen alleine für die Endocytose verantwortlich ist. Der nächste Gedanke fiel sofort auf die sessilen Drüsen. Aber auch die zeigten wie immer teilweise Fluoreszenz, teilweise nicht und konnten mich daher nicht überzeugen. Sollten die Köpfchen keine Rolle bei der Endocytose spielen, dürfte es auch keinen Unterschied machen, wenn ich diese zerstören würde. Bei einer lokalen Abtötung des Köpfchens und Einbringen des Tentakels in die LYCH-Lösung müßte es dann trotzdem zu den Endocytose-Kompartimenten kommen.

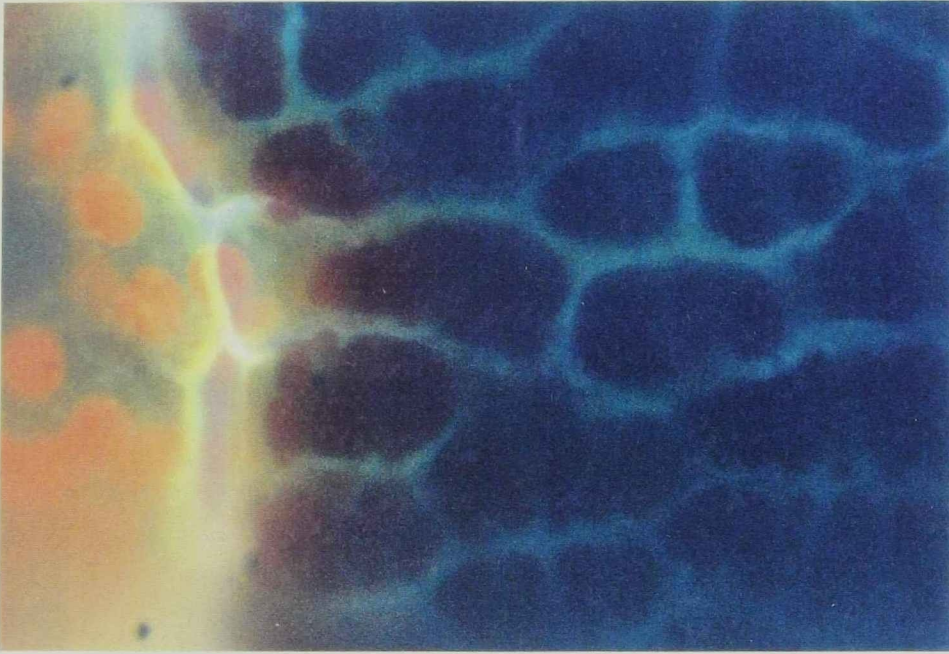


Abb.29: *Drosera capensis* x 1400, Drüsenköpfchen nach isolierte Applikation von LYCH mit der Glaskapillare, fluoreszierender Halskranz

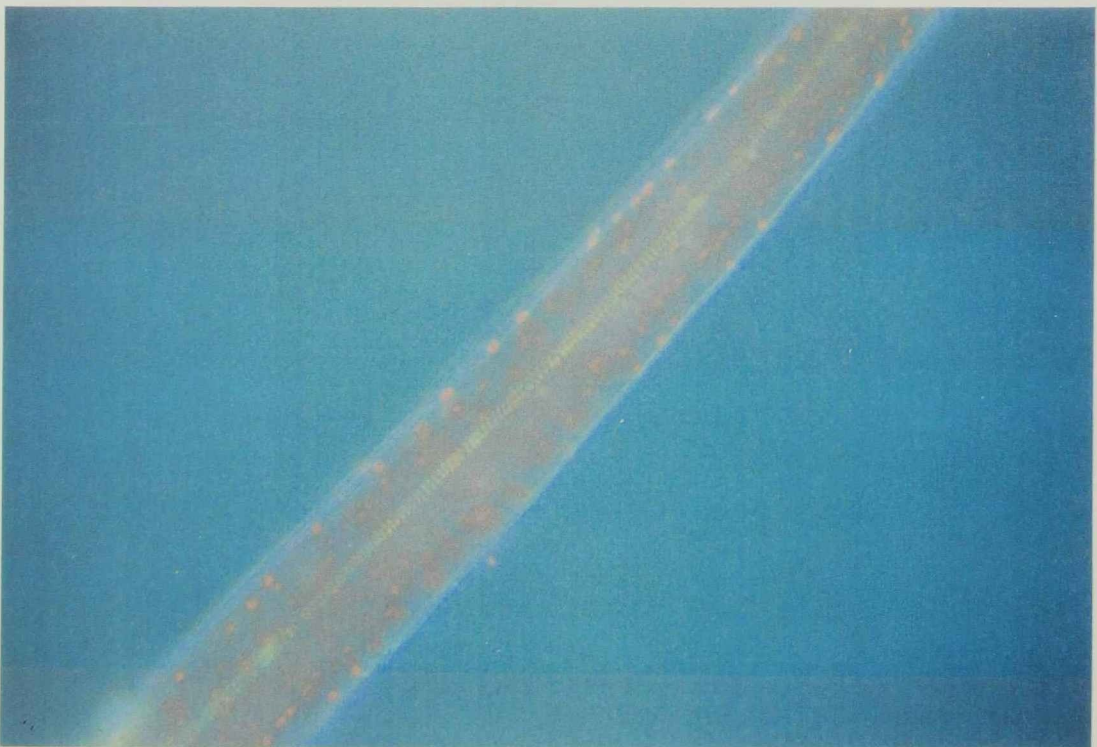


Abb30: *Drosera capensis* x 800, Tentakelstiel nach isolierter LYCH-Applikation am Drüsenköpfchen, fluoreszierender Tracheidenstrang

2.3. Manipulation des Drüsenköpfchens durch lokale Verstümmelung

Mit diesem Versuch konnte ich zeigen, daß in den Tentakeln keinerlei Endocytose-Kompartimente zu erkennen sind, sobald das Köpfchen beschädigt ist. Im Gegensatz zu dem vorherigen Versuch schob ich dieses Mal den Tentakel weiter in die Kapillare mit dem Agar-LYCH-Gemisch, damit eine breitere Aufnahme des Endocytosemarkers möglich wird.

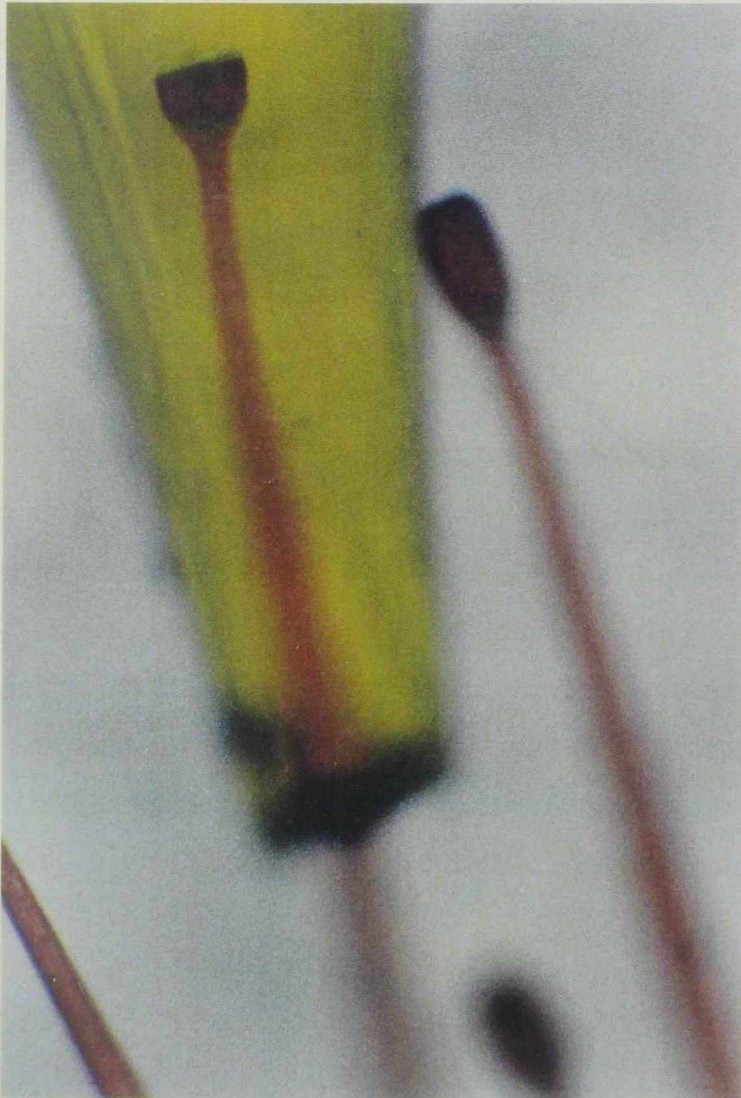


Abb.: Versuchsanordnung bei lokaler Verstümmelung des Drüsenköpfchens

2.3.1. Versuchsdurchführung

Mit einer Rasierklinge trennte ich die Hälfte eines Drüsenköpfchens ab (Abb.31+32). Ich erhielt damit ein Präparat mit mehreren Tentakeln, von dem einer nur mit halben Kopf auf dem Grundgewebe aufsaß. Dann stülpte ich die Kapillare mit der Agar-LYCH-Mischung über das zerstörte Köpfchen. Die Kapillare konnte jetzt ohne weiteres weiter über den Tentakel hinunterrutschen, denn das Köpfchen war zerstört, zumindest der angeblich aktivste obere Bereich mit den Drüsenzellen. Denn wenn nicht das Köpfchen, sondern der Tentakel selbst zur Endocytose befähigt ist, dann war ein Kontakt mit LYCH nicht nur möglich, sondern sogar erwünscht. Der Tentakel blieb wieder für eine halbe Stunde in der Kapillare.

2.3.2. Versuchsergebnis

Ich konnte eine ganz leichte Fluoreszenz des Endodermisringes an der Basis des Köpfchens beobachten, die schwächer war als sonst. Die Zellwände der Drüsenzellen waren kaum angefärbt. Auch waren keine Endocytosevesikel zu sehen (Abb.33+34). Weiters war eine leichte diffuse Fluoreszenz der Cytoplasmamatrix im oberen Tentakelstiel zu sehen. Der Tracheidenstrang war durchgehend angefärbt (Abb.35+36). Das Köpfchen zeigte Fluoreszenz in den zerstörten Zellen, in die LYCH passiv eingedrungen war. Weder das Köpfchen noch der Tentakel wiesen jedoch LYCH-Kompartimente auf.

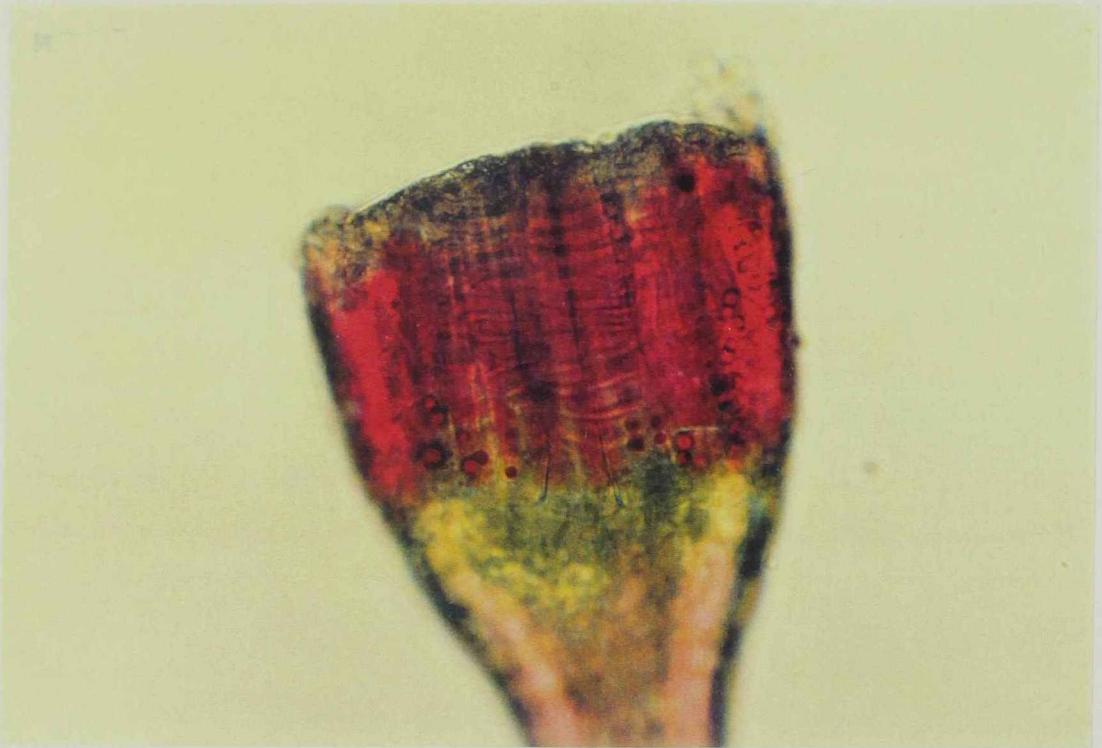


Abb.31: *Drosera capensis* x 800, Drüsenköpfchen mit Rasierklinge halbiert, Hellfeld

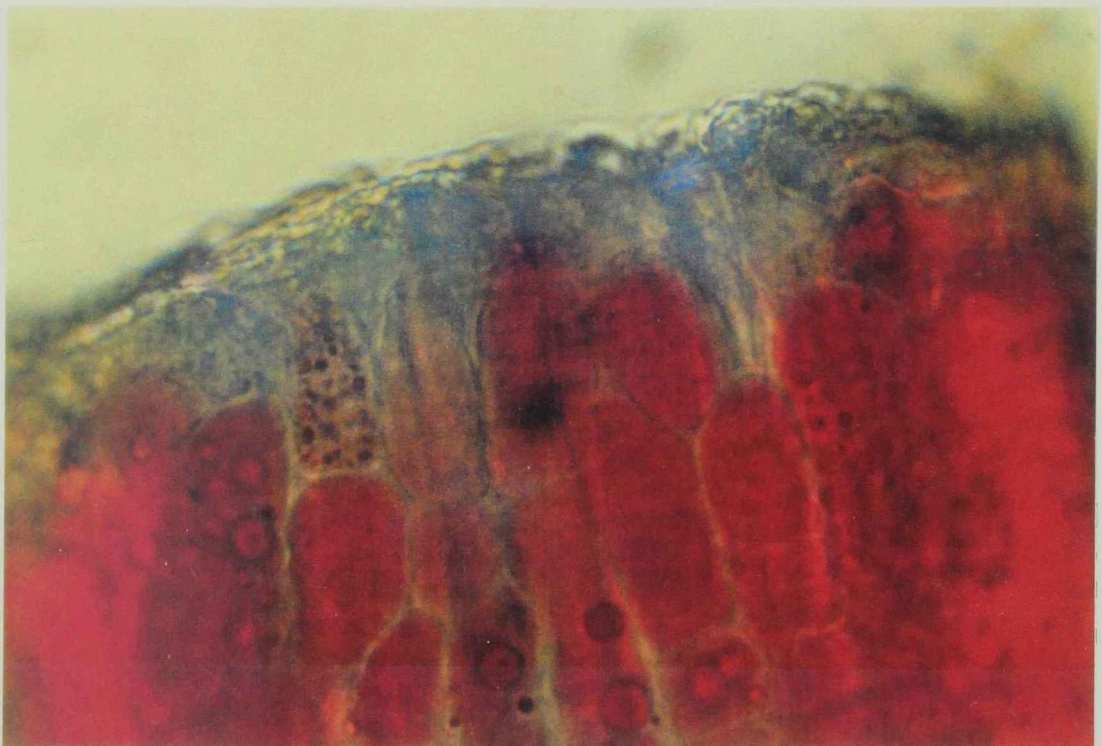


Abb32: *Drosera capensis* x 1600, zerstörtes Drüsenköpfchen nach LYCH-Applikation, 420nm und Hellfeld



Abb.33: *Drosera capensis* x 1600, zerstörtes Drüsenköpfchen nach Applikation von LYCH, verletzte Region mit eingedrungenem Farbstoff

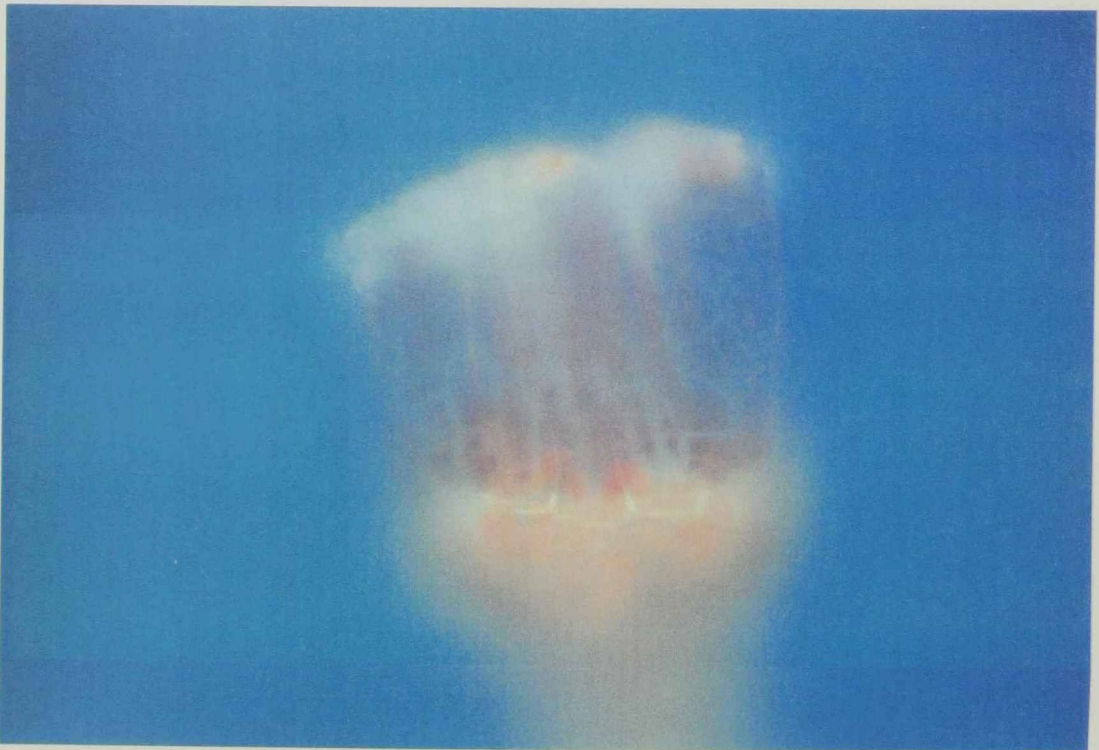


Abb34: *Drosera capensis* x 800, zerstörtes Drüsenköpfchen nach LYCH-Applikation, Farbstoff dringt in verletzte Zellen

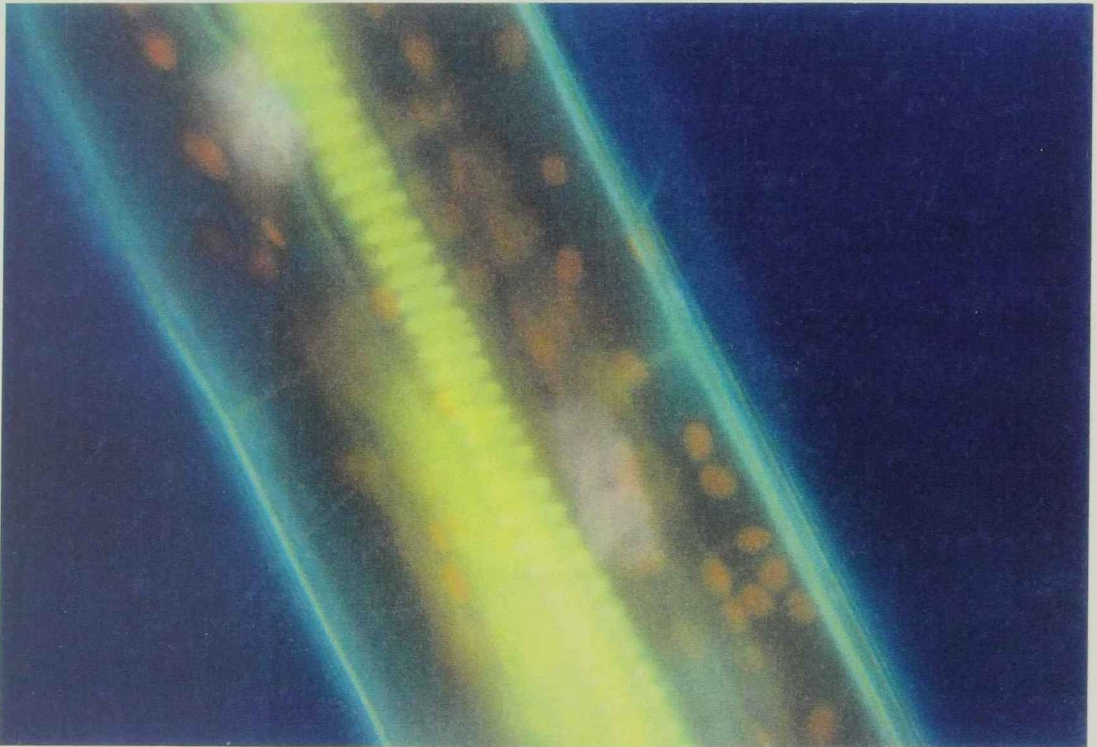


Abb.35: *Drosera capensis* x 800, Applikation von LYCH am zerstörten Drüsenköpfchen, unterer Tentakelstiel, fluoreszierende Tracheide



Abb36: *Drosera capensis* x 600, oberer Tentakelstiel nach LYCH-Applikation am zerstörtem Drüsenköpfchen, leichte diffuse Plasmafluoreszenz

2.4. Manipulation des Köpfchens mit heißer Vaseline

Ein zerstümmeltes Köpfchen führte also dazu, daß zwar das Plasma und der Tracheidenstrang fluoreszieren, aber keine Endocytosevesikel zu sehen waren. Ich wollte ausschließen, daß der Farbstoff durch die offene Wunde in das Köpfchen eindringen kann und damit vielleicht auch durch den Tracheidenstrang oder auf den symplastischen Weg weiterkommt. Aus diesem Grund war eine andere Zerstörung des Köpfchens nötig, aber ohne neue Eintrittsmöglichkeiten.

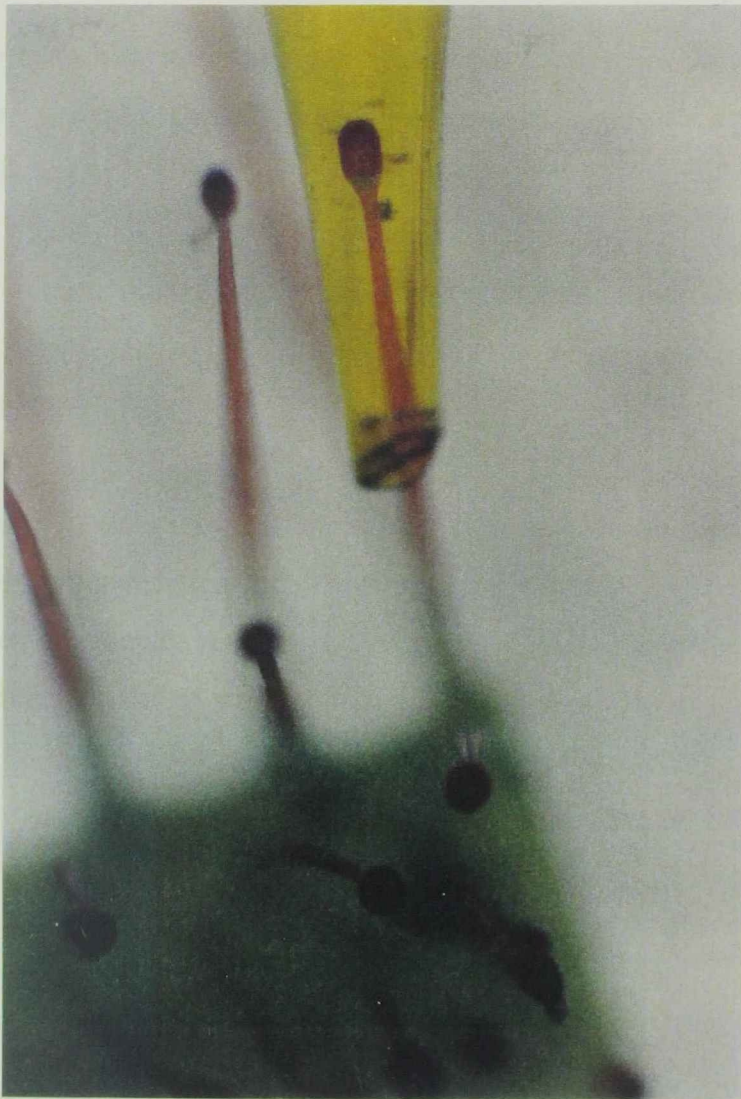


Abb.: Versuchsanordnung bei Manipulation des Drüsenköpfchens mit heißer Vaseline

2.4.1. Versuchsdurchführung

Ich erhitzte Vaseline und tauchte einen Blattschnitt in die heiße Substanz. Ein Lupe half mir sicherzugehen, daß nur das Köpfchen selbst durch Hitzeschock beeinträchtigen war. Dann stülpte ich wieder die Kapillare über den entsprechenden Tentakel.

2.4.2. Versuchsergebnis

Der Tentakel war für eine halbe Stunde bis zu seinem oberen Drittel in der Kapillare gewesen. Das Köpfchen war dadurch abgestorben und durchgehend gelb gefärbt (Abb.37+38).

Die Cytoplasmamatrix des oberen Tentakeldrittels zeigte eine leichte diffuse Fluoreszenz. Auch der Tracheidenstrang zeigt eine gelbe Emission (Abb.39+40).

Bei einer Wiederholung des Versuches kam es auch zu einer Zerstörung der obersten Tentakelzellen unterhalb des Köpfchens. Diese waren wie das Köpfchen total gelb verfärbt. Der Übergang von den gelben, toten zu den roten, lebenden Zellen war deutlich zu erkennen. Nach etwa 20 Minuten kam es auch zu einem langsamen Weitertransport des Farbstoffes in diese gesunden Zellen. Dies war an einer leichten diffusen Fluoreszenz des Plasmas zu erkennen, die sich langsam den Tentakel hinunter zog. LYCH-Kompartimente waren aber nicht vorhanden (Abb.41+42).

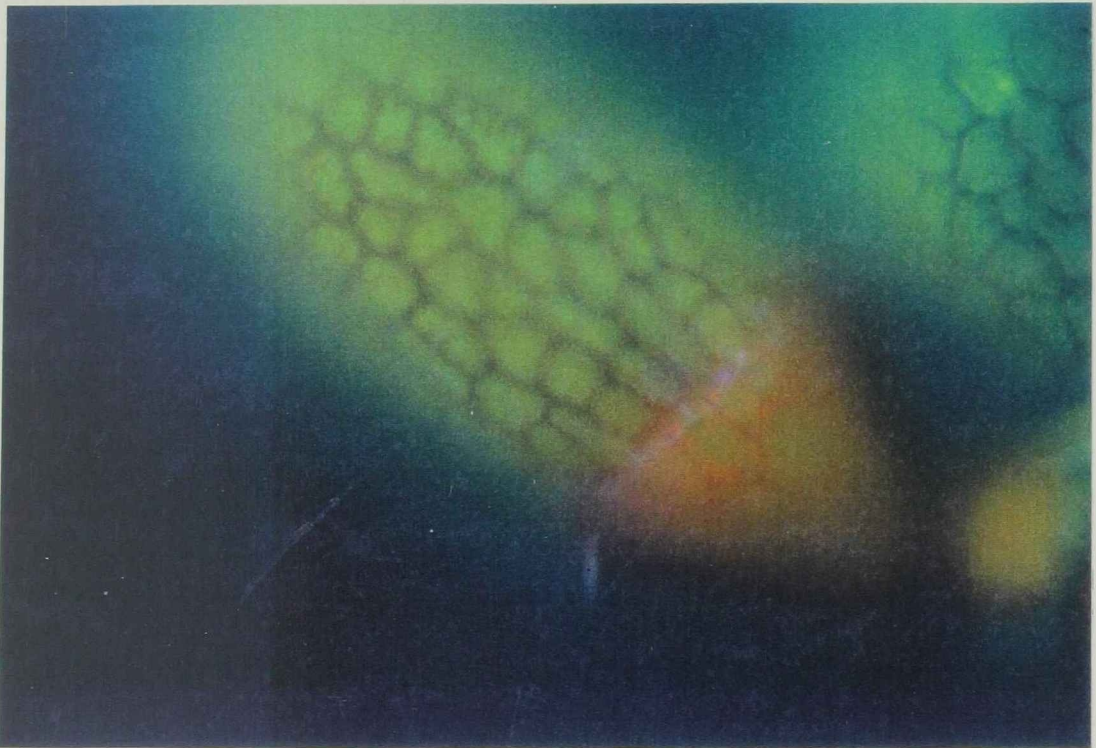


Abb.37: *Drosera capensis* x 800, Drüsenköpfchen nach Hitzeschädigung und Reaktion mit LYCH

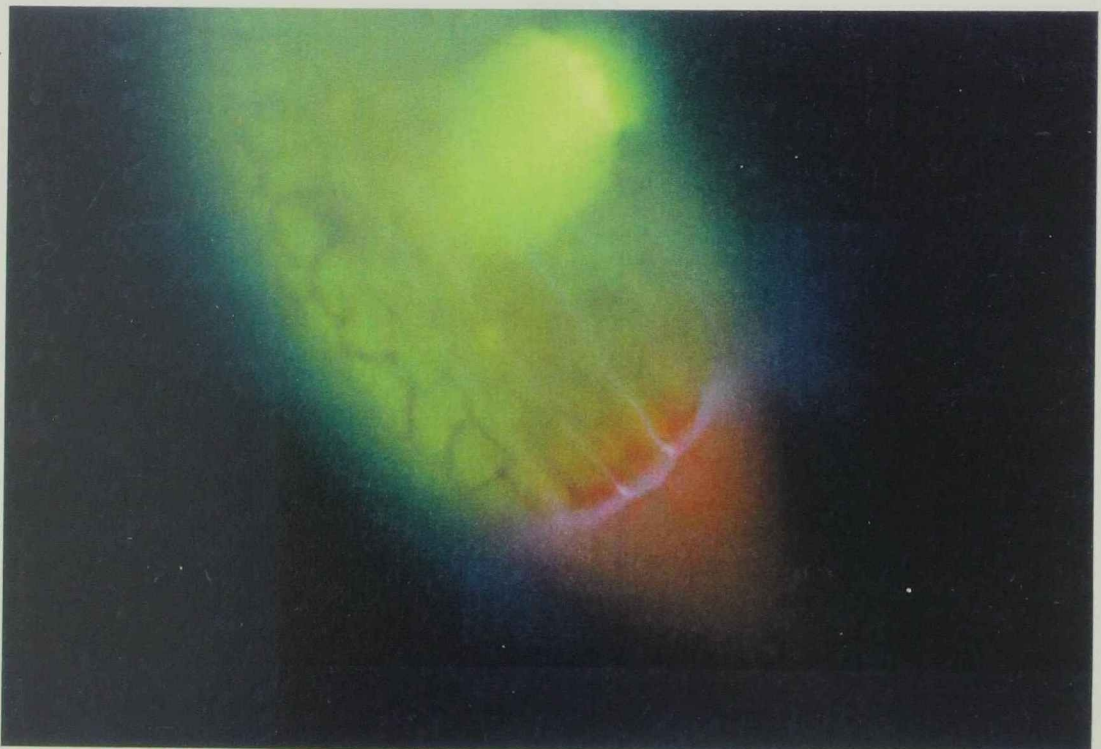


Abb38: *Drosera capensis* x 800, Drüsenköpfchen nach Hitzeschädigung und Reaktion mit LYCH



Abb.39: *Drosera capensis* x 1600, Drüsenköpfchen mit heißer Vaseline manipuliert, diffuse Plasmafluoreszenz im Tentakelstiel nach Reaktion mitLYCH

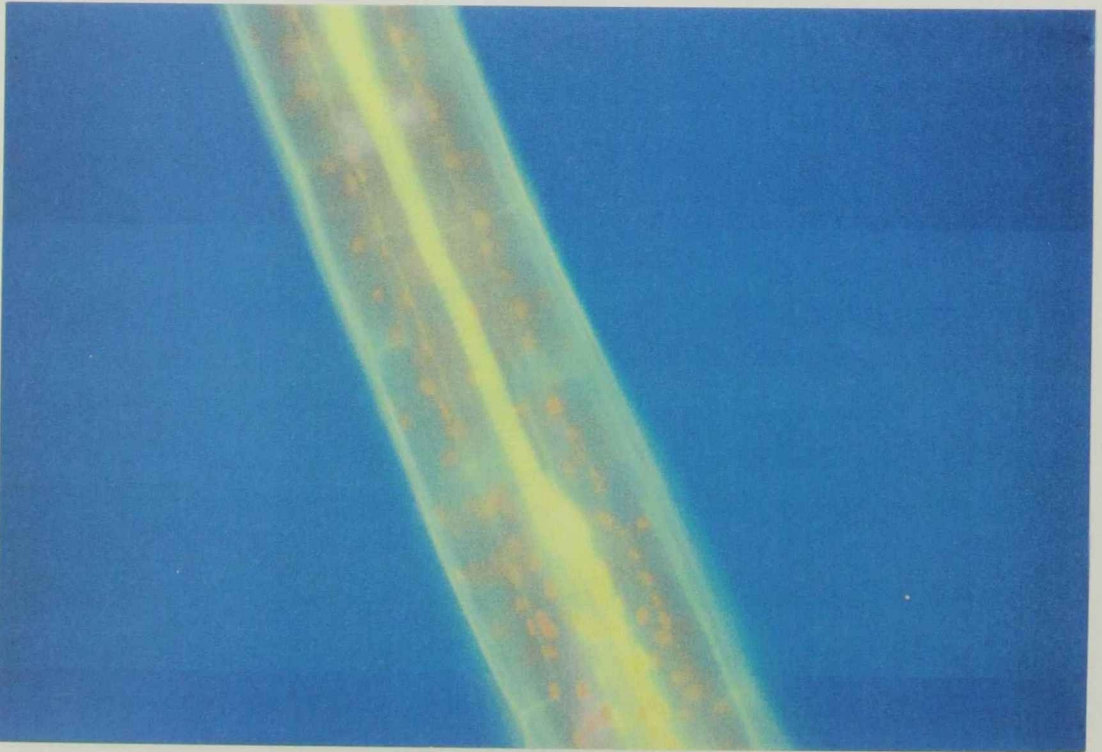


Abb.40: *Drosera capensis* x 600, Tentakelstiel nach LYCH-Applikation am hitzebeschädigtem Drüsenköpfchen, fluoreszierender Tracheidenstrang



Abb.41: *Drosera capensis* x 800, Drüsenköpfchen und oberster Tentakelabschnitt
Hitze geschädigt, LYCH frei in zerstörte Zellen eingedrungen



Abb.42: *Drosera capensis* x 800, Tentakelstiel nach Hitzeschädigung und Reaktion
mit LYCH, Farbstoff wandert langsam weiter, diffuse Plasmafluoreszenz

3. Hemmung der Endocytose durch das Atemgift KCN

Die letzten Versuche hatten gezeigt, daß eine Aufnahme von Lucifer Yellow durch Endocytose möglich ist. Eine Aufnahme dieses Stoffes, der nicht frei durch die Membran diffundieren kann, ist nur in Form verpackter Vesikel möglich. Ein freies Diffundieren durch die Plasmamembran kann ausgeschlossen werden. Außerdem hatten die Versuche bewiesen, daß bei Zerstörung des Drüsenköpfchens keine LYCH-Kompartimenten gebildet werden. Daraus ist zu schließen, daß das Köpfchen die Endocytose durchführt. Es bleibt die Frage, warum bei lokaler Applikation des Farbstoffes am Köpfchen mit Hilfe der Glaskapillare dieser Vorgang nicht stattgefunden hatte.

Einer der Gründe, warum keine Endocytose bei direkter Applikation am Köpfchen erfolgte, konnte vielleicht im Sauerstoffmangel liegen. Die Endocytose ist ein energieabhängiger Prozess. Wird die Atmung durch Sauerstoffmangel blockiert, so könnte dies eine verminderte Reaktion bei allen energiebedürftigen Aktionen zur Folge haben. Im Gegensatz zum Auftragen des Agar-LYCH-Gemisches direkt auf das Blatt ist beim Eintauchen des Köpfchens in die Kapillare ein Sauerstoffmangel möglich. Das Köpfchen steckt voll und ganz in einer gelartigen Lösung, die jeden Luftaustausch verhindert. Mich interessierte daher der Einfluß von Sauerstoffmangel auf die Aufnahme von LYCH und blockierte die Atmung mit einem Atmungsinhibitor.

3.1. Versuchsdurchführung

Als Atemgift verwendete ich KCN in einer Konzentration von 10^{-3} M. Cyanid ist ein Stoff, der in die Atmungskette eingreift. Er blockiert die Synthese der

Cytochromoxidase, ein Enzym, das zahlreiche Redoxreaktionen katalysiert. Wichtig ist hier, daß es sich dabei um eine nicht giftige Substanz handelt und daß die Hemmung der Atmung reversibel ist.

Ich ließ die Präparate zunächst 5 Minuten in der Cyanid-Lösung. Dann versetzte ich diese Lösung mit der selben Menge an 10mM LYCH.-Lösung. Damit erhielt ich die schon gewohnte Konzentration an Farbstoff. Die Schnitte blieben 20 Minuten in dem KCN-LYCH-Gemisch.

3.2. Versuchsergebnis

Ich konnte leicht fluoreszierende Zellwände im Drüsenköpfchen und den fluoreszierenden Endodermisring an der Basis des Köpfchens erkennen. Endocytosevesikel waren nicht vorhanden (Abb.43+44). Im Tentakelstiel waren keinerlei LYCH-Kompartimente zu erkennen.. Auch das Plasma zeigte keine bzw. nur äußerst schwache Fluoreszenz. Der Tracheidenstrang zeigte eine gelbe Emission (Abb.45+46).

Das Erscheinungsbild glich also dem des Versuches mit der Glaskapillare. Eine Hemmung der Atmung schien daher eine größere Aufnahme des Endocytosemarkers zu verhindern.

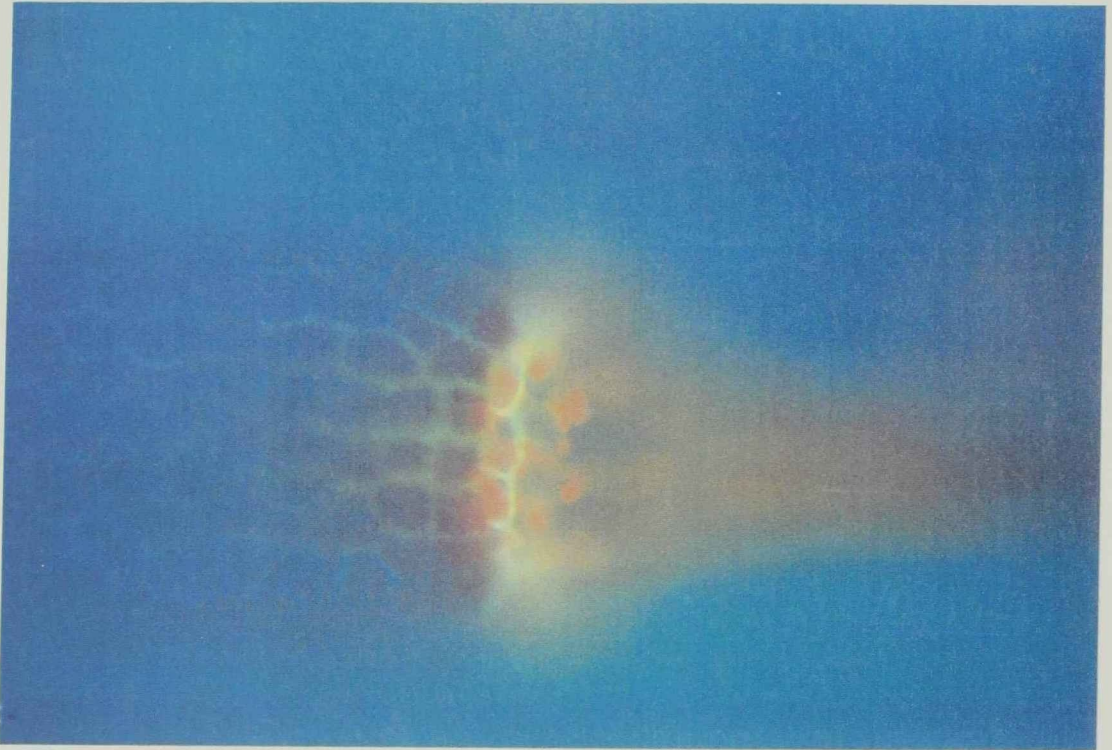


Abb.43: *Drosera capensis* x 800, Drüsenköpfchen mit leichter Fluoreszenz nach Reaktion mit Cyanid und LYCH

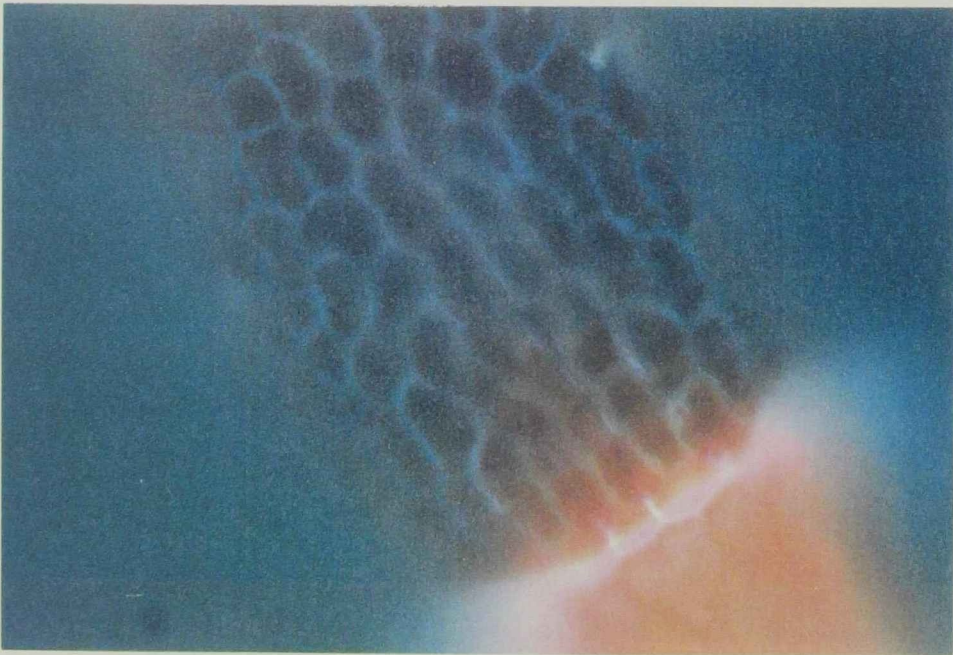


Abb.44: *Drosera capensis* x 600, Drüsenköpfchen ohne fluoreszierende LYCH-Kompartimente, nach Reaktion mit Cyanid und LYCH

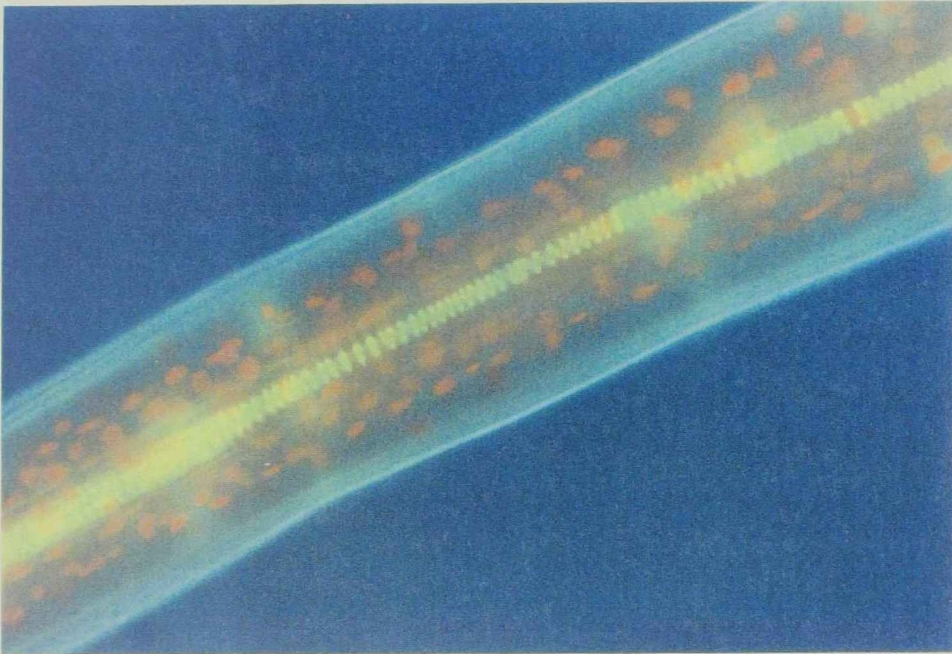


Abb.45: *Drosera capensis* x 600, Tentakelstiel mit fluoreszierendem Tracheidenstrang, Cyanid und LYCH



Abb.46: *Drosera capensis* x 1400, Tentakelstiel nach Reaktion mit LYCH und Cyanid, fluoreszierender Tracheidenstrang

4. Die Aufnahme von LYCH nach dem Auslösen der Aggregation

Bei diesen Versuchen stimulierte ich die Drosera-Tentakel mit Pepsin. Die Folge war eine Aggregation im oberen Tentakelbereich. Ich ließ die Tentakel einmal vor und einmal nach der Verabreichung von Pepsin mit Lucifer Yellow reagieren. Damit konnte ich beobachten, ob es einerseits zu einer anderen Verteilung des Farbstoffes kommt, wenn nach der Aufnahme des Endocytosemarkers eine Aggregation folgt. Andererseits war es möglich festzustellen, daß Lucifer Yellow nach stimulierter Aggregation nicht mehr aufgenommen wird.

4.1. Versuchsdurchführung

Zunächst ließ ich meine Blattpräparate für 3 Stunden in einer 2%igen Pepsinlösung. Eine Kontrolle im Hellfeld zeigte eindeutige Aggregation im obersten Tentakeldrittel. Anschließend führte ich die Präparate in die übliche LYCH-Lösung über, wo sie 20 Minuten blieben.

Zum Vergleich führte ich diese Versuche auch in umgekehrte Reihenfolge durch. Also zuerst 20 Minuten in LYCH, dann 3 Stunden in Pepsin. Die Präparate, die aus der LYCH-Lösung kamen, untersuchte ich hinsichtlich der Aufnahme des Farbstoffes. Ich konnte deutliche Ansammlungen in Form zahlreicher gelb gefüllten Vesikel und Schläuche erkennen, bevor ich die Schnitte in die Pepsinlösung überführte.

4.2. Versuchsergebnis

Das Ergebnis zeigte eine eindeutige Hemmung der LYCH-Aufnahme nach Aggregation. Scheinbar führt eine gefütterte Drosera keine Endocytose mehr durch. Ich konnte eine leichte Fluoreszenz in den Zellwänden des Köpfchens beobachten. Eine gelbe Emission ging auch vom Halskranz aus. Das Plasma der Endodermiszellen im Tentakel allerdings zeigte nur eine minimale Fluoreszenz, so daß sie als solche auch leicht übersehen werden kann. Es waren keine Endocytose-Kompartimente zu erkennen, die auf eine definitive Aufnahme von Lucifer Yellow durch Endocytose hingewiesen hätten (Abb.47-50).

Das Auslösen der Aggregation nach der Lucifer Yellow Aufnahme führt dagegen zu einer Konzentration der zahlreichen Schläuche und Vakuolen. Die Fluoreszenz des Plasmas erschien stärker als sonst, was wahrscheinlich mit der Zerklüftung der Vakuole und mit der damit verbundenen Plasmaquellung zu tun hat (Abb.51-54).

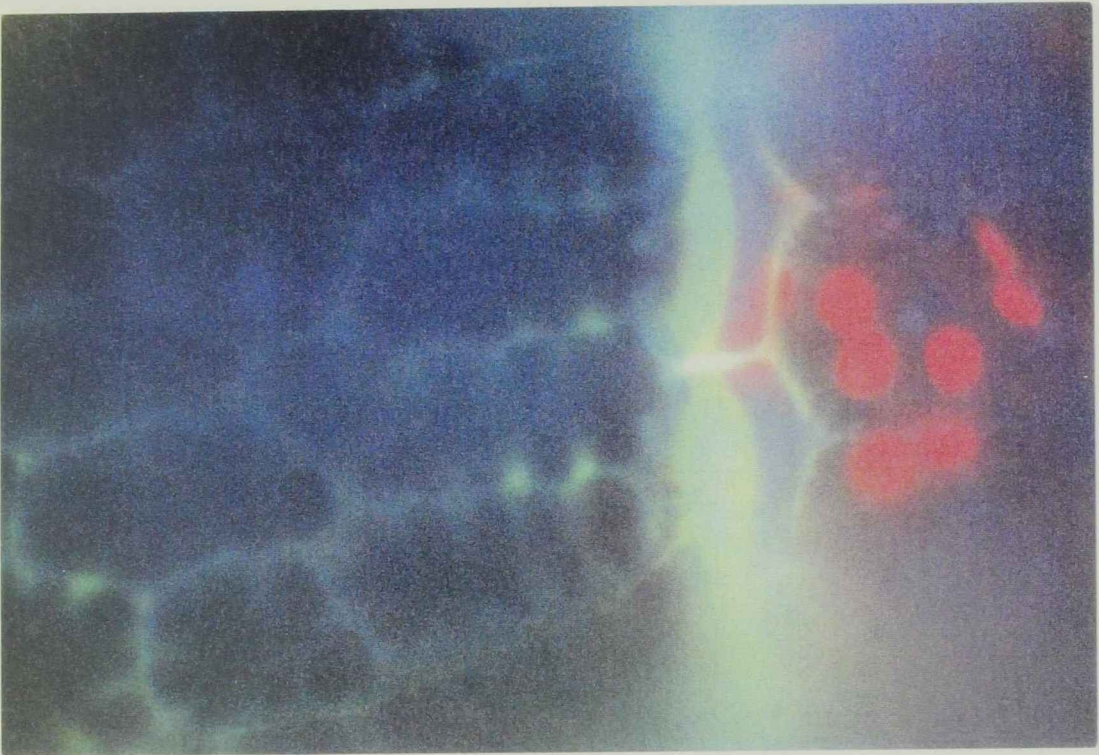


Abb.47: *Drosera capensis* x 1600, Drüsenköpfchen mit schwacher Fluoreszenz
3 h Pepsin und 20 min.LYCH

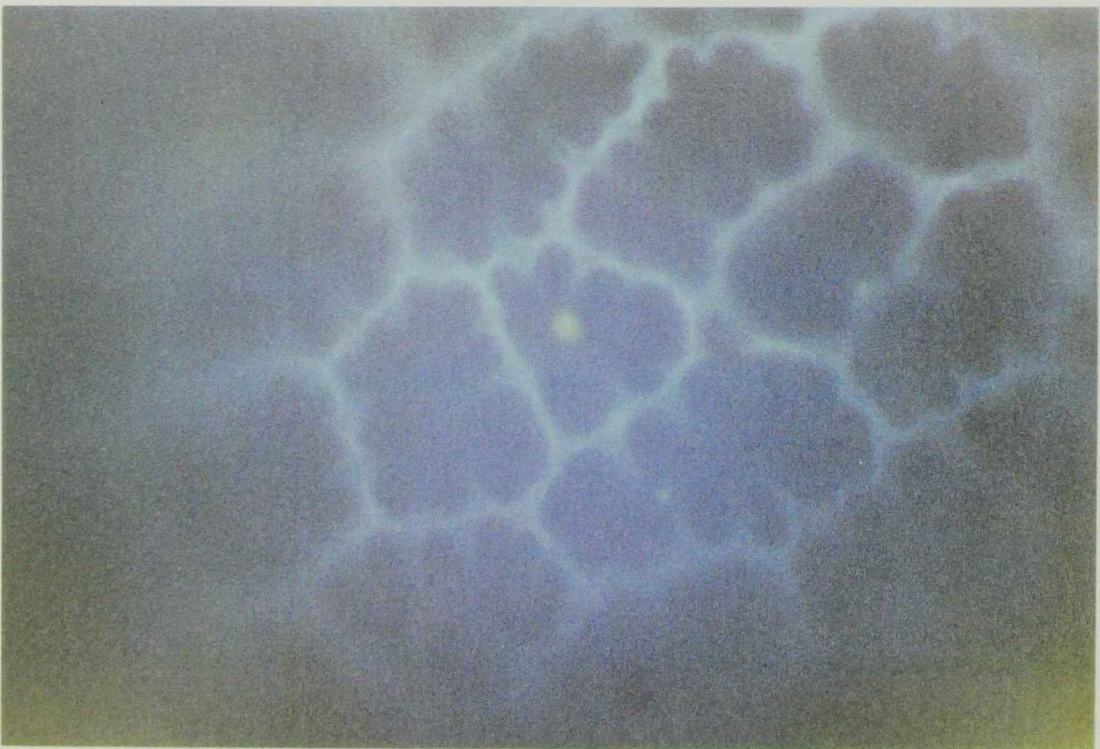


Abb.48: *Drosera capensis* x 1600, Drüsenköpfchen mit schwacher Fluoreszenz
und LYCH-Vesikel, 3 h Pepsin und 20 min LYCH

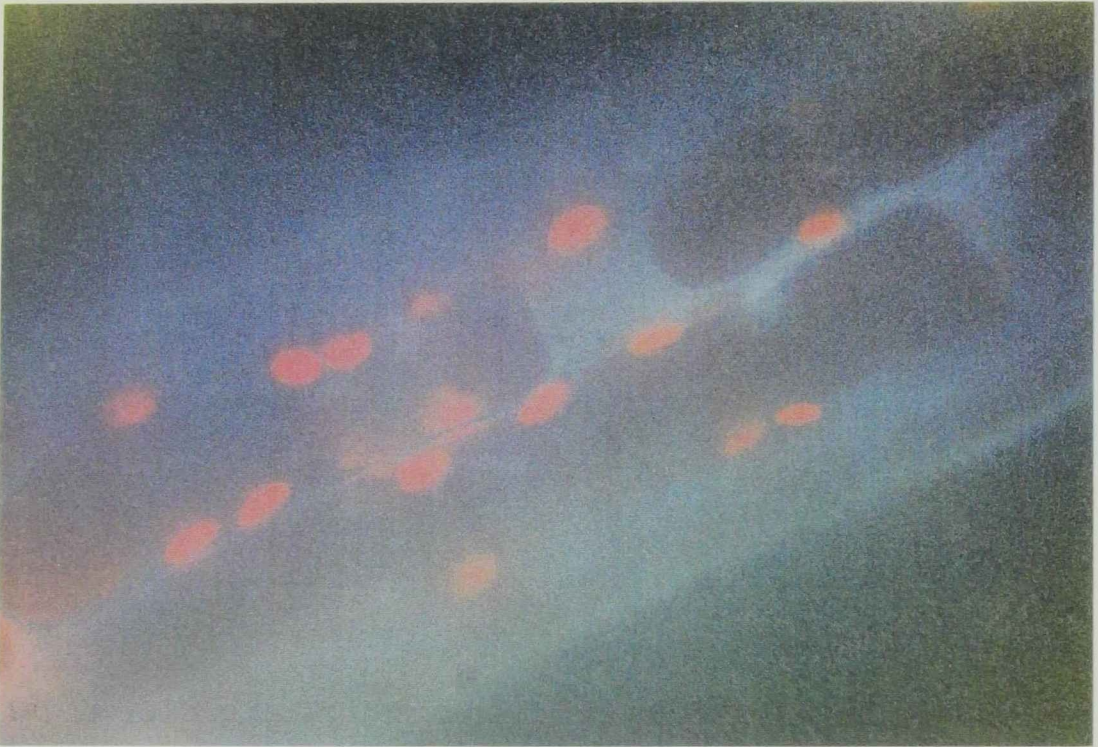


Abb.49: *Drosera capensis* x 1600, mittlerer Tentakelstiel mit schwacher diffuser Plasmafluoreszenz, 3 h Pepsin und 20 min LYCH



Abb.50: *Drosera capensis* x 1600, oberster Tentakelstiel, Aggregation, 3 h Pepsin und 20 min LYCH, 420nm und Hellfeld

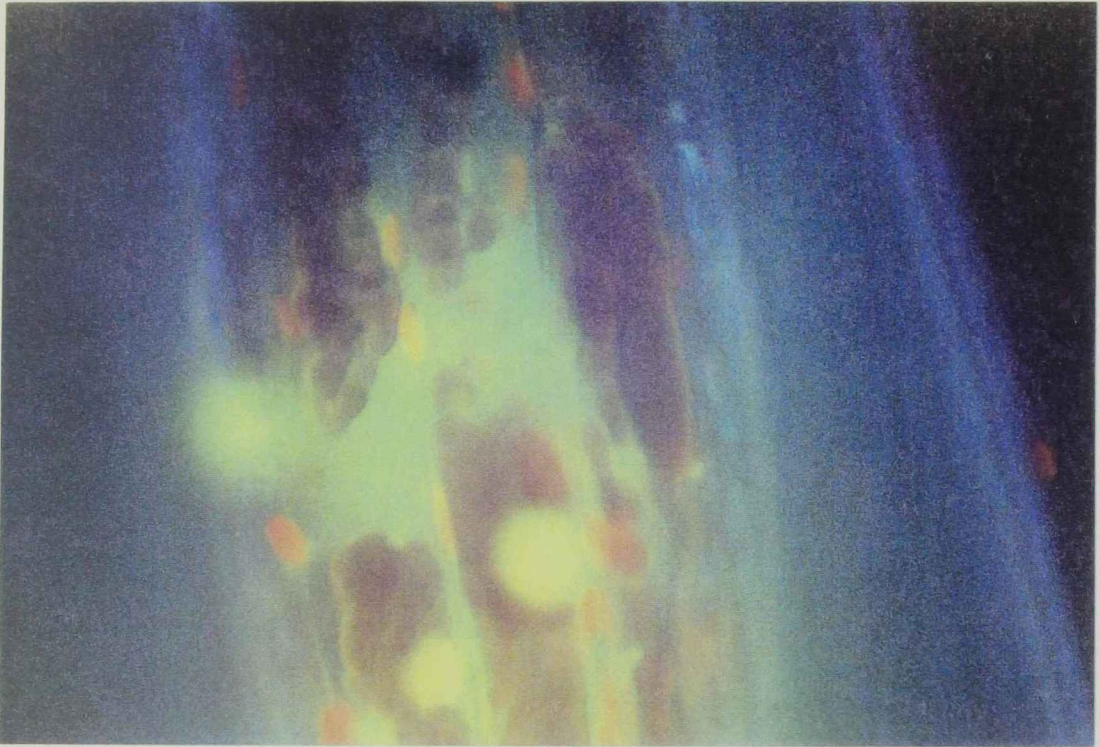


Abb.51: *Drosera capensis* x 1600, mittlerer Tentakelabschnitt, 20 min LYCH und 3 h Pepsin, LYCH-Kompartimente in aggregierten Zellen

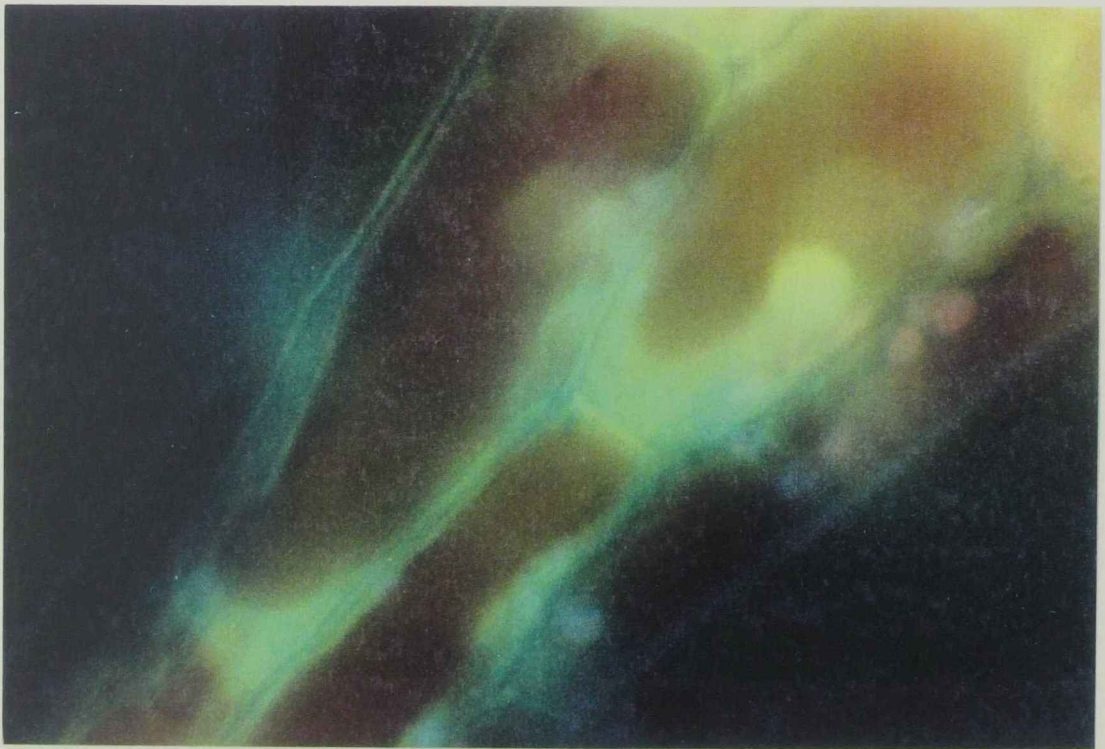


Abb30: *Drosera capensis* x 1600, oberster Tentakelabschnitt, 20 min LYCH und 3 h Pepsin, LYCH-Kompartimente in aggregierten Zellen

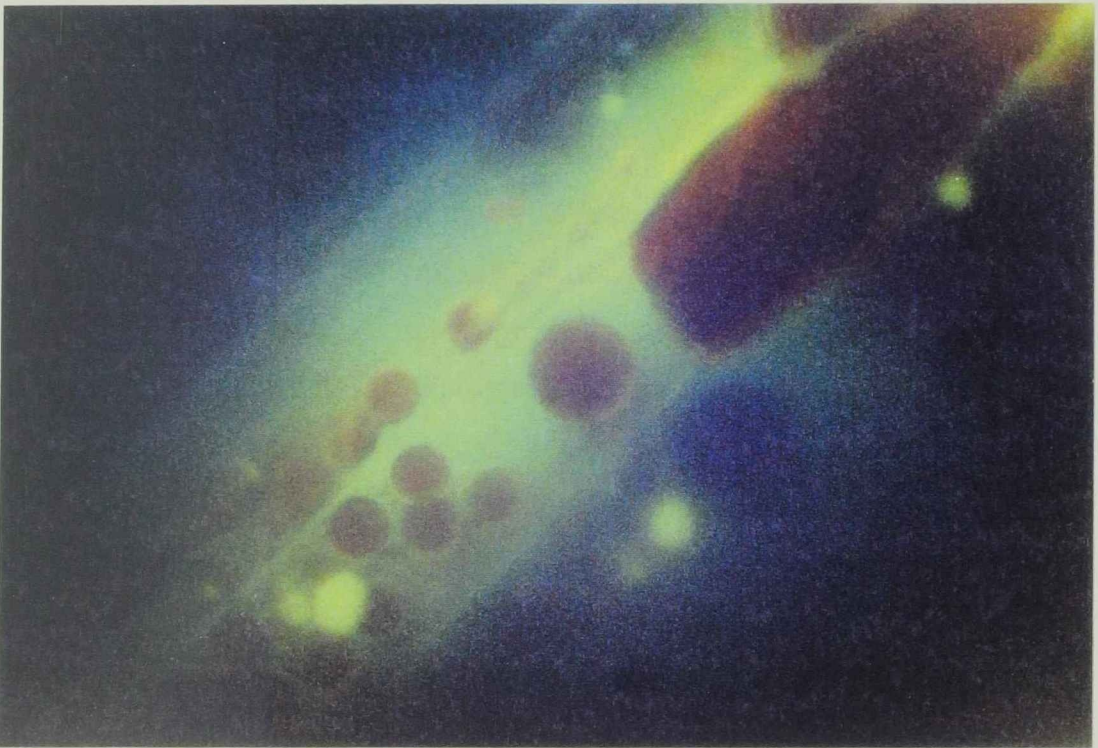


Abb.53: *Drosera capensis* x 1600, mittlerer Tentakelabschnitt, 20 min LYCH und 3 h Pepsin, LYCH-Kompartimente in aggregierten Zellen

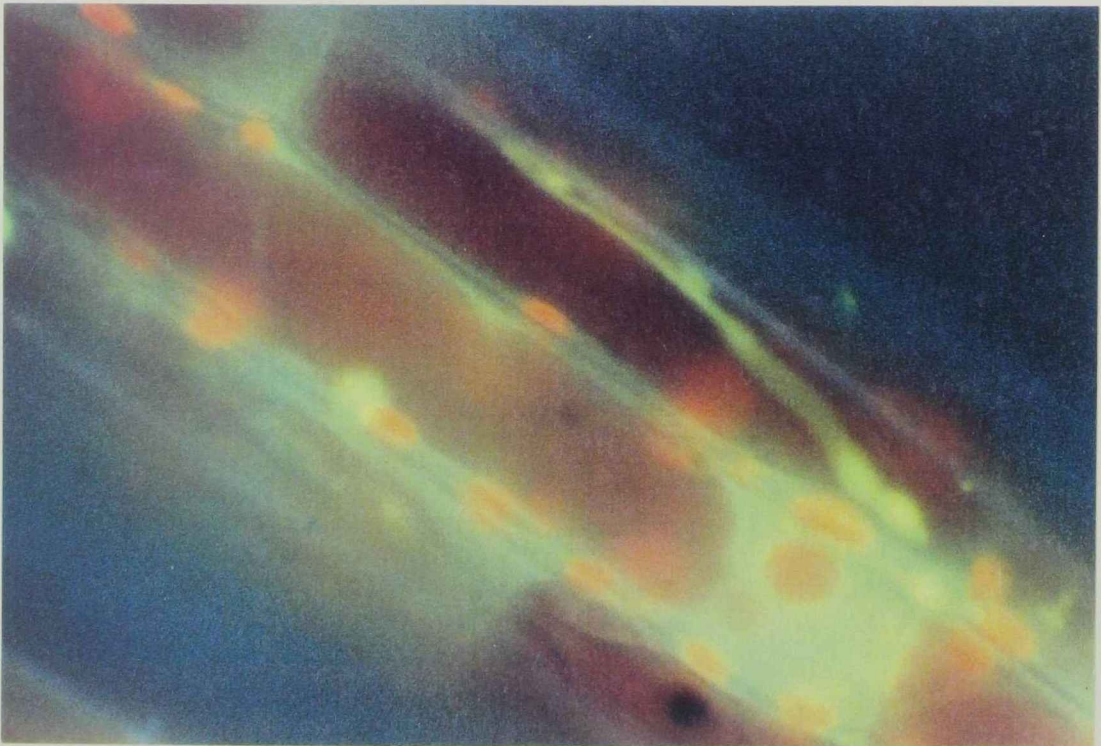


Abb.54: *Drosera capensis* x 1600, mittlerer Tentakelabschnitt, 20 min LYCH und 3 h Pepsin, LYCH-Kompartimente in aggregierten Zellen und fluor. Plasma

5. Versuche mit CytochalasinD

Cytochalasin ist ein Alkaloid und wird in der Zellphysiologie verwendet, um eine selektive Störung des Cytoskelettes herbeizuführen. Es setzt sich selektiv an das positive Ende der Aktinstränge und blockiert somit die Aktinmonomere bei ihrer Bautätigkeit. Gleichzeitig kommt es aber zum Abbau der Aktinfilamente vom negativen Ende her. Damit wird schließlich der gesamte Aktinstrang abgebaut.

Ich wollte wissen, ob die Aktinfilamente für das Ablösen der Vesikel von der Plasmamembran und bzw. oder für deren Wanderung innerhalb der Zellen verantwortlich sind. Eine Zerstörung derselben könnte demnach eine eingeschränkte oder verhinderte Endocytose zur Folge haben.

5.1. Versuchsdurchführung

Die Blattpräparate wurden in eine Lösung von $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ CytochalasinD und 5mM LYCH eingelegt. Sie blieben 20 Minuten in dieser Lösung.

5.2. Versuchsergebnis

Das Köpfchen zeigte fluoreszierende Zellwände und Cytosplasma. Es waren aber keine Endocytosevakuolen zu beobachten. Die Halskranzregion zeigt eine starke gelbe Emission (Abb.55).

Der Tracheidenstrang fluoreszierte durchgehend. In der Cytoplasmamatrix des Tentakelstieles konnte ich eine diffuse Fluoreszenz in den Epidermiszellen beobachten. Weder im Drüsenköpfchen noch im Tentakelstiel waren LYCH-Kompartimente zu sehen (Abb.56).



Abb.55: *Drosera capensis* x 800, Drüsenköpfchen mit fluoreszierendem Halskranz, CytochalasinD und LYCH



Abb.56: *Drosera capensis* x 800, Köpfchenbasis und oberster Tentakelstiel, CytochalasinD und LYCH, fluoreszierender Tracheidenstrang

IV. Teil: Diskussion

1. Die Endocytose in *Drosera capensis*

Meine Versuche haben gezeigt, daß die Tentakel von *Drosera capensis* Substanzen wie LYCH aufnehmen können, und daß diese Absorption im Drüsenköpfchen. Die kleinen Vesikeln mit gelbem Inhalt im Köpfchen sind eindeutige Strukturen, die auf eine Aufnahme des membraninpermeablen Stoffes in Form von Endocytose in die Zellen hinweisen. Diese Endocytosevesikel sind nur etwa $0,1\mu\text{m}$ groß und finden sich vor allem in den äußeren Drüsenzellen des Köpfchens, wo sie regelmäßig verteilt sind.

Ein weiterer Hinweis für die Verantwortlichkeit des Drüsenköpfchens für die Aufnahme von Lucifer Yellow durch Endocytose sehe ich darin, daß nach Zerstörung der Drüsenköpfchen, entweder durch Hitzeschädigung oder Zerstümmelung, keine Anzeichen für diesen Vorgang zu beobachten sind. In diesen Fällen kommt es zwar zu einer leichten Fluoreszenz des Plasmas und des Tracheidenstranges, aber Endocytosevesikel sind nicht vorhanden.

1.1. Die Aufnahme des Endocytosemarkers durch das Drüsenköpfchen von *Drosera capensis*

Lucifer Yellow liegt im Außenmedium in a. dest. gelöst vor. Diese Lösung dringt durch die Poren der Cuticula und stößt dort auf die äußeren Drüsenzellen. Der Endocytosemarker kann die Plasmamembran nicht frei permeieren. Die Plasmamembran wölbt sich ein, nimmt das Außenmedium auf und schnürt sich als Vesikel ab. Diese Endocytose-Kompartimente kann man deutlich als kleine Vesikel mit gelbem Inhalt beobachten. Diese Vesikel

verschmelzen, vielleicht mit Lysosomen, und werden in der Folge weitertransportiert. Die apikalen äußeren Drüsenzellen werden als die aktivsten beschrieben (Outenreath und Dauwalder, 1985) und diese Region ist auch besonders reich an cuticulären Poren. Nachdem die Endocytosevesikel aber regelmäßig über das Köpfchen verteilt sind, müssen entweder auch die lateralen Drüsenzellen zur Endocytose befähigt sein, oder die zahlreiche Plasmodesmen zwischen den Drüsenzellen sind für einen Transport von den apikalen zu den lateralen äußeren Drüsenzellen verantwortlich.

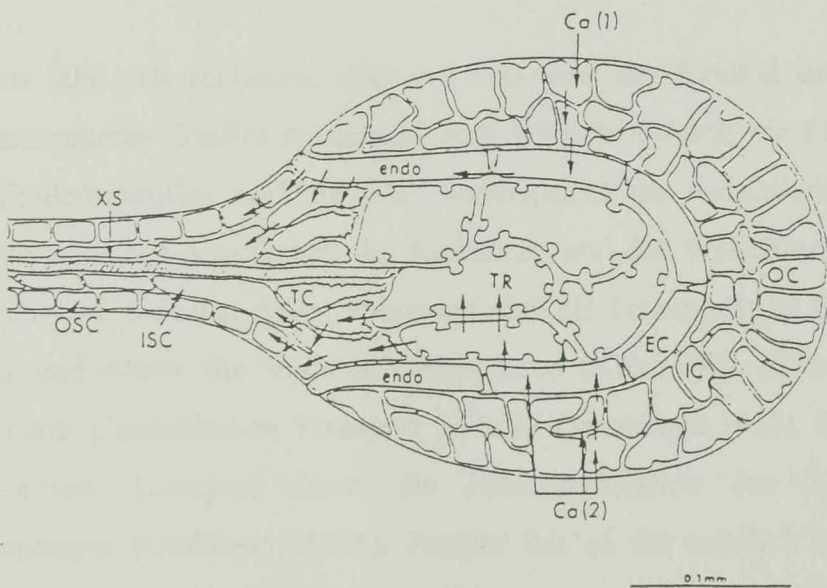


Abb.: nach Juniper et al. 1989: Drüsenköpfchen von *Drosera capensis*, TR: zentraler Tracheidenkomplex, EC: Endodermis, OC: äußere Drüsenzellen, IC: innere Drüsenzellen, TC: Transferzellen, XS: Tracheidenstrang, OSC: äußere Stielzellen (Epidermiszellen), ISC: innere Stielzellen (Parenchymzellen)

An der Basis des Köpfchens stoßen die Drüsenzellen auf die Endodermis. Diese Region ist besonders reich an Plasmodesmen und dementsprechend der wichtigste Ort für die Kommunikation zwischen Köpfchen und Tentakelstiel. Die Endodermis bietet in Form der Plasmodesmen einen Kontakt mit den Drüsenzellen in die eine Richtung, aber auch Kontakt mit den Epidermiszellen in die andere Richtung, nämlich zum Stiel hin und zu den Transferzellen, die schließlich die gesamte Basis des Köpfchens umschließen.

Nachdem ich die LYCH-Kompartimente in Form von Vesikeln und Schläuchen nur in den Epidermiszellen beobachten konnte, gehe ich davon aus, daß die Vesikel von der Endodermis direkt in die Epidermis weiterwandern und dort die auffälligen Strukturen bilden. Diese kommen wahrscheinlich dadurch zustande, daß die Vesikel mit weiteren Lysosomen und auch mit Teilen des ER's verschmelzen. Auf diese Weise erhält man aufgeblähte ER-Schläuche, die mit LYCH erfüllt sind. Solche aufgelähte ER-Abschnitte konnten auch im Elektronenmikroskop beobachtet werden (Lichtscheidl et al., in prep.).

Daraus läßt sich schließen, daß der Transport der Vesikel und damit des aufgenommenen Stoffes ausgehend vom Köpfchen durch die Endodermis in die Epidermiszellen verläuft. Das widerspricht im wesentlichen jeglichen Arbeiten, die auf dem Gebiet der Aufnahme und des Weitertransport getätigt worden sind. Kok war davon überzeugt, daß als Transportbahn durch *Drosera* einzig und alleine die Vakuole dienen kann (Kok, 1932). Schumann hat an einen rein plasmatischen Transport gedacht (Schumann, 1933). Oudmann ist von einem Transport durch die Parenchymzellen des Tentakelstieles ausgegangen (Oudmann, 1936). Juniper hat es für möglich gehalten, daß Endocytosevesikel durch den Tracheidenstrang zum Blatt transportiert werden (Juniper et al., 1986).

An einen Transport durch die Epidermis hat niemand gedacht. Allerdings ist diese Variante im Zusammenspiel mit der Aggregation durchaus logisch. Die Aggregation tritt neben den Drüsenzellen ebenfalls hauptsächlich in den Epidermiszellen des oberen Tentakelabschnittes auf. Sollte diese Zerklüftung eine Begleiterscheinung nach der Aufnahme von Stoffen sein, so sehe ich im Transport durch die Epidermis durchaus einen sinnvollen Vorgang. Abgesehen davon kommt es neben diesen auffälligen LYCH-Kompartimenten ja noch zu anderen Fluoreszenzerscheinungen, die nicht die Epidermis betreffen. Es kommt auch zu einer Fluoreszenz der Parenchymzellen, die mehr oder weniger stark sein kann. Kompartimente in Form von Schläuchen oder

Ähnlichem sind hier nicht vorhanden. Vielleicht liegt gerade in diesem Unterschied ein Hinweis für verschiedene Transportwege, je nach Art der Aufnahme bzw. vielleicht auch der Natur der Substanzen.

Außerdem haben meine Versuche auch gezeigt, daß es nach besonders langer LYCH-Einwirkung (ca. 24 h, siehe Kap. Versuche und Ergebnisse) zu einer Verlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes gekommen ist. Nachdem es zunächst zu den LYCH-Kompartimenten in den Epidermiszellen und zu einer schwachen diffusen Fluoreszenz des Plasmas sowohl in den Epidermiszellen als auch in den Parenchymzellen gekommen war, akkumulierte sich der Farbstoff nach 24 Stunden ausschließlich in den Parenchymzellen und das vor allem in der großen Zentralvakuole. Es mag durchaus sein, daß es hier zu einer zweckgebunden Verteilung der Substanzen kommt, je nachdem, wie diese benötigt werden.

Zusammenfassend kann man daraus schließen, daß die Drüsenköpfchen für eine Aufnahme in Form von Endocytose verantwortlich sind. Es ist natürlich nicht auszuschließen, daß ein Eindringen dieses Farbstoffes auch noch andere Gründe haben könnte, dafür wären zum Beispiel die diffuse Fluoreszenz des Plasmas oder eben auch die Fluoreszenz der Parenchymzellen, ohne den Endocytosekompartimenten, sowie der fluoreszierende Tracheidenstrang kräftige Hinweise. Für diese Erscheinungen gilt entweder ein anderer Aufnahmemechanismus oder bzw. und eine Verteilung des aufgenommenen Farbstoffes durch symplastischen Transport, unabhängig von der Art der Aufnahme.

2. Die diffuse Fluoreszenz des Protoplasmas

Bei meinen Versuchen kam es neben den Endocytose-Kompartimenten auch immer wieder zu einer diffusen Fluoreszenz des Plasmas der Köpfchendrüsenzellen wie auch der Zellen des Tentakelstieles. Diese trat unterschiedlich stark auf, manchmal war sie überhaupt nicht zu erkennen. Eine besonders starke gelbe Emission ging dann vom Plasma aus, wenn ich die Tentakel nach einer Reaktion mit Lucifer Yellow in Pepsin einlegte, und damit Aggregation auslöste. Das hat wahrscheinlich mit der Konzentration des Plasmas durch die Zerklüftung der Vakuolen zu tun. Die Fluoreszenz reichte manchmal nur über vier bis fünf Zellreihen, manchmal aber auch bis zur Basis des Tentakels. Es gab allerdings in diesem Zusammenhang keinerlei Regelmäßigkeiten, die diese Erscheinung erklären hätten können. Ich ziehe zwei Möglichkeiten in Betracht, wie es zu dieser diffusen Fluoreszenz des Plasmas kommen kann: Einerseits könnten die Endocytose-Kompartimente ihren Inhalt in das Plasma entleeren. Andererseits gibt es auch Hinweise, die auf einen aktiven Transport hinweisen, durch den Lucifer Yellow doch frei von außen in das Cytoplasma gelangen kann.

2.1. Entleerung der Endocytose-Vesikel

Eine Fusionierung der Vesikel mit Membranen unter Verlust ihres Inhaltes wäre durchaus möglich. Diese Strukturen sind jedoch sehr mobil. Sie scheinen sich zu dehnen, auseinanderzuziehen, im Plasma herumzuwandern und ständig ihre Form zu verändern. Dabei fusionieren kleinere Vesikel zu größeren unter Beibehaltung ihres Inhaltes. Nachdem diese Endocytose-Strukturen sehr lange erhalten bleiben und trotzdem von Anfang an eine diffuse Fluoreszenz im Plasma zu sehen ist, gäbe es keine Erklärung, warum sich manche Vesikel entleeren sollten, andere aber nicht.

In diesem Zusammenhang möchte ich auf einen Versuch hinweisen, der eine Entleerung von LYCH-Vesikel möglich gemacht hat. Liposome, die mit dem Endocytosemarker beladen sind, können durch Mikroinjektion in die Zelle gebracht werden und einen Transport des Farbstoffes in die Vakuole möglich machen: Sie fusionieren mit dem Tonoplasten und entlassen ihren Inhalt in das Cytosol (Madore et al., 1986).

2.2. Der Transport LYCH durch Anionencarrier

Andererseits besteht die Möglichkeit, daß Lucifer Yellow nicht ausschließlich durch Endocytose in die Drüsenzellen von *Drosera* kommen kann. Es gibt einige Hinweise, die zeigen, daß dieser Fluoreszenzfarbstoff auch durch „Anionen-Carrier“ die Plasmamembran überwinden kann.

Grundsätzlich gibt es unterschiedliche Argumente, die zu der Annahme geführt haben, daß LYCH nur in Vesikel verpackt die Plasmamembran durchdringen kann: Zunächst ist da die chemische Natur des Farbstoffes. Lucifer Yellow hat zwei negativ geladene Sulfonsäuregruppen, die es dieser Substanz eigentlich nicht erlauben die Plasmamembran zu permeieren (Steward, 1978). Weiters konnte in manchen Fällen beobachtet werden, daß sich der Farbstoff in der Vakuole akkumuliert, ohne daß das Cytoplasma eine Aufnahme gezeigt hätte; und das obwohl erwiesen ist, daß der Tonoplast für LY impermeabel ist. In diesem Zusammenhang wurde also angenommen, daß der Inhalt der Vesikel in die Vakuole entlassen wird und der Farbstoff nicht nur das Plasmalemma, sondern auch den Tonoplasten nicht frei passieren kann. Ein weiterer Hinweis dafür liegt in der Tatsache, daß LYCH nach einer Injektion in das Cytoplasma nie in der Vakuole nachgewiesen wurde. Damit konnte wieder bewiesen werden, daß LYCH den Tonoplasten nicht frei durchbrechen kann (Steinbiss und Stabel, 1983; Palevitz und Hepler 1985).

In tierischen Zellen betritt LYCH die Zelle durch „Fluid phase endocytosis“ (Wilcox und Franceschini 1984; Oka und Weigel 1989). Dementsprechend erlaubte man sich die Annahme, daß die Aufnahme von LYCH in pflanzliche Zellen genauso wie bei tierischen Zellen über den Vorgang der Pinocytose funktioniert.

Hier ist wichtig anzuführen, daß der Großteil der Arbeiten mit dem Endocytosemarker in der tierischen Zellphysiologie durchgeführt worden sind. Man hat daher auch zum ersten Mal bei tierischen Zellen erkannt, daß es einen Mechanismus gibt, der eine aktive Aufnahme von LYCH in Form eines Anionentransporters durch die Membran regulieren kann. Darauf aufbauend hat es eine Reihe von Versuchen mit Probenecid, einen in der tierischen Zellphysiologie häufig benutzten Inhibitor für den Transport für organische Säuren, gegeben (Cole et al., 1991; Oparka et al., 1991; O'Driscoll et al., 1991). Die Existenz von Anionentransportern im Endomembransystem tierischer Zellen wurde von Steinberg nachgewiesen (Steinberg et al., 1987). LYCH ist ein bivalentes Anion und akkumuliert in endosomalen Kompartimenten, wenn es durch die Plasmamembran mit Hilfe von ATP^{4-} in das Cytosol permeiert. Isolierte Endosomen von Macrophagen können ebenfalls LY aufnehmen. Dieser Transport benötigt kein ATP, ist allerdings pH und temperaturabhängig und kann durch Probenecid reversibel verhindert werden. Diese Ergebnisse erlauben die Annahme, daß LY die pflanzliche Vakuole in ähnlicher Weise erreichen kann.

Roszak und Rambour (1997) haben sich dementsprechend mit Suspensionskulturzellen von *Arabidopsis thaliana* auseinandergesetzt. Sie haben festgestellt, daß sich LYCH in einer Konzentration von 1mg/l in der Vakuole akkumuliert. Diese Ansammlung war Probenecid-abhängig und läßt die Annahme zu, daß zumindest der Transport in die Vakuole von Anionen-carriern abhängig ist. Umgekehrt wurde LYCH bei einer Konzentration von 0.1mg/l in das Cytoplasma transportiert und gelagert, konnte aber in der Vakuole nicht nachgewiesen werden. Daraus läßt sich schließen, daß der

Anionencarrier im Tonoplast nur eine geringe Affinität für LYCH aufweist, und dementsprechend bei geringen Konzentrationen nicht funktioniert. Auf alle Fälle konnten Roszak und Rambour nachweisen, daß die LYCH-Aufnahme zumindest bei Arabidopsis sowohl durch Endocytose als auch durch Anionentransport gewährleistet wird.

Andererseits haben Hilmer et al. gezeigt, daß Lucifer Yellow bei *Daucus carota* nur durch Endocytose in die Zellen aufgenommen wird und hier die Anwesenheit eines Anionen-carriers zu bezweifeln ist (Hilmer et al., 1988). Sie haben festgestellt, daß der Farbstoff nach einigen Stunden in der Vakuole akkumuliert. Dagegen konnte in der Vakuole von Protoplasten keine Fluoreszenz nachgewiesen werden. Obwohl die Inkubationszeit 12 Stunden betragen hatte, konnte man nur punktuelle Strukturen im peripheren Cytoplasma beobachten. Der Tonoplast ist ebenfalls undurchlässig für LY und eine Akkumulation in der Vakuole kann durch niedrige Temperaturen verhindert werden. Daraus schloß Hilmer, daß LY in Karottenzellen durch plasmamembran-zugehörige Vesikel in die Vakuole transportiert werden kann.

Zusammenfassend kann man daraus schließen, daß Lucifer Yellow vielleicht doch auch durch die Membran auf aktiven Weg in die Zelle gelangen kann. Die vorherigen Beispiele sollen zeigen, daß dieser Mechanismus in einigen Fällen nachgewiesen worden ist, bei anderen scheinbar nicht in Frage kommt. Für *Drosera* kann ich natürlich einen solchen Vorgang nicht ausschließen und vielleicht ist die diffuse Fluoreszenz tatsächlich eine Folge von Carriern in der Membran. Diese Fluoreszenz betrifft zunächst nur das Plasma der Drüsenköpfchenzellen und der Zellen des Tentakelstieles. Ein Eindringen des Farbstoffes in die Zentralvakuole konnte ich erst nach einer Dauer von 24 Stunden beobachten und das ausschließlich in den Parenchymzellen. Der Farbstoff hat sich dann von den Epidermiszellen in die Parenchymzellen verlagert. Das würde bedeuten, daß der Tonoplast der Parenchymzellen über einen besonderen Anionencarrier verfügen müßte, der also anders bzw. spezifischer wirkt als jener der übrigen Membranen; dieser Mechanismus

könnte mit einer besonderen Abfolge von Verarbeitung und Transport mit aufgenommenen Substanzen zu tun haben.

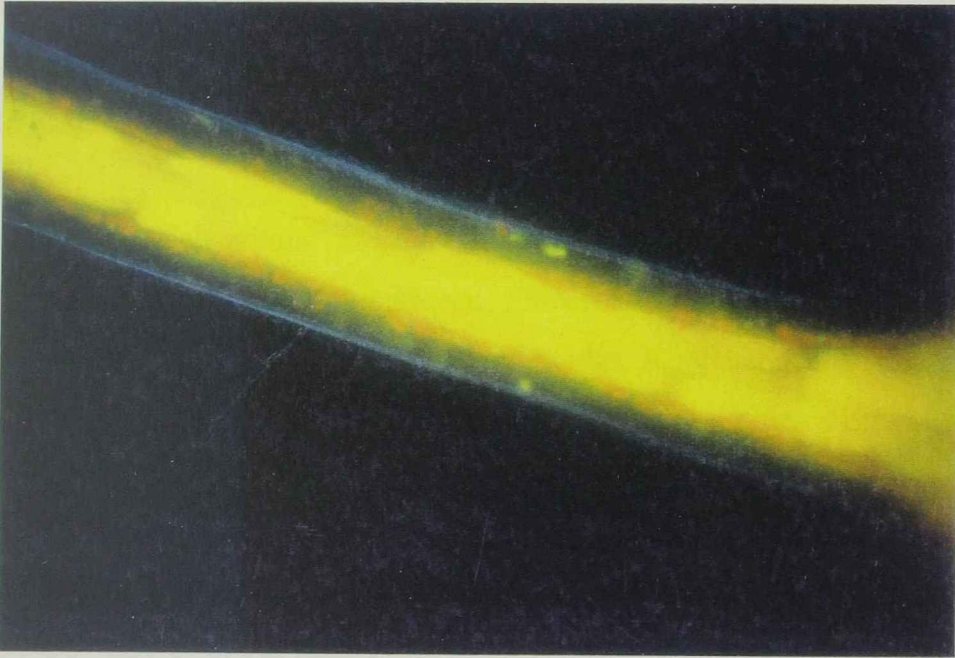


Abb.: *Drosera capensis* x 600 LYCH 5mM, 36 h, Farbstoff hat sich von den Epidermiszellen in die Parenchymzellen verlegt und akkumuliert sich in der großen Zentralvakuole

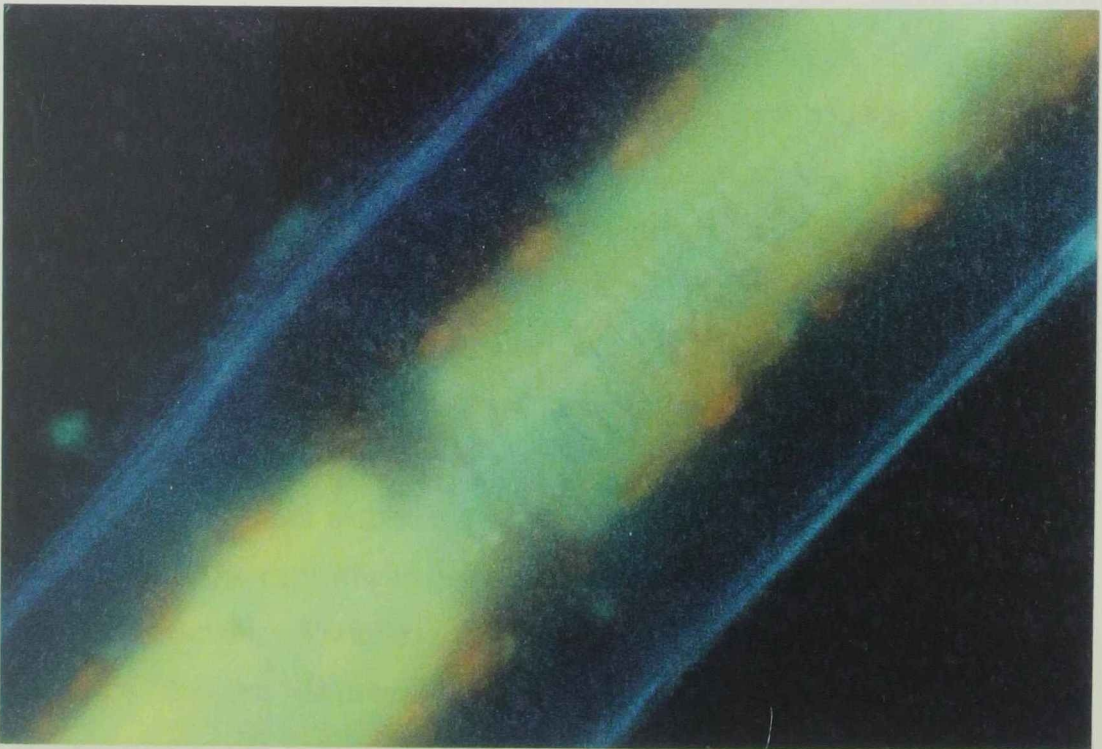


Abb.: *Drosera capensis* x 1600, LYCH 5mM, 24 h, gelbe Emission in den Parenchymzellen, keine LYCH-Kompartimente mehr in der Epidermis

3. Die Anfärbung der Zellwände

Die primäre Fluoreszenz von *Drosera* betrifft neben den Chloroplasten sämtliche cuticuläre Strukturen und liefert damit eine violette Emission des Halskranzbereiches, der äußersten Zellwände der Epidermiszellen im Tentakelstiel, der sessilen Drüsen und der Zellwände im Drüsenköpfchen.

Nach einer Behandlung mit LYCH kam es bei den Drüsententakeln von *Drosera* dann zu unterschiedlichen Fluoreszenzerscheinungen. Neben den Endocytosevesikeln in den Drüsenzellen des Köpfchens und der diffusen Fluoreszenz des Plasmas kam es auch zu einer Emission des Halskranzbereiches an der Basis des Köpfchens, der sessilen Drüsen und auch der Zellwände im Drüsenköpfchen selbst. Nach Kontakt mit LYCH war also die primäre Fluoreszenz nur noch in den Epidermiszellen des Tentakelstieles und teilweise auch bei den sessilen Drüsen zu beobachten. Die Zellwände des Drüsenköpfchens hingegen zeigten nun eine eindeutig gelbe Fluoreszenz und damit auch Aufnahme von LYCH.

Diese Anfärbung der Zellwände ist zunächst erstaunlich, ist doch das Köpfchen genauso wie die Epidermiszellen des Tentakelstieles durch eine Cuticula bedeckt. Diese Cuticula sollte eine Aufnahme von LYCH unmöglich machen. Die cuticuläre Schichte des Köpfchens ist allerdings durch Poren unterbrochen (Schnepf, 1962). Hier kann der Farbstoff eindeutig eindringen, aufgenommen werden und so eine gelbe Fluoreszenz der Zellwände verursachen. Ich hatte zunächst angenommen, daß die Aufnahme von LYCH auf die apikale Region des Köpfchens, also jene Drüsenzellen an der Spitze, die nach Schnepf am aktivsten sind und wo auch die meisten Poren sitzen, beschränkt ist. Die einheitliche gelbe Fluoreszenz der Zellwände im Köpfchen und die regelmäßige Verteilung der Endocytosevesikel zeigen allerdings, daß sämtliche äußeren Drüsenzellen zur Aufnahme oder zumindest zum Weitertransport des Farbstoffes und so auch der Vesikel befähigt sind.

Die Endodermis stellt möglicherweise tatsächlich eine Barriere für den apoplastischen Transport da, wie das bis jetzt von Endodermiszellen anderer Pflanzenorgane bekannt ist, sind doch die Zellwände des Tentakelstieles unterhalb von der Endodermis nicht mehr angefärbt. Sie zeigen nur mehr eine normale violette Primärfluoreszenz von Zellwand und Cuticula. An der Basis des Köpfchens dürfte der Farbstoff also dann auf dem symplastischen Weg die Endodermis durchkreuzen und so in das Cytoplasma der Zellen des Tentakelstiels aufgenommen werden. Eine direkte Aufnahme von LYCH durch die Zellwände des Tentakelstiels ist unwahrscheinlich, weil die Cuticula hier so besonders dick und impermeabel ist.

4. Der Transport von LYCH durch den Tentakel

Einmal in die Drüsenzellen aufgenommen, war der Transport des Endocytosemarkers LYCH durch die Drosera-Tentakel eine weitere Frage der vorliegenden Untersuchung. Daß die Aufnahme vom Endocytosemarker Lucifer Yellow selbst von den Drüsenköpfchen und wahrscheinlich auch zum Teil von den sessilen Drüsen übernommen wird, habe ich mit meinen Versuchen beweisen können. Die Fluoreszenz im Plasma der Drüsenzellen und vor allem die Vakuolen mit leuchtend gelben Inhalt zeigen eine gezielte Aufnahme durch das Köpfchen in Form von Endocytose. Die teilweise gelb gefärbten sessilen Drüsen weisen ebenfalls auf eine Aufnahme des Farbstoffes durch diese Strukturen hin. Nun ist es Stoffen nur auf dem symplastischen Weg möglich die Endodermis zu durchwandern. Diese ist ja durch den Caspary'schen Streifen nach außen hin abgeschlossen. Vom Köpfchen her kann also eigentlich keine Farbstoffaufnahme erfolgen. Sollte der Farbstoff durch verletzte Zellen am Blattgrund eintreten und so zum Tracheidenstrang vordringen können, wäre das eine Erklärung für dessen Fluoreszenz.

Wir müssen hier also drei Mechanismen der Aufnahme beobachten, nämlich einerseits die Entstehung von fluoreszierenden Endocytosevesikeln in den Drüsenzellen, andererseits die Diffusion von LYCH durch die Plasmamembran und drittens die Einlagerung von LYCH in die Zellwände sowie seinen apoplastischen Transport.

4.1. Die Möglichkeiten für den Transport eines Farbstoffes von Zelle zu Zelle

Der symplastische interzelluläre Transport von Substanzen erfolgt wahrscheinlich durch Plasmodesmen; diese sind in Zellen höherer Pflanzen von einem eng zusammengedrücktem Schlauch des Endoplasmatischen

Reticulums (ER), dem „Desmotubule“, durchzogen, welcher sich beiderseits der Plasmodesmen zu ER-Zisternen erweitert und so mit dem Endomembransystem des Cytoplasmas eine Einheit bildet. Für die Diffusion von Substanzen gibt es möglicherweise drei Wege, welche in der folgenden Skizze dargestellt sind:

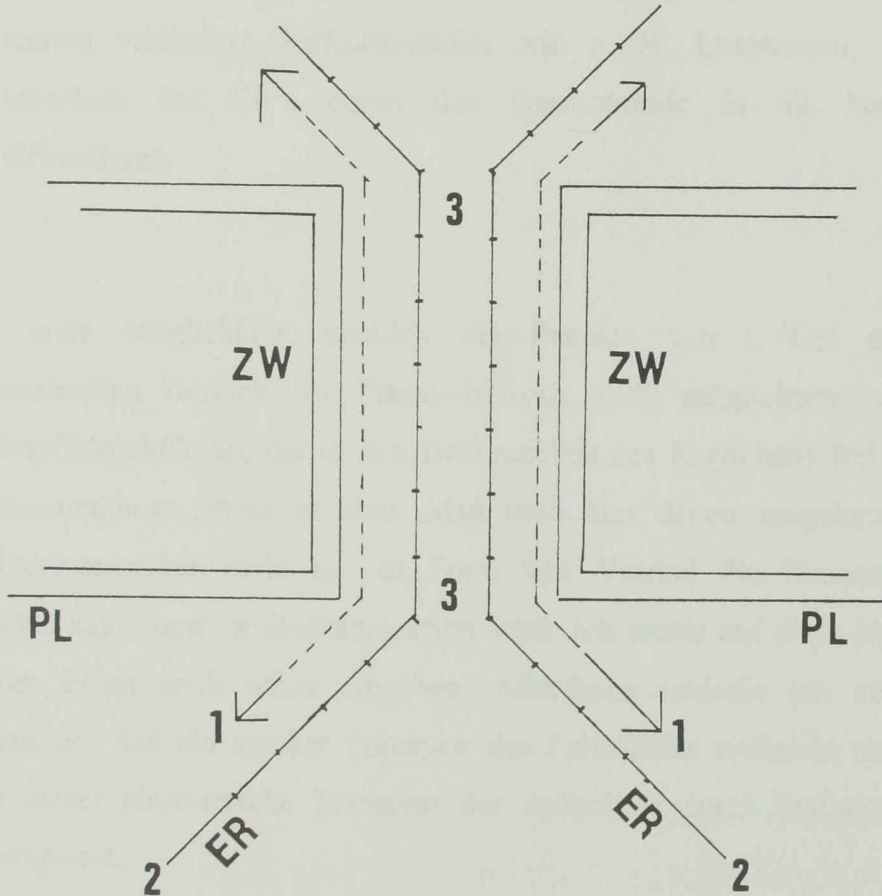


Abb.: Skizze der möglichen Transportwege von Zelle zu Zelle: ZW: Zellwand, PL: Plasmalemma, ER: Endoplasmatisches Retikulum (Membrane, Desmotubule)

1. Transport auf plasmatischen Weg: Die jeweilige Substanz befindet sich im Plasma und kann durch die Plasmadesmata in die Plasmaphase der Nachbarzelle eindringen.

2. Transport entlang der ER-Membranen: Die Substanz baut sich in die Membranen des ER und kann somit entlang dieser Bahnen in die Nachbarzelle vordringen.
3. Transport in Endocytosevesikeln: Die Substanz ist zunächst in Vesikeln verpackt, kann dann mit dem ER verschmelzen, zum Teil vielleicht über andere vesikuläre Zwischenstufen wie z. B. Lysosomen, und dann innerhalb des ER's durch den Desmotubule in die Nachbarzelle diffundieren.

Die erste Möglichkeit, nämlich die Passage von LYCH durch den plasmatischen Bereich der Plasmodesmata, trifft möglicherweise für die Farbstoffmoleküle zu, die in den Drüsenzellen des Köpfchens frei durch die Plasmamembran permeiert sind. Man muß hier davon ausgehen, daß der Endocytosemarker nicht nur in Form von Vesikel die Drosera-Tentakel betreten kann, bzw. weitertransportiert wird. Ich werde auf diese Möglichkeit in der Folge noch näher eingehen. Allerdings schließe ich aus meinen Versuchen, daß ein solcher Transport des Farbstoffes vielleicht möglich ist, aber dieser plasmatische Transport der Aufnahme durch Endocytose nicht widerspricht.

Ein Transport von Stoffen entlang der ER-Membranen, also wie in Punkt zwei aufgezeigt, wäre grundsätzlich für einen Farbstoff auch möglich, wenn er in die Phospholipidmembran eingebaut ist und dadurch innerhalb der Membran lokal diffundieren kann. Dieser Weg ist allerdings für LYCH ausgeschlossen, da der Endocytosemarker eindeutig in Vesikel verpackt ist und nicht in Membranen eingebaut wird.

Für LYCH ist der dritte Weg der wahrscheinlichste. Da in den Drüsenköpfchen eindeutige Endocytosevesikel beobachtet werden konnten,

werden diese also sehr wahrscheinlich mit dem ER von Zelle zu Zelle diffundieren.

4.2. Der Transport durch den Tracheidenstrang

In Anbetracht der ständigen gelben Fluoreszenz des Tracheidenstranges bleibt zumindest eine Überlegung hinsichtlich der Verteilung des Farbstoffes durch dieses Element bestehen. Immerhin ist die Aufgabe eines Tracheidenkomplexes der Transport und somit möchte ich diese Möglichkeit nicht von Anfang an ausschließen.

Tracheiden sind langgestreckte, am Ende zugespitzte Zellen, die in erster Linie der Wasserleitung dienen. Die Zellwände sind, der Leitungsfunktion entsprechend, stark getüpfelt, und zwar vor allem an den schräg gestellten Endwänden, um die Wegsamkeit in der Längsrichtung zu erhöhen. Die Schließhäute der Tüpfel sind nicht oder nur teilweise aufgelöst. Der plasmatische Inhalt ist im funktionsfähigen Zustand abgestorben.

Die hartnäckige Fluoreszenz des Tracheidenstranges machten eine genauere Untersuchung desselben notwendig. Nachdem die Fluoreszenz sich immer in Form einer gelben Spirale zeigte, war anzunehmen, daß LYCH, ähnlich wie bei der Cuticula, eine gewisse Affinität für dieses Element aufwies. Um mir der Sache sicher zu sein, ließ ich ein alkoholisches Präparat von *Sambucus niger*, das nur noch aus dem toten Holzteil bestand, mit LYCH reagieren. Das Ergebnis war eindeutig: Selbst nach unzähligen Waschgängen erstrahlte das Präparat unter dem Erregerlicht in einem satten Gelb. Ich konnte also nun davon ausgehen, daß der Endocytosemarker auf irgendeine Art und Weise mit dem Tracheidenstrang in Berührung kommen muß. Würde der Tracheidenstrang als Transportmöglichkeit in Betracht kommen, so wäre das vielleicht auch eine Erklärung für das fluoreszierende Plasma. Gelangt aber

LYCH nur durch Endocytosevesikel in das Innere der Tentakel, so könnte der leuchtende Tracheidenstrang und das fluoreszierende Plasma nur dadurch erklärt werden, daß die Vakuolen ihren Inhalt zu irgendeinem Zeitpunkt entleeren. Würde es andererseits auch zu einer Aufnahme von Lych, das in Wasser gelöst ist, vom Blattgrund her kommen, so wäre dies auch eine mögliche Erklärung für den gefärbten Tracheidenstrang.

Kok hat sich in seiner Arbeit „Über den Transport körperfremder Stoffe durch parenchymatisches Gewebe“ mit *Drosera* auseinandergesetzt. Dabei hat er zwei verschiedene Stoffe, nämlich das anorganische Salz LiNO_3 und das organische Koffein, bei deren Transport durch die Pflanze beobachtet. Ich möchte in diesem Zusammenhang auf seine Ergebnisse mit Koffein eingehen. Kok hat sich die Eigenschaft dieser Substanz, nämlich in der Vakuole mit Stoffen derselben Niederschläge zu bilden, zunutze gemacht um den Transport durch die Tentakel beobachten zu können. Ist der Niederschlag in der Vakuole aufgetreten, so hat er davon ausgehen können, daß Transport zwischen Zellen durch Diffusion stattgefunden hat. Mit dieser Methode hat er zunächst bewiesen, daß die Spiralgefäße keinen Einfluß auf die Transportgeschwindigkeit von Koffein haben. Zu keiner Zeit hat er einen weiter fortgeschrittenen Niederschlag in den Zellen um die Gefäßbündel gesehen. Daraus ergibt sich, daß das Koffein in der Hauptsache von Zelle zu Zelle geht und nicht durch die Gefäße.

Des weiteren hat er gezeigt, daß bei Beschädigung des *Drosera*-Tentakels Transport von Koffein sowohl basipetal als auch akropetal funktioniert. Der Niederschlag ist in beiden Richtungen gleich weit von der Wunde entfernt und somit ist kein polarer Transport vorhanden. Bei Beobachtung der Transportzeit dieser beiden unterschiedlichen Richtungen ist herausgekommen, daß an der Basis ein schnellerer Transport möglich ist. Das hängt vor allem mit den größeren Zellen zusammen, denn den größten Widerstand beim Passieren der Querwand bilden die beiden Protoplasmaschichten. Kok hat festgestellt, daß der Widerstand im Protoplast mit dem Tonoplasten bei *Drosera* etwa 160 mal

so groß ist, als der, welcher in der Vakuole vorhanden ist. Also kommt er zu dem Schluß, daß die Vakuole als wichtigste Transportbahn angesehen werden muß (Kok, 1932).

Zu ganz anderen Ergebnissen gelangt Walter Schumacher 1933 bei seinen Untersuchungen über den Transport von Fluoreszein durch parenchymatisches Gewebe. Im Nervenstrangparenchym von *Curcubita* konstatierte er einen Transport des applizierten Stoffes durch das Protoplasma und nicht durch die Vakuole.

Oudman hat diese Methode übernommen, um zu erforschen auf welchen Bahnen Fluoreszein durch die Tentakel von *Drosera capensis* transportiert würde. Schon bald nach der Applizierung von Fluoreszein sieht man das wandständige Protoplasma in den Drüsenköpfchen aufleuchten. Diese Erscheinung pflanzt sich ziemlich schnell durch den Tentakelstiel fort. Auch hier dehnt sich die Erscheinung durch das wandständige Protoplasma aus. In der Vakuole läßt sich kein Aufleuchten wahrnehmen. Das Spiralgefäß zeigt auch kein Aufleuchten, so daß sich daraus schließen läßt, daß hierdurch kein Transport von Fluoreszein in basipetaler Richtung erfolgt, oder daß Fluoreszein nicht an Lignin bindet. Es muß für nicht unwahrscheinlich gehalten werden, daß durch den Tracheidenstrang nur Transport nach dem Drüsenköpfchen hin stattfindet. Einige Fluoreszein behandelte Tentakel hat Oudman schließlich plasmolysiert. Danach hat er eindeutig gesehen, daß der Farbstoff ausschließlich im Plasma und nicht in den Wänden vorhanden war. Dementsprechend faßt Oudman zusammen, daß Fluoreszein im Parenchymgewebe von *Drosera capensis* nur im Protoplasma transportiert wird (Oudman, 1936).

Für meine Versuche sind vor allem folgende Ergebnisse von Bedeutung: Der Transport von Koffein durch *Drosera* verläuft mittels Diffusion und zwar von Zelle zu Zelle und nicht durch die Gefäße. Außerdem ist der Transport nicht polar beschränkt, zumindest was die Diffusion durch die parenchymatischen

Zellen betrifft. Oudmans Versuche haben gezeigt, daß ein Transport von fluoreszierendem Farbstoff auf plasmatischem Weg in *Drosera* durchaus möglich ist und daß das Spiralgefäß daran nicht beteiligt ist.

Grundsätzlich ist es naheliegend, daß die Fluoreszenz des Tracheidenstranges daher kommt, daß Lucifer Yellow von der Blattbasis her mit dem Wasser in Richtung Köpfchen transportiert wird. Nachdem *Drosera* einen enormen Wasserbedarf aufweist ist ein ständiger Transport in Richtung Köpfchen unumgänglich. Allerdings spricht dem entgegen, daß es auch zu einer Fluoreszenz des Tracheidenstrang kam, wenn die Applikation des Farbstoffes nur am Köpfchen mittels einer Kapillare erfolgte. In diesem Fall ist LYCH niemals mit dem Blattgewebe selbst in Kontakt gekommen. Trotzdem war das Spiralgefäß gelb gefärbt und somit fand ein basipetaler Transport statt.

Ich glaube, daß der Tracheidenstrang einen Transport in beide Richtungen durchführen kann, wenn auch der in Richtung Köpfchen der bedeutendere ist. Die Hauptfunktion dieser Struktur scheint doch in der Wasserleitung zu liegen. Jenen Vorgang, an den Juniper (Juniper et al., 1989) gedacht hat, daß nämlich die aufgenommenen Stoffe in Form von Vesikel verpackte Einheiten durch den Tracheidenstrang in Richtung Basis transportiert werden, halte ich nicht für wahrscheinlich. Nachdem es neben dem Spiralgefäß niemals zu einer Fluoreszenz in Form von Endocytose-Kompartimenten gekommen ist und in den angrenzenden Parenchymzellen die diffuse Fluoreszenz des Plasmas, wenn überhaupt, nur sehr schwach vorhanden war, glaube ich, daß der Tracheidenstrang mit den Zellen des Tentakelstieles nicht in direkter Verbindung steht. Ich sehe in dieser Struktur eine direkte Verbindung zwischen Blatt und Köpfchen, die einen schnellen Transport vor allem von Wasser möglich macht.

5. Die Aufnahme durch die sessilen Drüsen

Neben den Drüsenzellen im Drüsenköpfchen von *Drosera* gibt es auch noch andere Drüsen. Dazu gehören die sessilen Drüsen, die als zwei- oder vierzellige Strukturen direkt am Tentakelstiel und am Blattgrund aufsaßen. Zusätzlich gibt es am Blattgrund noch kleine gestielte Drüsen, die komplizierter gebaut sind und eine cutinisierte Halszelle analog der Endodermis der Drüsentrantakel haben.

Ich wollte herausfinden, ob und wie diese Drüsen neben jenen im Drüsenköpfchen an der Stoffaufnahme beteiligt sind. Leider war es mir nicht gelungen, diese in einer geeigneten Weise zu isolieren. Ich bin aber mittlerweile zu dem Schluß gekommen, daß diese Strukturen keine wesentliche Rolle bei der Stoffaufnahme spielen. Trotzdem habe ich diese Drüsen, sowohl am Tentakelstiel, als auch am Blattgrund, während meiner Versuche nicht aus den Augen gelassen.

Darwin hat seinerseits gezeigt, daß sich deren Inhalt mit Goldchlorid und Silbernitrat schnell schwarz färbt und daß sich diese Erscheinung in den darunter liegenden Geweben fortpflanzt (Darwin, 1875). Rosenberg hat wahrgenommen, daß sich die Papillen in Methylenblau getränkt sehr schnell blau färben, während die Drüsenzellen im Köpfchen diese Farbe erst später annahmen (Rosenberg, 1899). Kok hat ebenfalls beobachtet, daß diese „Knöspchen“, wie er die sessilen Drüsen am Tentakelstiel nannte, permeabel für Koffein sind. Das Koffein war nicht nur in die sessilen Drüsen eingedrungen, sondern wurde auch in der selben Zellreihe entlang des Tentakels weitertransportiert. Anhand des Niederschlages, der von Koffein mit den Gerbstoffen der Vakuole gebildet wird, konnte er diesen Transport sowohl in akropetaler, als auch basipetaler Richtung verfolgen. Außerdem war auch ein Transport in die andere Richtung, also quer zum Tentakelstiel, aufgetreten (Kok, 1932).

Achtet man auf die Jahreszahlen, so kann man unschwer erkennen, daß all diese Arbeiten schon von langer Zeit durchgeführt worden sind. Neuere Untersuchungen auf diesem Gebiet fehlen vollständig. Auch ist Koffein als Testsubstanz denkbar ungeeignet, weil es aufgrund seiner lipophoben Eigenschaften eine hohe Permeationskonstante besitzt und frei durch die Plasma- und Vakuolenmembran diffundiert. In der Vakuole kommt es zur Niederschlagsbildung mit Anthocyan und Gerbstoffen. Dieser Niederschlag hat erlaubt, den Weg des Koffeins zu beobachten; er bewirkt aber auch gleichzeitig einen ständigen neuen Einstrom von Koffein in die Zelle, und dies ist mit dem Permeationseigenschaften von tierischem verdauten Eiweiß absolut nicht zu vergleichen.

Trotzdem weisen diese Beobachtungen darauf hin, daß eine Stoffaufnahme durch die sessilen Drüsen möglich ist. Auch in meinen Versuchen konnte ich zeitweise eine Aufnahme von LYCH beobachten. Manchmal bestand diese Aufnahme nur darin, daß anstatt der violetten, primären Fluoreszenz eine gelbe des Endocytosemarkers entstand. Manchmal jedoch konnte ich auch einen deutlich gelben Inhalt erkennen. Bei beiden Fällen war jedenfalls keine Gesetzmäßigkeit zu erkennen. Das Aufnahmeverhalten stand in keinerlei Verbindung mit der restlichen Aufnahme durch das Drüsenköpfchen. Auf jeden Fall konnte ich niemals einen Weitertransport des Farbstoffes in den Zellagen unter den sessilen Drüsen verfolgen. Ein solcher Transport läßt sich natürlich im Tentakelstiel nicht ausschließen, nachdem in den meisten Fällen bereits eine Fluoreszenz des Plasmas vorhanden war und dementsprechend ein Transport aus den sessilen Drüsen in den Stiel nicht unterschieden werden hätte können. Für jene Drüsen allerdings, die direkt auf dem Blatt aufsitzen, kann ich mit großer Sicherheit behaupten, daß trotz Aufnahme kein Weitertransport stattgefunden hat.

6. Versuche mit Cyanid

Meine Versuche mit dem Atemgift Cyanid haben deutlich gezeigt, daß eine Aufnahme des Endocytosemarkers LYCH bei Sauerstoffmangel nicht bzw. kaum möglich ist. Auch wenn teilweise eine gelbe Fluoreszenz der sessilen Drüsen und des Halskranzes an der Basis des Köpfchens auf eine Aufnahme hinwiesen, waren weder gefüllte Endocytosevesikel im Köpfchen, noch fluoreszierendes Plasma oder andere Strukturen zu beobachten.

Alle Organismen sind zur Energiegewinnung darauf angewiesen, Kohlenstoffverbindungen zu oxidieren, und zwar unabhängig davon, ob sie diese Verbindungen selbst aufgebaut haben oder energiereiche Verbindungen anderer Organismen verbraucht werden. Eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang spielen die Mitochondrien, an deren innerer Membran die Enzyme sitzen, die den stufenweisen Abbau der Zuckermoleküle und damit verbundenen Aufbau von ATP-Molekülen katalysieren. Man kennt eine Reihe von spezifischen Hemmstoffen, die den Elektronentransport über die Atmungskette blockieren. Sie greifen an bestimmten Redoxsystemen an, wie eben zum Beispiel das Cyanid. Dieses blockiert die Cytochromoxidase, ein Enzymkomplex der Atmungskette, der mit Sauerstoff reagiert.

Durch die Arbeiten von Arisz ist bekannt, daß die Aufnahme verschiedener Stoffe durch die Drosera-Tentakel aus dem Außenmedium oder ihr Transport in das Blatt oder beides durch Sauerstoffentzug und durch die Anwendung von Atmungsgiften beeinflußt werden kann. So hat er festgestellt, daß die Aufnahme von Asparagin bei Behandlung mit Cyanid vermindert werden kann. Diese Tatsache zeigt allerdings nur die Zusammenhörigkeit von Transport und Metabolismus, nicht aber wo genau dieser aktive Prozess lokalisiert ist. Er hat gezeigt, daß der Transport durch den Tentakel verhindert werden kann, nachdem die Köpfchen vom Tentakel entfernt worden sind. Das bedeutet, daß die Abhängigkeit des aktiven Transportes von Sauerstoff nicht nur auf jene Zelllagen beschränkt sein kann, die direkt mit dem Außenmedium

in Kontakt treten. Andererseits können diese Vorgänge auch nicht auf das Blatt beschränkt sein, denn sonst wäre eine Anhäufung der jeweiligen Substanz, die durch kontinuierliche Diffusion durch den Tentakel eindringen würde, im Blatt zu bemerken, was allerdings nicht der Fall ist. Arisz schließt daraus, daß der gesamte zelluläre Transport im Tentakel von der Atmung abhängig sein muß (Arisz, 1952).

Willenbrink hat sich mit der Störung des Siebröhren-Stofftransport auseinander gesetzt. Dabei hat er bewiesen, daß der Transport durch das Phloem durch Enzyminhibitoren verhindert wird, nicht aber durch Sauerstoffentzug (Willenbrink, 1957). Das bedeutet für meine Versuche, daß die Fluoreszenz des Tracheidenstranges, die trotz der Lähmung der Endocytose zustande gekommen ist, eine durchaus klare Erscheinung ist.

7. Versuche mit Pepsin

Drosera zeigt nach „Fütterung“ mit Pepsin Aggregation. Ausgehend von der Idee, daß eine Stoffaufnahme nach Stimulation nicht mehr notwendig bzw. vielleicht auch nicht mehr möglich ist, ließ ich die aggregierten Tentakel mit Lucifer Yellow reagieren. Die Ergebnisse zeigten, daß eine Aufnahme des Endocytosemarkers in aggregierte Zellen nur noch vermindert möglich ist. Ich konnte nur noch eine leichte Fluoreszenz im Halskranzbereich erkennen, sowie eine sehr feine, kaum mehr erkennbare Fluoreszenz des Plasmas im oberen Tentakelbereich.

Das cytologische Bild eines aggregierten Tentakels ist ganz anders gestaltet als das eines normalen. In nicht stimulierten Tentakeln besitzt jede Zelle eine große Vakuole, während bei der Aggregation mehrere kleine entstehen und sich das Plasma scheinbar auf Kosten der Vakuole ausdehnt. In diesem Zusammenhang möchte ich auf die Arbeit meines Kollegen Björn Sieberer verweisen, der sich ausgiebigst mit dem Phänomen der Aggregation beschäftigt hat. Jedenfalls scheint die Aggregation auch Auswirkungen auf die Strömungsgeschwindigkeit zu haben, die anscheinend nach Stimulation der Tentakel eine Beschleunigung erfährt. Auch hier möchte ich auf die Arbeit meiner Kollegin Barbara Weigel verweisen, die diesem Problem durch Messung der Organellenbewegung auf den Grund gegangen ist.

Kok hat festgestellt, daß der Koffeintransport in aggregierten Tentakeln langsamer stattfindet als in normalen, obgleich das Protoplasma schneller strömt und ein größeres Volumen einnimmt. Des weiteren hat er gesehen, daß in narkotisierten Tentakeln keine Änderung der Geschwindigkeit des Koffeintransportes stattgefunden hat. Daraus hat er geschlossen, daß eine Veränderung der Organellenbewegung, bzw. der Protoplasmaströmung keinen zwingenden Einfluß auf die Transportgeschwindigkeit hat. Zumindest ist eine Beschleunigung der Plasmaströmung keine Ursache für einen schnelleren Transport (Kok, 1932).

In meinen Versuchen, bei denen ich die Blattpräparate zuerst in die Lucifer Yellow-Lösung gebracht habe und anschließend in die Pepsinlösung, konnte ich keinerlei Unterschiede zu einer normalen Aufnahme dieses Endocytosemarkers bemerken. Die Zellen waren aggregiert und das Plasma gequollen, dementsprechend erschien das Plasma stärker fluoreszierend als in normalen Zellen. Trotzdem konnte ich wie immer kleine und große Vesikel, sowie schlauchförmige Strukturen mit stark gelb fluoreszierenden Inhalt erkennen. Ich sehe hierin eine Übereinstimmung mit Kok's Ergebnissen, daß nämlich die schnellere Plasmaströmung in aggregierten Zellen keinerlei Einfluß auf die Verteilung des aufgenommenen Stoffes hat.

Outenreath und Dauwalder (1987) haben gezeigt, daß etwa eine Stunde nach der Stimulation große Sekretvakuolen im elektronenmikroskopischen Bild zu beobachten waren, die jenen bei der Fangschleimaussonderung ähnlich sind. Nach weiteren zwei Stunden waren diese verschwunden, dafür die Golgi-Zisternen vermehrt vorhanden (Outenreath und Dauwalder, 1987). Diese Versuche wurden mit ausgereiften Tentakeln durchgeführt und das Ziel war es, die Beobachtungen Darwins, daß nämlich relativ alte Drüsenköpfchen nach Reizung wieder Fangschleim absondern können, ultrastrukturell zu beweisen.

Natürlich ist damit noch lange nicht gesagt, daß während der Reizung, also während der Aggregation des Plasmas, die Golgi-Aktivität erliegt und damit keinerlei Endocytosevesikel gebildet werden können. Die Bildung der Vesikel mit dem Fangschleimsekret erfolgt ja unabhängig vom Vorgang der Endocytose. Außerdem kommt es nach der Exkretion des Fangschleimes auch noch zur Aussonderung des Verdauungssekretes. Diese Ergebnisse sollen dementsprechend nur aufzeigen, daß es im Golgi-Apparat zu ständigen Veränderungen hinsichtlich der Vesikelproduktion kommen muß, um den Aufgaben der Drüsenzellen gerecht zu werden. Denn neben der Abgabe der Sekrete müssen die überschüssigen Produkte ja auch wieder abtransportiert werden. Nachdem diese beiden Wissenschaftler immer wieder daran erinnern, daß sämtliche ultrastrukturellen Veränderungen nur auf die äußere

Drüsenzellreihe des Köpfchens beschränkt ist, sehe ich deren Ergebnissen einen weiteren Beweis für die Aufnahme von Stoffen durch Endocytose in eben diese Zellen.

Hier ist auch erwähnenswert, daß bei mechanischer Reizung, also Auslösen der Aggregation mit nicht verdaubaren Elementen, eine verminderte Anzahl der Vesikel zu beobachten war, während die Golgi-Stapeln in gleichem Maße aufgetreten waren (Outenreath und Dauwalder, 1987). Auch wenn mechanische Reize Aggregation auslösen, ist diese nach meinen Beobachtungen niemals so stark gewesen, als bei Stimulation mit Eiweiß. Außerdem haben meine Versuchsergebnisse gezeigt, daß aggregierten Zellen, die nur durch das Abpflücken von der Pflanze in diesen Zustand gekommen waren, keine Schwierigkeiten bei der Aufnahme von Lucifer Yellow gezeigt haben.

Zusammenfassend haben meine Versuche mit Pepsin und Lucifer Yellow gezeigt, daß eine Aufnahme des Endocytosemarkers in aggregierte Tentakel, die mit Pepsin stimuliert wurden, nicht möglich ist. Ich sehe in diesen Ergebnissen einen weiteren Beweis für eine Stoffaufnahme durch Endocytose in die äußeren Drüsenzellen. Es erscheint auch als durchaus logisch, daß eine mit Nährstoffen versorgte Pflanze keine Stoffe mehr aufnehmen kann, bzw. die Stoffaufnahme grundsätzlich einstellt.

V. Teil: Anhang I

1. Zusammenfassung

Ich untersuchte die Frage ob und wie Substanzen in Blättern von *Drosera capensis*, einer carnivoren Pflanze, aufgenommen werden können und wie sie wohin weitergeleitet werden, da dieser Pflanze natürlicherweise verdaute, tierische Substanzen der Ernährung dienen. Als Modell für diese verwendete ich den Endocytosemarker LYCH, einen anionischen Fluoreszenzfarbstoff, der normalerweise nicht passiv in Pflanzenzellen diffundieren kann, sondern er wird, verpackt in kleine Vesikel, durch Endocytose in die Zelle aufgenommen und zeigt bei Anregung mit UV-Licht eine gelbe Emission.

Ich konnte feststellen, daß Endocytose in Drüsenköpfchen von *Drosera* stattfindet. Es kam zu einer Anfärbung der Zellen des Drüsenköpfchens. Die Zellwände zeigten eine einheitliche gelbe Fluoreszenz ober, bzw. außerhalb der Endodermiszellen, wahrscheinlich aufgrund der Poren in der Cuticula, welche Zutritt des Farbstoffes zu den Zellwänden und damit Diffusion im apoplastischen Raum erlaubten. In den äußeren Drüsenzellen fanden sich viele kleine fluoreszierende Vesikel, welche sich aufgrund von Endocytose des Farbstoffes gebildet hatten. Sie waren über das gesamte Köpfchen gleichmäßig verteilt. Dabei dringt LYCH aus dem apoplastischen Raum in die Drüsenzellen.

Die Cytoplasmamatrix, das Cytosol, zeigt manchmal, aber nicht immer, eine schwache diffuse Fluoreszenz, LYCH diffundiert hier möglicherweise unspezifisch durch „Anionencarriern“ ins Cytoplasma.

Der Vorgang der Endocytose ist energieabhängig. Das konnte ich mit dem Atemgift Cyanid zeigen. Wird die Atmung gehemmt, hört diese Form der Stoffaufnahme auf.

Nach dem Auslösen der Aggregation mit Pepsin waren auch keine Endocytosevesikel mehr zu sehen. Möglicherweise ist eine „gefütterte“ Pflanze zu irgendeinem Zeitpunkt „satt“.

Durch eine selektive Zerstörung der Aktinfilamente durch Cytochalasin wird die Endocytose verhindert, was darauf hindeutet, daß die Bildung oder die Abschnürung der Endocytosevesikel von der Plasmamembran eine Prozeß ist, der nicht freiwillig vor sich geht, sondern nur unter Beteiligung des Cytoskeletts.

Die sessilen Drüsen am Tentakelstiel und am Blattgrund, sowie die kleinen gestielten Drüsen am Blatt zeigten teilweise eine Aufnahme von LYCH. Einen Weitertransport von diesen Drüsen konnte ich aber nie beobachten.

LYCH wird vom Köpfchen in den Tentakelstiel weitertransportiert, denn auch die Epidermiszellen und die Parenchymzellen des Stiels fluoreszierten. Dazu muß LYCH die Endodermis auf symplastischen Weg durchwandern. Es bildete in den Epidermiszellen auffällige LYCH-Kompartimente in Form von dynamischen Schläuchen und Vesikeln im oberen Tentakeldrittel. Daß diese Fluoreszenz durch den Transport des LYCH aus den Köpfchenzellen zustande kam und nicht durch Diffusion des Farbstoffes via der Blattbasis in den zentralen Tracheidenstrang, bewies ich, indem ich die Köpfchenzellen mechanisch oder durch Hitze inaktivierte; in beiden Fällen hatten die Drüsenzellen eine schwache diffuse Fluoreszenz, aber es fanden sich keine LYCH-Kompartimente in den Zellen des Tentakels.

2. Überlegungen zu weiteren Versuchen

Meine Versuche zeigten, daß LYCH in Form von Endocytose aufgenommen werden kann, daß diese Aufnahme wahrscheinlich in den Drüsenköpfchen stattfindet, und daß ein Weitertransport des Endocytosemarkers möglich ist.

Sehr lange Einwirkungszeiten von LYCH haben aber auch gezeigt, daß es danach zu einer Verlagerung des Farbstoffes in den Parenchymbereich des Tentakelstieles kommt, dem möglicherweise ein selektiver Transport, je nach Natur oder Notwendigkeit der Substanz, zu Grunde liegt. Es scheint so, als würde LYCH zunächst in die Epidermis und erst dann in die Parenchymzellen transportiert werden, wo es schließlich zum Abtransport des Stoffes kommt. In diesem Zusammenhang wäre es nötig, der „ganzen“ Pflanze, und nicht nur dem isolierten Blatt, den Endocytosemarker anzubieten und damit den Weg der aufgenommenen Substanz verfolgen zu können. Denn dann wären alle dazu notwendigen Transportwege vorhanden, die in einem natürlichen System Voraussetzung sind.

Weiters wäre es interessant, die Aufnahmemechanismen von *Drosera capensis* mit einem fluoreszierendem Eiweiß nachzuvollziehen. LYCH hat sich zwar als Endocytosemarker bei dieser Pflanze gut bewährt, ein Protein würde allerdings dem natürlichen Vorgang näher kommen und damit eine reale Stimulation ermöglichen. Hier sollten sämtliche Versuche, die ich auch mit LYCH durchgeführt habe, zum Vergleich wiederholt werden.

Zusätzlich sollte nicht nur die Endocytose, sondern auch die Exocytose näher betrachtet werden. Der Vorgang der Schleimaußsonderung ist zwar elektronenmikroskopisch gut erforscht, am lebenden Präparat jedoch noch nicht beobachtet worden. Hier wäre eine Analysierung mit der Videomikroskopie vielleicht eine gute Methode.

3. Literaturliste

- Arisz, W. H. (1953): Absorption and transport by the tentacles of *Drosera capensis*. *Acta Botanica Neerlandica*, Vol. II, 1, 75-105
- Brauer, D.; Uknalis, J.; Triana, R.; Shu-I Tu (1996): Subcellular compartmentation of different lipophilic fluorescein derivatives in maize root epidermal cells. *Protoplasma* 192, 70-79
- Chandler, G. E.; Anderson, J. W. (1976): Studies on the nutrition and growth of *Drosera* species with reference to the carnivorous habitat *New Phytol.* 76, 129-141
- Chandler, G. E.; Anderson, J. W. (1976): Studies on the origin of some hydrolytic enzymes associated with the leaves and tentacles of *Drosera* species and their role in heterotrophic nutrition. *New Phytol.* 77, 625-634
- Cole, L.; Hyde, G.J.; Ashford, A. E. (1997): Uptake and compartmentalisation of fluorescent probes by *Pisolithus tinctorius* hyphae: evidence for an anion transport mechanism at the tonoplast but not for fluid-phase endocytosis. *Protoplasma* 199, 18-29
- Cole, L.; Coleman, J.; Kearns, A.; Morgan G. and Hawes, C. (1991): The organic anion transport inhibitor, probenecid, inhibits the transport of Lucifer Yellow in the plasma membrane and the tonoplast in suspension-cultured plant cells. *Journal of Cell Science* 96, 721-730
- Darwin, Ch. (1876): *Insectenfressende Pflanzen*. Stuttgart, 1876
- Domozych, D. S.; Nimmons, T. T. (1992): The contractile vacuole as an endocytic organelle of the chlamydomonad flagellate *Gloeomonas Kupfferi*. *Journal Phycol.* 28, 809-816
- Hillmer, S.; Quader, H.; Nicoud, R.; Robinson D. G. (1990): Lucifer Yellow Uptake in Cells and Protoplasts of *Daucus carota* Visualized by Laser Scanning Microscopy. *Journal of Experimental Botany*, Vol.40, No. 213, 417-213
- Juniper, B. E.; Gilchrist, A. J. (1976): Absorption and transport of calcium in the stalked glands of *Drosera capensis*. L. in „perspectives in experimental biology“ (Ed Sutherland, N.) 477-486, Pergamon Press Oxford, 1976
- Juniper, B. E.; Robbins, R. J.; Joel, D. M. (1989): The canivorous plants. *Academic press* 76, 1989

- Kok, A. C. (1932): Über den Transport körperfremder Stoffe durch parenchymatisches Gewebe. *Rec. d. trav. botan. Nerl.* **29**, 25-133
- Lichtscheidl, I. (1996): Osmotische Erscheinungen bei Pflanzenzellen Protoplasmaquellung und Vakuolenzerklüftung, *Drosera*. *Popl. Wiss. Film., Biol.* **22**, 305-318
- Lichtscheidl, I. ; Lancelle, S. A.; Hepler, P. K. (1990): Actin- endoplasmic-reticulum complexes in *Drosera*. Their structural relationship with the plasmalemma, nucleus and organelles in cells prepared by high pressure freezing. *Protoplasma* **155**, 116-126
- Lucas, W. J. (1995): Plasmodesmata: intercellular channels for macromolecular transport in plants. *Current Opinion in Cell Biology* **7**, 673-680
- Lüttge, U. (1983): *Ecophysiology of Carnivorous Plants*. *Encyclopedie of Plant Physiology*, Springer Verlag 1983
- Miller, D. K.; Griffiths, E.; Lenard, J.; Firestone, F. A. (1983): Cell killing by lysosomotropic detergents. *Journal of Cell Biol.* **97**, 1841-1851
- Morré, J. D. (1985): Exocytosis, endocytosis and recycling of membranes. *Structure and Properties of Cell Membranes*, Vol II, Benda-Verlag 1985
- Oparka, K. J.; Prior, D. A. M. (1988): Movement of Lucifer Yellow Ch in potato tuber storage tissues: a comparison of symplastic and appoplastic transport. *Planta* **176**, 533-540
- Oudman, J. (1936): Über Aufnahme und Transport N-haltiger Verbindungen durch die Blätter von *Drosera capensis*. *Reueil des travaux botaniques néerlandais* **33**, 352-433
- Oudman, J. (1935): Nährstoffaufnahme und Transport durch die Blätter von *Drosera capensis*. *Proceedings of the Section of Science*, Bd. **38**, 650-662
- Outenreath, R. L.; Dauwalder, M. (1982): Ultrastructural and radioautographic studies of the digestive gland cells of *Drosera capensis*, I. Development and mucilage secretion. *Journal of Ultrastructure Research* **80**, 71-88
- Outenreath, R. L.; Dauwalder, M. (1987): Ultrastructural and radioautographic studies of the digestive gland cells of *Drosera capensis*, II. Changes induced by stimulation. *Journal of Ultrastructure Research* **95**, 164-174

- Owen, T.P.; Platt-Aloia, Kathryn A.; Thomson, W. W. (1991): Ultrastructural Localization of Lucifer Yellow and endocytosis in plant cells. *Protoplasma* **160**, 115-120
- Palevitz, B. A.; Hepler, P. K. (1984): Changes in dye coupling of stomatal cells of *Allium* and *Commelina* demonstrated by microinjection of Lucifer Yellow. *Planta* **164**, 473-479
- Plattner, H. (1981): Membrane behaviour during exocytosis. *Cell Biology International Reports* **5**, 435-452
- Robinson, D. G.; Hedrich R. (1981): Vacuolar Lucifer Yellow Uptake in Plants: Endocytosis or Anion Transport: A Critical Opinion. *Bot. Acta* **104**, 257-264
- Rosenberg, O. (1899): Physiologisch-cytologische Untersuchungen über *Drosera rotundifolia*. L. Diss. Bonn
- Roszak, R.; Rambour, S. (1987): Uptake of Lucifer Yellow by plant cells in the presence of endocytotic inhibitors. *Protoplasma* **199**, 198-207
- Schmucker, Th.; Linnemann, G. (1958): Bedeutung der Carnivorie für die Versorgung der Pflanze mit Mineralstoffen. *Handbuch der Pflanzenphysiologie IV*, Springer Verlag 1958
- Schnepf, E. (1962): Zur Cytologie und Physiologie pflanzlicher Drüsen, I. Über den Fangschleim der Insektivoren. *Flora. Bd.* **153**, 1-22
- Schnepf, E. (1962): Zur Cytologie und Physiologie pflanzlicher Drüsen, II. Über die Wirkung von Sauerstoffentzug und von Atmungsinhibitoren auf die Sekretion des Fangschleimes von *Drosophyllum* und auf die Feinstruktur. *Flora Bd.* **153**, 23-58
- Schnepf, E. (1965): Die Morphologie der Sekretion in pflanzlichen Drüsen. *Bericht der deutschen Botaniker Gesellschaft* **78**
- Schnepf, E. (1969): Sekretion und Exkretion bei Pflanzen. *Physiologie des Protoplasmas, Band VIII*, Springer Verlag 1969
- Schnepf, E. (1972): Über die Wirkung von Hemmstoffen der Proteinsynthese auf die Sekretion des Kohlenhydrat-Fangschleimes von *Drosophyllum lusitanicum*. *Planta* **103**, 334-339
- Steinman R. M., Mellman I. S., Muller W. A., Chon Z. A. (1983): Endocytosis and the recycling of plasma membrane. *Journal of Cell Biology* **96**, 1-27

- Steinman, R. M.; Brodie S. F.; Cohn, Z. A. (1976): Membrane flow during pinocytosis. A stereologic analysis. *Journal of Cell Biol.* **68**, 665-1976
- Steward, W. W. (1981): Lucifer dyes: highly fluorescent dye for Biological tracing. *Nature* **292**, 17-21
- Topf, P. M.; Theis, M.; Stockem, W. (1996): Uptake and intracellular transport pathways of fluorescent lipid analogues in *Amoeba proteus*. *Protoplasma* **193**, 91-104
- Thum M. (1988): The significance of carnivory for the fitness of *Drosera* in its natural habitat. *Oecologia* **75**, 472-480
- Wartenberg, M.; Hamann, J.; Pratsch, I.; Donath, E. (1992): osmotically induced fluid-phase uptake of fluorescent markers by protoplasts of *Chonopodium album*. *Protoplasma* **166**, 61-66
- Weber F. (1940): Vitamin-C-Gehalt gefütterter *Drosera*-Blätter. Sonderdruck aus den Berichten der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Band **LVIII**, Heft 6, 370-372
- Weigl, B. (1998): Analyse der Organellenbewegung in Tentakel-epidermiszellen von *Drosera capensis*. Diplomarbeit an der Universität Wien
- Ziegenspeck H., Konopka K. (1929): Die Kerne des *Drosera*-Tentakels und die Fermentbildung. *Protoplasma* **7**, 62-71

4. DANKSAGUNG

ES IST VOLLBRACHT!

FÜR DIE UNTERSTÜTZUNG AUF DIESEM LANGEN, LANGEN, WEG GILT MEIN DANK VOR ALLEM FOLGENDEN PERSONEN:

PROF. DR. WALTER URL, DER MIR EINEN ARBEITSPLATZ AUF SEINER ABTEILUNG FÜR ZELLPHYSIOLOGIE UND KINEMATISCHE ZELLFORSCHUNG ZUR VERFÜGUNG GESTELLT HAT. ABGESEHEN VON SEINER UMFANGREICHEN ERFAHRUNG AUF DEM GEBIET DER MIKROSKOPIE UND PHOTOGRAPHIE, DER ER UNS GROSSZÜGIG TEIL WERDEN HAT LASSEN, HAT ER UNS MIT SEINEN WITZCHEN UND G'SCHICHTERLN IMMER WIEDER ERHEITERT UND WAR STÄNDIG BEMÜHT, UNSER ALLGEMEINWISSEN DEM EINES AKADEMIKERS ANZUPASSEN. EINEN BESONDEREN DANK ALSO AN DEN ZWEITGRÖSSTEN REISEFÜHRER ALLER ZEITEN

PROF. DR. IRENE LICHTSCHEIDL, DIE UNS ZWEI LANGE JAHRE BETREUT UND UNERMÜDLICH FÜR UNSER WEITERKOMMEN GESORGT HAT. SIE HAT KEINE MÜHEN GESCHEUT, UM UNS DAS LEBEN EINES WISSENSCHAFTLERS SO NAHE WIE MÖGLICH ZU BRINGEN. EIN DANKESCHÖN FÜR DIE GEDULD UND DIE RUND-UM-DIE-UHR-BETREUUNG!

DR. OOF OUD FÜR SEINE BEMÜHUNGEN IN SACHEN AMSTERDAM. ER HAT UNS DIESEN AUFENTHALT AN SEINER ABTEILUNG ERMÖGLICHT UND UNS MIT GROSSER SORGFALT BETREUT. AUSSERDEM HAT ER UNS DEN HÖCHSTEN BERG HOLLANDS GEZEIGT (60M) – VIELEN DANK FÜR DIESE BESTEIGUNG!

DR. INGEGORG PAULUZZI, FÜR IHRE GROSSARTIGE HILFSBEREITSCHAFT UND FÜR DAS ANGENEHME ARBEITSKLIMA.

MEINEM KOLLEGEN BJÖRN SIEBERER, DER MIR NICHT NUR EIN TAPFERER BEGLEITER AN DER UNIVERSITÄT VON AMSTERDAM GEWESEN IST, SONDERN MIR MIT SEINEM FLEISS UND SEINER (FAST) STOISCHEN RUHE IMMER EINEN SCHRITT VORRAUS WAR.

MEINER FREUNDIN UND KOLLEGIN BARBARA WEIGL, DER ICH MEINE ANGENEHMSTEN STUNDEN AN DER UNIVERSITÄT VERDANKE. ABGESEHEN VON IHRER TOCHTER HANNA, HATTEN WIR AUCH SONST IMMER EINE FRUCHTBARE ZUSAMMENARBEIT....

UND SCHLIESSLICH GANZ BESONDERS MEINER FAMILIE, DIE MEINE LAUNEN ALL DIE JAHRE GEDULDIG ERTRAGEN HAT. MEINEN ELTERN, FÜR DIE FINANZIELLE UNTERSTÜTZUNG UND ALLEN ANDEREN ANNEHMLICHKEITEN, UND MEINER SCHWESTER HEIDI FÜR DIE AUSHILFE IN DIVERSEN NOTFÄLLEN!

5. Lebenslauf

1. Mai 1971: geboren in Wien
Eltern: Helga Bauer, kfm. Angestellte
Reinhold Bauer, Spenglermeister
- 1977 – 1981: Volksschule der Gemeinde Wien
1220 Wien
- 1981 – 1985: Sigmund Freud Gymnasium, 1020 Wien
neusprachlicher Zweig
- 1985 – 1990: Höhere Bundeslehrsanstalt für
wirtschaftliche Berufe, 1040 Wien
Schulversuch: Humanwesen
- 1990 – 1991: Inskripton Universität Wien
Naturwissenschaftliche Fakultät
Studienrichtung Biochemie
- 1991 – 1998: Studienwechsel
Studienrichtung Biologie/Botanik
Wahlfach: Chemie
- November 1996: Beginn der Diplomarbeit
Institut für Pflanzenphysiologie
Abteilung Zellphysiologie
Betreuer: Prof. Dr. Lichtscheidl
6. August 1998: Diplomprüfung

VI. TEIL: ANHANG II

MICROMANIPULATION DER CHLOROPLASTEN MIT DER OPTISCHEN PINZETTE IN DROSERA CAPENSIS

„Mikromanipulation von Chloroplasten in Tentakelzellen von *Drosera capensis*“

Sonja Bauer und Björn Sieberer

Im Rahmen eines dreiwöchigen Aufenthaltes im Februar 1997 am Institut for Molecular Cell Biology, Section of Molecular Cytology der Universität Amsterdam war es den Autoren möglich, nach Anweisungen von Prof. Dr. Oof Oud und dem Techniker Jos A. Grimbergen mit einem Infrarot-Laser als Mikromanipulator in Tentakelzellen von *Drosera capensis* zu arbeiten.

Die Tentakelzellen und besonders die in der Regel festsitzenden Chloroplasten erwiesen sich als gut geeignete Untersuchungsobjekte für diese Methode.

Ziel der Lasermanipulation war es, herauszufinden ob und wie sich die festsitzenden Chloroplasten ablösen lassen.

Methode:

Die verwendete Apperatur setzte sich aus einem inversen Mikroskop und einem in den Strahlengang eingekoppelten IR-Laser zusammen. Die Steuerung des Laserstrahles erfolgte über ein computergesteuertes Spiegelsystem mittels Computerm Maus.

Durch seine spezifischen Eigenschaften (kohärent, monochromatisch) läßt sich Laserlicht exakt focussieren; der kleinstmögliche Focus hängt nur von der gewählten Wellenlänge ab. Die Wellenlänge (um die 1000 nm) des Laserlichtes richtet sich nach dem untersuchten Objekt, muß aber generell in einem Bereich liegen, in dem Wasser und biologisches Material einen niedrigen Absorptionskoeffizient haben. Das Focussieren des Lasers geschah mit dem Kondensortrieb des inversen Mikroskops.

Die Strahlungsintensität des Lasers ist nicht gleichförmig, sondern das Intensitätsprofil folgt einer Gaußschen Normalverteilung; im Focus ist die Strahlungsintensität am stärksten - sie nimmt mit zunehmender Entfernung von der optischen Achse und vom Focus ab.

Treffen Photonen des Lasers auf ein Objekt mit höherem Brechungsindex als das es umgebende Medium, erfahren sie, falls sie das Objekt auf der der optischen Achse zu-

gewandten Hälfte treffen, eine Ablenkung von der optischen Achse weg; in gleichem Maße erfährt das Objekt eine Ablenkung zur optischen Achse. Bei einer gleichmäßigen Strahlungsintensität würden sich die Effekte aller Photonen, die das Objekt treffen, aufheben; da aber die Strahlungsintensität im Focus am höchsten ist, wird das Objekt ebendorthin „gestoßen“ und arretiert (Objekte „springen“ in den Laserspot) - der IR-Laser fungiert somit als „optische Pinzette“.

Die im Amsterdamer Labor an den Laser angelegte Spannung betrug 800 mV; die elektrische Leistung durfte 1 W nicht überschreiten, da sonst aufgrund des Temperaturanstieges von 0.5°C pro 100 mW und abhängig von der Bestrahlungsdauer bald eine kritische Temperatur für lebende Objekte erreicht worden wäre. Tatsächlich stellte das Aufheizen der Objekte ein nicht zu unterschätzendes Problem dar - so gelang es (unbeabsichtigt) einige Male, den Zellsaft zu verdampfen und Membranen durch die Hitzewirkung zu denaturieren.

Während der Arbeit mit dem Laser mußten Laserschutzbrillen getragen werden, die Okulare des Mikroskopes waren mit Schutzkappen abzudecken. Die Detektion des Lasers konnte ausschließlich mit einer IR-sensitiven Videokamera erfolgen; dokumentiert wurde auf VHS-Bänder.

Die zeitweise mangelhaft erscheinende Qualität des Kamera-Bildes bzw. die Ähnlichkeit mit einem Interferenzkontrast-Bild läßt sich auf die Tatsache zurückführen, daß der Laser und die Feldblende der Lichtquelle nicht gemeinsam zentriert werden konnten (Problem mit der Köhlerschen Beleuchtungsanordnung).

Beobachtet wurde im Hellfeld mit einem 40x Objektiv und einem 100x Oel Objektiv; anstelle der normalerweise üblichen Objektträger wurden große Deckgläser als Objektträger verwendet, um Absorption und Streuung des Lasers zu minimieren.

Im Folgenden:

Videoband:

Die Szenen bis 0:00.47 stammen aus dem Wissenschaftlichen Film „Osmotische Erscheinungen bei Pflanzenzellen - Protoplasmaquellung und Vakuolenzerklüftung. Drosera“ (Film E 2970) von Irene Lichtscheidl und Walter G. Url, Institut für den wissenschaftlichen Film, Göttingen 1992.

- 0:00.10:

Laubblatt einer *Drosera rotundifolia* mit Drüsenteilakeln; rechts unten wird ein Insekt gefangen (24 B/s).

- 0:00.18:

Drüsenteilakel mit schleimüberzogenem Drüsenköpfchen; Makroaufnahme.

- 0:00.28:

Drüsenteilakel von Blattspreite aufwärts; Mikroaufnahme.

- 0:00.38:

Drüsenköpfchen mit köpfchennahen Stielzellen; Mikroaufnahme.

- 0:00.47:

Organellenbewegung in Tentakelstielzellen; wandständiger Plasmabelag, Vakuolen anthocyangefärbt.

- 0:01.04:

ungereizter Tentakelstiel von *Drosera capensis* mit Epidermis- und Parenchymzellen, mittig der Tracheidenstrang; in den Zellen ist die Organellenbewegung gut zu erkennen; focussierter Laserspot in verschiedenen Zellen.

- 0:01.40:

der Laserspot muß auf das schon focussierte Objekt focussiert werden; Überprüfung im Dunkelfeld.

- 0:02.00:

in einer Parenchymzelle werden verschiedene Partikel in der Vakuole vom Laser eingefangen; bei Ausschalten des Lasers verharren die Partikel noch ein paar Sekunden auf einem Fleck und zerstreuen sich dann in der Vakuole.

- 0:02.25:

Parenchymzellen längs der Tracheide; Vakuolenpartikel werden vom Laser eingefangen und durch die Vakuole bewegt.

- 0:02.46:

Epidermiszelle; ein Vesikel (der optisch dünner als der Zellsaft sein muß) von ca. 15 µm Durchmesser kann vom Laser nicht eingefangen, sondern nur vor sich hergeschoben werden.

- 0:03.15:

Epidermiszelle eines gereizten Tentakels; Manipulation am Tonoplast, die Vakuole scheint vom Laser geteilt worden zu sein.

- 0:03.35:

Epidermiszelle eines stark gereizten Tentakels; der Laser „durchmischt“ die zahlreichen Teilvakuolen, auch wenn sie durch die protoplasmatischen Bewegung mitbewegt werden.

- 0:03.42:

Epidermiszelle eines gereizten Tentakels; eine Teilvakuole dehnt sich bei Laserbestrahlung aus und zieht sich nach Abschalten des Lasers wieder zusammen.

- 0:04.00:

Parenchymzelle eines ungereizten Tentakels; festsitzende Mitochondrien lassen sich vom Laser nicht verschieben; rechts unten ein Teil der Tracheide.

- 0:04.22:

Epidermiszelle eines schwach gereizten Tentakels; Chloroplasten sind fest verankert und lassen sich - im Gegensatz zum Tonoplast - vom Laser nicht bewegen; die Organellenbewegung ist gut zu erkennen.

- 0:04.42:

Epidermiszelle mit fest verankerten Chloroplasten.

- 0:05.08:

Epidermiszelle mit festsitzenden Chloroplasten; trotz Laser-Bestrahlung eines Chloroplasten von 10 Sekunden konnte dieser nicht verschoben werden.

- 0:05.28:

Parenchymzelle eines schwach gereizten Tentakels; Laserspot in einer Plasmabahn mit starker Organellenbewegung, Chloroplasten sind fest verankert.

- 0:06.05:

Epidermiszelle eines schwach gereizten Tentakels; ein Chloroplast läßt sich durch den Laserspot seitwärts verschieben.

- 0:07.17:

Parenchymzelle eines ungereizten Tentakels; mehrere Chloroplasten lassen sich vom Laser versetzen bzw. abzupfen, ein Chloroplast denaturiert nach mehrmaliger Laser-manipulation.

- 0:07.43:

Epidermiszelle eines schwach gereizten Tentakels; ein Chloroplast läßt sich zwar mit dem Laser in der Mitte abheben, bleibt aber mit dem Rand weiterhin fest haften.

- 0:07.53:

Parenchymzelle eines ungereizten Tentakels; ein Chloroplast läßt sich abzupfen, bleibt aber an einer Stelle fest haften und klappt nach Entfernen des Laser wieder in seine Ausgangsposition zurück.

- 0:08.12:

Parenchymzelle eines ungereizten Tentakels; ein Chloroplast läßt sich abzupfen, bleibt aber an einer Stelle fest haften und klappt nach entfernen des Lasers wieder in seine Ausgangsposition zurück (vgl. obige Szene).

- 0:09.19:

Epidermiszelle eines ungereizten Tentakels; ein Plasmastrang wird durch den Laser hin- und herbewegt, Vakuolenpartikel werden eingefangen und ein Chloroplast läßt sich abzapfen - er kehrt aber nach Entkommen aus dem Laserfocus an seine ursprüngliche Position zurück; auch nach mehrmaliger Manipulation kehrt der Chloroplast wenigstens in die Nähe seiner Ursprungslage zurück.

- 0:09.57:

Parenchymzelle eines ungereizten Tentakels; mehrere Chloroplasten können bewegt werden.

- 0:10.16:

Epidermiszelle eines schwach gereizten Tentakels; ein Chloroplast kann abgezupft und weit durch die Zelle bewegt werden; von besonderem Interesse sind die Strukturen (Membranen und/oder Plasma), die der Chloroplast bei Abzapfen hinter sich herzieht und die ihn in seine Ausgangslage zurückzuziehen scheinen.

- 0:11.44:

Epidermiszelle eines schwach gereizten Tentakels; mehrere Chloroplasten werden bewegt; beim Versuch einen Chloroplast über den anderen zu ziehen fällt auf, daß der manipulierte Chloroplast nicht mehr in seine Ausgangslage zurückkehrt.



UB WIEN



+AM15723290X

Video - Benützung im Sonderleseraum



www.books2ebooks.eu