

DIE POLARITÄTSINDUKTION BEI DER EQUISETUMSPORE DURCH POLARISIERTES LICHT UND PARTIELLE BELICHTUNG

H. ETZOLD¹ und L. JAFFE

Botanical Laboratories, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pa., U.S.A.

Received April 2, 1962

SPEZIFISCHE Effekte des polarisierten Lichtes sind an einigen Pflanzenzellen beobachtet worden. Wenn man von der Chloroplastendrehung absieht [5], dann handelt es sich dabei immer um einen richtenden Einfluss auf die Keimung von Sporen, also um eine Polaritätsinduktion und um eine Beeinflussung der Wachstumsrichtung von Keimschläuchen oder Hyphen, also um einen Tropismus („Polarotropismus“). Immer erfolgt dabei die Ausrichtung entweder parallel oder senkrecht zur Polarisierungsebene. Bei allen sieben Objekten, bei denen eine solche Reaktion gefunden wurde, ist bekannt, dass auch einseitiges unpolarisiertes Licht polaritätsinduzierend bzw. phototropisch wirksam ist [1, 2, 7, 8]. So lag es nahe, auch bei den Equisetumsporen, dem klassischen Objekt für Polaritätsinduktion durch einseitiges Licht [3, 4, 9] eine entsprechende Reaktion auf polarisiertes Licht zu vermuten.

Diese Arbeit wurde im Anschluss an die Untersuchungen von Jaffe und Etzold [8] durchgeführt, wobei weitgehend dieselbe Methodik zur Anwendung kam. So sollte auch hier mittels vergleichender partieller Belichtung der Sporen versucht werden, unter anderem etwas über die Lagerung der absorbierenden Pigmentmoleküle auszusagen.

MATERIAL UND METHODEN

Sporen. — Es wurden Sporen von *Equisetum arvense* verwendet, die am 1. und 17. April 1961 von Prof. R. Erickson im Freien gesammelt worden waren und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Sie wurden bis zu ihrer Verwendung im Kühlschrank im feuchten Zustand aufbewahrt.

Das Medium. — Für die Keimung der Sporen wurde 1 oder 0,35 % Difco-Agar in einer Nährlösung folgender Zusammensetzung verwendet: 6×10^{-4} mol (0,148 g/l) $\text{MgSO}_4 + 6\text{H}_2\text{O}$; 7×10^{-4} mol (0,071 g/l) KNO_3 ; 8×10^{-4} mol (0,425 g/l) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 +$

¹ Jetzige Adresse: Erlangen, Botanisches Institut.

$4\text{H}_2\text{O}$; 5×10^{-4} mol (0,068 g/l) KH_2PO_4 ; und 0,001 % (0,01 g/l) Eisen-Tartrat. Dieses Medium wurde im Autoklaven 15 min lang bei 122°C sterilisiert.

Lichtquelle und Filter. — Ihre Anordnung war dieselbe wie bei Jaffe und Etzold [8] angegeben. Sie sollen hier nur kurz in ihrer Aufeinanderfolge aufgezählt werden: 1000 Watt Glühbirne—74 mm 0,4 mol $\text{CuSO}_4 + 0,05$ mol H_2SO_4 —Prisma zum Umlenken des horizontalen Strahls nach oben—Wrattenfilter 45 A (Blau)—Wratten Neutralfilter. Die Intensitätsmessung erfolgte mit einer Weston Photozelle, die bei dem verwendeten Blaulicht gegen eine Thermosäule geeicht war.

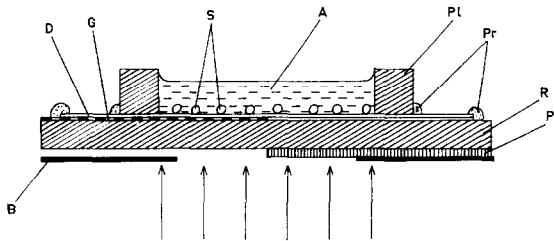


Fig. 1. — Schnitt durch die optische Anordnung zur partiellen Belichtung und Bestrahlung der Sporen mit polarisiertem Licht. A, Agar, B, Blende, D, Deckglas, G, Gelatineschicht mit schwarzen Streifen (stärker vergrößert), Pr, Paraffin zum Abdichten, Pl, Plastikring; Pf, Polarisationsfilter; R, Ronchi-Glasplatte; S, Sporen.

Die Versuchsgefäße und die optische Anordnung für polarisiertes Licht und partielle Belichtung zeigt Fig. 1. Als Versuchsgefäße dienten Kunststoffringe aus „Lucite“ (Polymethyl-metacrylat) von 2,4 cm innerem Durchmesser und 5 mm Höhe, die auf ein Deckglas von ca 0,15 mm Dicke aufgesetzt und mit Paraffin abgedichtet wurden. Für die partielle Belichtung wurde wieder ein System von schwarzen parallelen Streifen verwendet, die durch partielle Beschattung der darüberliegenden Sporen in diesen einen künstlichen Intensitätsgradienten hervorriefen. In diesem Falle wurden dazu die „Ronchi Rulings“ (Edmund Scientific Co.) verwendet: Glasplatten bei denen die Streifen auf der Oberfläche photographisch erzeugt worden waren. Die Streifen und der Raum zwischen ihnen waren 85μ breit. Da der Abstand zwischen den Sporen und den Streifen nur 150μ betrug, bewirkte die geringe Divergenz des einfallenden Lichtes von etwa $\pm 1^\circ$ auf Höhe der Sporen eine Verbreiterung des Übergangs von maximaler Helligkeit zu maximaler Dunkelheit von nur 5μ . Bei einem Durchmesser der Sporen von etwa 50μ konnte also nur ein geringer Teil von ihnen einem geschwächten Gradienten ausgesetzt sein. Die eine Hälfte der Kulturgefäße wurde mit polarisiertem Licht bestrahlt. Dazu wurde eine Hälfte der Glasplatte von der Gelatineschicht mit den Streifen befreit und darunter auf der Unterseite der Platte ein Polarisationsfilter vom H-Typ der Firma Polaroid befestigt. Die Temperatur betrug $23 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Die Auswertung. — Bei allen bisher behandelten Objekten wurde die Auskeimungsrichtung in Bezug auf die Polarisationssebene bzw. die Senkrechte zu den Streifen gemessen. Da hier im Blaulicht wie im Dunkeln praktisch keine Rhizoide auftraten, wohl aber die Abtrennung der Rhizoidzelle durch die inäquale Teilung, wurde die

Richtung der Trennwand gemessen. Diese steht ja senkrecht auf der Polaritätsachse oder der Richtung des Rhizoids.

So wurde die zu erwartende Keimungsrichtung direkt erhalten, indem eine um 90° gedrehte Bezugsrichtung gewählt wurde. Die Winkelmessung geschah wie bei Jaffe and Etzold [8]. Die Keimungsrichtungen wurden also wieder 36 Sektoren von je 10° zugeordnet.

Es wurden nur Sporen ausgewertet, die von ihrem nächsten Nachbar mehr als einen Sporendurchmesser entfernt waren. Als partiell belichtet wurden nur die Sporen betrachtet, die mit ihrem Umriss über eine Begrenzungslinie der schwarzen Streifen nach einer der beiden Seiten herausragten.

Das Mass der Reaktion wurde wieder durch die beiden Vektoren angegeben und zwar für die partielle Belichtung mit $V_1 = \sum p \cdot \cos \varphi$ (unipolare Orientierung) und für das polarisierte Licht mit $V_2 = \sum p \cdot \cos 2 \varphi$ (bipolare Orientierung), wobei p = Prozentsatz der Keimungsrichtungen, die den Winkel φ mit der Bezugsrichtung bildeten. Die Berechnung des mittleren Fehlers erfolgte nach Jaffe [7].

EXPERIMENTELLER TEIL

Versuch I. — Zwanzig Tage alte Sporen wurden im feuchten Zustand im Deckel einer Petrischale verteilt und durch leichtes Klopfen desselben über einer Petrischale mit 5 mm hohem Nährboden (1 % Agar) auf das Medium übertragen. Dies wurde mehrmals wiederholt, bis eine Sporenkonzentration von etwa 10 pro mm^2 erreicht war. Danach wurden jeweils vier Agarblöcke von 18×18 mm mit den Sporen aus der Schale ausgehoben und umgekehrt in die Versuchsgefäße auf das Deckglas gesetzt. Der freie Raum zwischen Agar und Plastikring wurde mit flüssigem Medium von 42°C aufgefüllt. Dann wurden die Versuchsgefäße in den Strahlengang gebracht und zur Herabsetzung der Reflektion von oben mit einer umgekehrten Petrischale bedeckt, an deren Unterseite schwarzer Samtstoff befestigt war. Es wurden sieben Intensitäten verwendet, die um je eine Zehnerpotenz gegeneinander abgestuft waren. Die Zeit, die zwischen dem Aufsäen der Sporen und dem Beginn der Bestrahlung verstrich, betrug bei den einzelnen Schalen 15–30 min. Nach 25–31 Stunden wurden die Schalen aus dem Strahlengang genommen und ausgewertet. Vorversuche hatten gezeigt, dass nach 24 Std. keine weitere Entwicklung stattfindet, die sensible Phase muss also längst abgeklungen sein.

Ergebnisse. — Im polarisierten Licht verläuft die Polaritätsachse unter allen Intensitäten, die noch eine Reaktion hervorrufen, parallel zur Polarisationsebene. Bei partieller Belichtung erfolgt die Keimung aus dem verdunkelten Teil der Spore. Die Sporen zeigen also qualitativ dasselbe Verhalten wie *Osmunda cinnamomea* [8]. Die quantitativen Ergebnisse zeigt Fig. 2. Wie bei allen bisher untersuchten Objekten verläuft also auch hier wieder die Intensitäts-Effektkurve der beiden Reaktionen einander weitgehend parallel. Die Sporen der beiden niedersten Intensitäten wurden zum Teil nicht ausgewertet, sie zeigten auch beim Betrachten keine Reaktion.

Versuch II. — Für den zweiten Versuch wurde die Methodik in ihrer Optik verbessert, um die Lichtstreuung herabzusetzen, indem die Agartiefe und -konzentration verringert und die Elateren entfernt wurden.

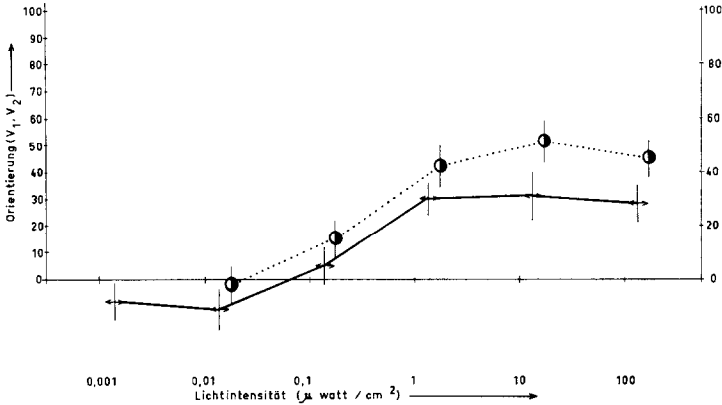


Fig. 2.

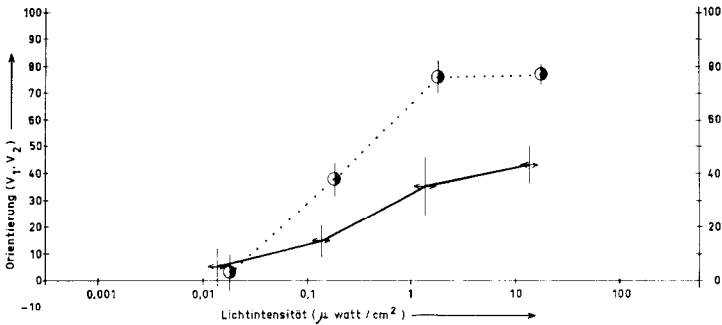


Fig. 3.

Fig. 2 u. 3. — Die Abhängigkeit der Reaktion auf polarisiertes Licht und partielle Belichtung von der Intensität des eingestrahlichten Lichtes. Fig. 2.—Versuch I. Fig. 3.—Versuch II. — polarisiertes Licht; ···· partielle Belichtung.

Das Alter der Sporen betrug elf Tage. Sie wurden im trockenen Zustand mit Nährlösung übergossen und anschliessend mit Hilfe einer Pipette heftig bewegt. Durch das plötzliche Befeuchten und die Bewegung wurden fast alle Elateren abgebrochen. Diese wurden dann durch Filtrieren durch Seidegaze entfernt. Die Sporensuspension wurde durch Sedimentieren von kleineren Partikeln befreit und auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Ein Tropfen dieser Suspension wurde in den Versuchsgefässen mit 0,6 ml Medium (0,35 % Agar) von 42°C gemischt. Die Tiefe des Mediums betrug somit etwa nur 1 mm. Die Sporenkonzentration war etwa 13 pro mm². Zur Verminderung der Reflektion von oben und der Verdunstung wurden die Versuchs-

gefäße mit einer umgedrehten Petrischale bedeckt, die 1 % Agar enthielt, der mit einem schwarzen „Millipore“-Filter bedeckt war. Danach wurden die Gefäße in den Strahlengang gebracht, wo die Sporen rasch auf den Boden sanken, noch bevor der Agar erstarrte. Die Zeiten zwischen Benetzen der Sporen und dem Versuchsbeginn betragen 27–37 min. Die verwendeten Intensitäten waren dieselben wie in Versuch I, nur die höchste Intensität wurde weggelassen. Die Schalen wurden nach 52–60 Std. aus dem Strahlengang entnommen und sofort ausgewertet.

Ergebnisse. — Fig. 3 zeigt, dass die wesentlichen Ergebnisse dieselben sind wie beim ersten Versuch, nämlich die Übereinstimmung der Intensitäten für den Schwellen- und den Sättigungswert der beiden Reaktionen. Die einzelnen Werte sind zum Teil recht verschieden, was wegen der verschiedenen Versuchsbedingungen leicht denkbar ist. Die Sporen unter den beiden niedrigsten Intensitäten wurden wieder nicht ausgewertet und zeigten auch keine sichtbare Reaktion.

DISKUSSION

Die Versuchsergebnisse liefern eine weitere Bestätigung der Annahme, dass bei allen Zellen, die durch einseitiges Licht polarisierbar sind, die Polaritätsachse auch durch die Lage der Schwingungsebene des polarisierten Lichtes bestimmt werden kann. Und nach den bisherigen Versuchen [2, 7, 8] erscheint die Folgerung durchaus berechtigt, dass bei den beiden Effekten dieselbe Grundreaktion vorliegt und dass die unterschiedliche Ausrichtung nur durch die verschiedene Absorptionsverteilung innerhalb der Zelle zustande kommt. Fig. 2 und 3 liefern mit ihrem weitgehend parallelen Verlauf der Kurven für partielle Belichtung und polarisiertes Licht eine weitere Bestätigung dafür. Die Ergebnisse mit partieller Belichtung zeigen, wie das schon Mosebach [9] durch projizieren eines Spaltes bei nur einer Intensität gezeigt hatte, dass die Keimung am dunkleren Pol erfolgt. Die Sporen verhalten sich also wie die von *Osmunda cinnamomea* [8], d. h., dass man auch hier wieder annehmen muss, dass an der Auskeimungsstelle im polarisierten Licht ein Absorptionsminimum herrscht, die Pigmentmoleküle dort also quer zur Polarisationssebene und damit parallel zur Zelloberfläche liegen. Diese Annahme ist hier natürlich nicht so sicher wie bei *Osmunda*, da eine alleinige Bedeutung der differentiellen Streuung [2] beim Effekt des polarisierten Lichtes durch weitere Versuche nicht ausgeschlossen wurde. Aber schon aus Homologiegründen muss man wohl annehmen, dass auch hier eine solche höchstens eine Verstärkung des Effekts bewirkt.

Die Ergebnisse mit polarisiertem Licht bestätigt auch die kürzlich er-

schienene Arbeit von Haupt und Meyer zu Bentrup [6], die bei Verwendung kurzer Belichtungszeiten und hoher Lichtintensität ebenfalls eine Ausrichtung der Rhizoide von Equisetum parallel zur Schwingungsebene fanden.

Fig. 2 und 3 zeigen auch, dass die erforderliche Dosis bei *Equisetum* wieder im selben Grössenbereich liegt wie bei den anderen nur auf Blaulicht reagierenden Sporen [8]. Damit ist die Annahme sehr nahe gelegt, dass bei allen diesen Objekten dasselbe Pigment die selben Primärprozesse einleitet.

SUMMARY

Previous studies showed that in all cells, and only in those cells, whose growth could be oriented by unilateral unpolarized light, growth could also be controlled by the plane of polarized light. It was inferred that both reactions are mediated by dichroic photoreceptor molecules oriented with respect to the cell surface; they differ only in the spatial pattern of light absorption in the cell.

The results in this paper agree with these general conclusions: spores of *Equisetum arvense* which are known to germinate away from unilateral blue light, germinate parallel to the vibration plane of polarized blue light and, if partially illuminated, out of the shaded part of the cell. The intensity effect curves for both reactions are very similar.¹

The results suggest strongly that both effects are mediated by the same pigment molecules oriented parallel to the cell wall.

LITERATUR

1. BÜNNING, E. u. ETZOLD, H., *Ber. Deut. Bot. Ges.* **71**, 304 (1958).
2. ETZOLD, H., *Exptl. Cell Research* **25**, 229 (1961).
3. HAUPT, W., *Planta* **49**, 61 (1957).
4. — *ibid.* **51**, 74 (1958).
5. — *Planta* **55**, 465 (1960).
6. HAUPT, W. u. MEYER ZU BENTRUP, F.-W., *Naturwissenschaften* **48**, 723 (1961).
7. JAFFE, L., *Exptl. Cell Research* **15**, 282 (1958).
8. JAFFE, L. u. ETZOLD, H., *J. Cellular Biol.* **13**, 13 (1962).
9. MOSEBACH, G., *Planta* **33**, 340 (1943).

¹ This investigation was supported by grants from the U.S. Public Health Service, and the National Science Foundation as well as by a contract with the Office of Naval Research.