



Invloed der temperatuur op de permeabiliteit van het protoplasma bij *Beta vulgaris* L.

<https://hdl.handle.net/1874/283154>

A. qu. 192, 1925

**INVLOED DER TEMPERATUUR OP DE
PERMEABILITEIT VAN HET PROTO-
PLASMA BIJ BETA VULGARIS L.**



DIRK DE VISSER SMITS

ht

INVLOED DER TEMPERATUUR OP DE PERMEABILITEIT
VAN HET PROTOPLASMA BIJ BETA VULGARIS L.

DIRK DE VRIES

Diss. Utrecht 1925

INVLOED DER TEMPERATUUR OP DE PERMEABILITEIT VAN HET PROTO- PLASMA BIJ BETA VULGARIS L.

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN
DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN
NATUURKUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSI-
TEIT TE UTRECHT. OP GEZAG VAN DEN
RECTOR-MAGNIFICUS DR. H. F. NIERSTRASZ,
HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER
WIS- EN NATUURKUNDE, VOLGENS BE-
SLUIT VAN DEN SENAAAT DER RIJKS-UNI-
VERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN
DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUUR-
KUNDE TE VERDEDIGEN, OP MAANDAG
29 JUNI 1925, DES NAMIDDAGS 3 UUR DOOR

DIRK DE VISSER SMITS

GEBOREN TE ZETTEN



G. C. T. VAN DORP & Co.
(SEMARANG-SOERABAJA-BANDOENG)
'S-GRAVENHAGE
1925

VOORWOORD.

Opgedragen in dankbaarheid en liefde:

Aan de nagedachtenis van mijn vader en

Aan mijn moeder.

VOORWOORD.

Als men, na jaren lang het vak van zijn keuze te hebben beoefend, het brengt tot het schrijven van een proefschrift, dan is dat in den levensgang van zeer bijzondere beteekenis, men staat stil als bij een mijlpaal en tuurt langs den afgelegden weg om den gezichtseinder te ontdekken, en het geestesoog tracht nog eens allen te aanschouwen, die ons pad hebben gekruist en ons den weg wezen of een eindweegs vergezelden om onder het gaan ons te leeren lezen in het groote boek der natuur.

Ik zie dan in de eerste plaats hem, die mij het eerst eenigszins vertrouwd maakte met de wetenschappelijke namen der wildgroeiende planten en wijd een woord van dankbare herinnering aan de nagedachtenis van *J. C. Slebos*, die bij de verdediging van zijn tweede vaderland voor Mafeking sneuvelde (17 Mei 1900).

Ik denk in de tweede plaats aan mijn vrienden *P. J. N. Brussaard* en *H. R. Hoogenraad*, die mij in de beoefening van de floristiek van Nederland en van de biologie in het algemeen voorgingen, en, doordat zij wat ouder waren, door hun voorbeeld mijn liefde voor de natuur hebben doen groeien. Naast hen dank ik aan *Dr. J. W. C. Goethart* menige aanwijzing en aanmoediging, zooals zoo vele jeugdige floristen uit dien tijd, en het is me een voorrecht hem hier daarvoor dank te brengen.

Als ik terugdenk aan den tijd, dat ik te Leiden studeerde, dan is mijn eerste woord er een van eerbiedige hulde aan de nagedachtenis van *Professor Dr. G. C. J. Vosmaer*; de herinnering aan zijn persoonlijkheid zal bij mij steeds levendig blijven.

In de tweede plaats Hooggeleerde *Janse* aan u een woord van dank voor uw lessen en vooral voor uw leiding bij de practische oefeningen op het laboratorium; ik heb veel van u geleerd.

Hooggeleerde *Martin*, uw opgewekte en leerzame college's zijn mij van groot nut geweest en ik ben u daar oprecht dankbaar voor.

Gij Hooggeleerde *Boeke* hebt mij te Leiden onderwezen in de

embryologie en van uw lessen heb ik de liefde voor dat vak mede gekregen, een omstandigheid, waarvoor ik u zeer erkentelijk ben.

Zeergeleerde *Lotsy*, uw lessen waren rijk van inhoud en bij uw instructie trachtte gij het wetenschappelijk besef bij uw leerlingen wakker te roepen en aan te kweeken, ik zal dat nimmer vergeten en breng u bij dezen dank voor het toen genotene.

Zeergeleerde *De Graaf*, van u leerde ik zoötomie en daar ben ik u erkentelijk voor, maar daarnaast was de omgang met u voor mij een voorrecht, dat ik thans nog gevoel, en uw fijne humor staat mij nog voor den geest. Het genoegen, waarmede ik dit neerschrijf, zal ongetwijfeld ook bij u weerklink vinden, als gij dit leest.

In Delft mocht ik van u, Hooggeleerde *Molengraaf*, de college's in de geologie volgen en zij behooren tot de meest enthousiaste, die ik ooit gehoord heb. Meermalen heb ik bij het beschouwen van het Javaansche berglandschap aan uw lessen teruggedacht en ze zijn me daar tot nut en een bron van genot geweest. Ik breng u hiervoor mijn oprechten dank.

Gij Zeergeleerde *Hubrecht* hebt mij in dien tijd voor verschillende onderdeelen der mineralogie onder uw leiding gehad, veel tijd hebt ge aan mij gegeven en uw geduld om mij de physiographie der mineralen bij te brengen was onuitputtelijk. We hebben elkaar later in het Verre Oosten verschillende malen ontmoet en nader leeren kennen en daarom stel ik het des te meer op prijs, dat ik u hier dank kan zeggen voor wat gij toen voor mij hebt gedaan.

Als ik kom tot den tijd, dien ik te Utrecht mocht studeeren, na een elfjarig verblijf in de tropen, dan is mijn eerste woord gericht tot u, Hoogleeraren van de faculteit der Wis- en Natuurkunde, die bij den Minister hebt aangedrongen om op mij artikel 133 van de wet op het Hooger Onderwijs van toepassing te verklaren. Dat gij, na een eerste weigering, hebt volhard, zoodat ten slotte de poorten der academie voor mij opengingen, is een omstandigheid, die ik nooit genoeg zal kunnen waardeeren en mijn dank, hoewel moeilijk onder woorden te brengen, zult gij allen naar ik hoop wel willen aanvaarden.

Hooggeleerde *Went*, hooggeachte promotor en hooggewaardeerde leermeester, toen ik hiervòòr dank bracht aan de faculteit, was ik even buiten de chronologische volgorde, want toen ik nog op Java vertoefde, ging er iets in mij om, dat eigenlijk

door uw persoonlijkheid, hoewel ik u nimmer had ontmoet, werd wakker geroepen. Van uw oudleerlingen, waarvan er verschillende eervolle ambten bekleeden in de Indische gemeenschap, had ik gehoord van uw groote gaven als leermeester. Onder de planters waart ge nog niet vergeten en, waar ik veel met hen verkeerde, hoorde ik u roemen als een onderzoeker van bijzondere verdienste voor de groote cultures. Dat was het, wat er mij toe bracht naar Utrecht te komen, om onder uw leiding opnieuw te gaan studeeren. Gij hebt onmiddellijk de eigenaardige omstandigheden, waarin ik verkeerde, begrepen en mij in alles gesteund en herhaaldelijk van uw groote welwillendheid blijk gegeven. Ik ben u zeer dankbaar, dat u mij indertijd in het stamboek, dat gij van uw leerlingen aanhoudt, hebt ingeschreven, want dat beschouw ik als een eer, en ik heb onder uw leiding de plantkunde beoefend dieper en breeder dan voorheen. Gij en uw vrouw geven zich zoo geheel voor de studeerenden van het Botanisch laboratorium, dat er een geheel eigene gezindheid ontstaan is, die het daar verkeereren voor mij tot een genot heeft gemaakt, niet alleen voor dien tijd, maar ook voor mijn verder leven van onschatbare waarde.

Moge het u gegeven zijn nog velen binnen te leiden in dien kring en hen mede te vormen tot plantkundigen, die later, door hun diensten aan de gemeenschap bewezen, met eere zullen genoemd worden als uw leerlingen, dat is mijn oprechte wensch.

Hooggeleerde *Pulle*, wanneer ik u dank breng voor uw onderwijs en uw leiding, dan wil ik daarbij iets memoreeren, dat u zal kunnen doen gevoelen, hoe hoog ik een en ander op prijs stel. Toen ik in Utrecht kwam, had ik de planten-systematiek reeds ernstig beoefend, doch in de planten-geographie slechts geliefhebberd. Uw heldere en zaakrijke college's hebben mij voor het eerst met dat vak vertrouwd gemaakt. De practische en duidelijke wijze, waarop gij de nieuwere begrippen der sociologie, der oekologie met haar onderdeelen enz., uiteenzette, is voor mij daarom van zoo groot belang, omdat ik in de gelegenheid zal zijn, de door u verworven kennis, naar Java teruggekeerd, in practijk te brengen. Ik zal aan u blijven denken als aan een leermeester, dien men zeer verplicht is.

Hooggeleerde *Westerdijk*, niettegenstaande ik een enkele maal een ongezochte gelegenheid had, mijn groote waardeering voor uw persoon en uw werk uit te spreken, grijp ik toch met groot

genoegen deze aan, om hier zwart op wit te stellen, dat ik u bewonder, in de eerste plaats om uw inhoudrijke college's en uw bijzondere wijze van voordragen, maar niet minder om uw leiding bij het practische werk. Ik heb te Baarn in betrekkelijk zeer korten tijd veel geleerd en dat was door uw groote kennis der phytopathologie en niet minder door uw voortdurende instructie's en demonstratie's bij de practische oefeningen. Dat het alleen door het inzicht mogelijk is, een groote menigte feiten in een bepaalde groepeerings vast te houden en tot ons levend eigendom te maken, is de weg, dien gij niet alleen uw leerlingen wijst, maar ook doet bewandelen. Ik dank u voor dat alles en voor het uitnemende voorbeeld, dat ik als docent in u heb mogen leeren kennen.

Hooggeleerde *Rutten*, gij zijt mij zeer ter wille geweest bij mijn voorbereiding voor het doctoraal examen. Gij hebt, zonder dat te zeggen, gehonoreerd, wat ik bij mijn vroegere leermeesters heb gewerkt en zodoende den weg voor mij geëffend. Ik dank dan ook mede aan u, behalve de studie van een onderwerp, waar nog nimmer mijn aandacht op was gevallen, de omstandigheid, dat ik betrekkelijk kort na het candidaats- het doctoraal examen kon doen. Ik betuig u hier daarvoor mijn bijzonderen dank.

Bij de bewerking van mijn proefschrift en bij de voorbereiding van mijn doctoraal examen hebben de assistenten van Professor Went en van Professor Pulle mij bijzonder aan zich verplicht. Ik ben hen daarvoor zeer erkentelijk, maar ik ben hun bovenal dankbaar voor hun hartelijke genegenheid en vriendschap, die mijn verloftijd gemaakt hebben tot een heerlijken tijd. Ik zal hen niet met name noemen, maar ik moet toch de Hoofdassistente daarvan uitzonderen. Zeergeleerde *Annie Hartsema*, is het niet de eerste maal, dat gij zoo in het „Voorwoord" van een proefschrift wordt aangesproken? Ik ben verheugd, dat ik de eerste mag zijn, om u met deze volledige aanspraak eens te zeggen, hoe uw hulp en voorlichting voor mij van zoo bijzondere waarde zijn geweest. Mijn tijd was beperkt en dat hebt ge begrepen. Gij zijt me, onder meer door het vlotte requireeren van toestellen en benodigdheden, van grooten dienst geweest, maar ook uw aanwijzingen omtrent literatuur waren voor mij van bijzondere waarde. Ik dank u hartelijk voor uw doeltreffende hulp, die ik niet licht vergeten zal.

Als ik verder na ga, wien ik dank heb te brengen in verband

met het verschijnen van dit geschrift, dan mag ik mijn zuster, *Mejuffrouw C. C. de Visser Smits*, niet vergeten, want zij heeft alle colorimetrische waarden voor mij omgerekend, een omvangrijk, tijdroovend en min onderhoudend werk, waarvoor ik haar hartelijk dank.

Den Amanuensis *P. A. de Bouter* hier nog eens mijn hartelijken dank voor zijn toewijding en goede zorgen. Ook den teekenaar, *A. de Bouter*, breng ik dank voor het keurige werk, dat hij voor mij maakte.

Nu zou ik dan aan het einde zijn, als ik niet twee vrienden van mij wilde noemen, die geheel buiten de plantkunde staan, maar die door hun belangstelling en door het geduldig aanhooren van mijn stellig voor hen wel weinig onderhoudende verhalen, en op tal van andere wijzen stimuleerend op mijn arbeidslust en uithoudingsvermogen hebben gewerkt. Het zijn *Mr. Th. H. Swindells* en *Mr. Dr. J. Wijnveldt*, die ik hiervoor dank wil brengen, een dank, waarvan ik bij voorbaat weet, dat zij dien zullen afwijzen.

Ik besluit dan met van mijn werk te zeggen, dat ik me niet inbeeld, ook maar een steen te hebben bijgedragen aan het gebouw der wetenschap. Het komt me meer voor te zijn een versch aangestroken voege bij een oud en verlaten gedeelte van een der hooge muren, een gedeelte dat de aandacht der meesters weinig heeft gehad. En als thans een bouwmeester daar langs komt, dan zal zijn aandacht getrokken worden door die versch gestreken voege en hij zal aan het werk van den gezet kunnen zien, dat die muur daar dringend voorziening behoeft.

INLEIDING.

Historisch Overzicht en Algemeene Beschouwingen.

Het vraagstuk van de permeabiliteit van het protoplasma in den meest uitgebreiden zin heeft, wellicht meer dan eenig ander, de aandacht der physiologen geboeid en dat is te begrijpen, als men bedenkt, dat de permeabiliteit der membranen het opnemen en afstaan van stoffen door de cellen der organismen beheerscht, zoodat alle processen van voeding en stofwisseling ten nauwste met dit onderwerp samenhangen.

De geschiedenis van het wetenschappelijk onderzoek der permeabiliteit begint met de ontdekking der osmose, waarvan *Sachs*¹⁾ de eer grootendeels toekent aan *Dutrochet*²⁾ (1827), al noemt hij in dit verband ook Professor *Fischer* in Breslau (1822). Jammer, dat hij met geen enkel woord melding maakt van den Abt *Nollet*³⁾ die ongetwijfeld het recht der prioriteit op deze belangrijke ontdekking kan doen gelden, want *Nollet* kende het verschijnsel der osmose reeds in 1748. Hij was Professor in de natuurkunde te Parijs en maakte den eersten endosmometer, bestaande uit een flesch, gevuld met wijngeest en afgesloten door een varkensblaas, welk eenvoudig toestel hij in water plaatste. Zijn eindconclusie uit de proefnemingen, door hem met dit instrument genomen, bewijst, dat hij de kern van het vraagstuk had ontdekt, want hij schrijft: *Als de blaas aan den eenen kant met water en aan den anderen met wijngeest in aanraking is, dan laat zij, waar beide vloeistoffen om den doorgang strijden, bij voorkeur het water passeeren.*⁴⁾

¹⁾ *Julius Sachs*: Geschichte der Botanik. München 1875. pag. 550 e. v.

²⁾ *R. Dutrochet*: Nouvelles Observations sur l'endosmose et l'exosmose et sur la Cause de ce double Phénomène. Ann. chim. phys. Ser. 2.35.393 — 400. 1827.

³⁾ Histoire de l'Acad. Roy. des Sci. avec les Mem. de Math. et de Phys. Mem. 57—104 1748.

⁴⁾ *Friedrich Dannemann*: Die Naturwissenschaften in ihrer Entwicklung und in ihrem Zusammenhange. Vierter Band. Leipzig und Berlin. 1913. pag. 39.

De bijna twee eeuwen oude historie van het vraagstuk der permeabiliteit en zijn groote belangrijkheid hebben dan ook de literatuur over dit onderwerp dermate doen aangroeien, dat *Walter Stiles*⁵⁾ in zijn monographie 817 publicaties weet te noemen, die direct of zijdelings op dit probleem betrekking hebben, welk aantal nog gemakkelijk zou zijn op te voeren. Hoe uitgebreid en veelzijdig deze onderzoekingen ook mogen zijn, het meeren-deel heeft betrekking op de permeabiliteit voor verschillende ionen en een veel kleiner aantal loopt over den invloed der temperatuur, terwijl van deze laatstbedoelde onderzoekingen maar enkele betrekking hebben op de permeabiliteit van het protoplasma voor stoffen, die zich in de vacuolen bevinden.

Als men aanvangt met de ontdekking van Nollet, dan heeft het nog tientallen jaren geduurd, vóór het begrip osmose van beteekenis werd voor de vraagstukken der planten-fysiologie.

Na *Dutrochet* was *Nägeli*⁶⁾ een van de eersten, die de ontdekking der osmose meer dienstbaar gemaakt hebben aan de studie der proefondervindelijke planten-fysiologie. Ook de terminologie, op dit verschijnsel betrekking hebbende, zoo onontbeerlijk voor zijn beschrijving, werd door hem gewijzigd en aangevuld. *Dutrochet* gebruikte den term *endosmose* voor de sterkere strooming en *exosmose* voor de zwakkere, maar voor de toepassing van deze begrippen op de levensleer der plant was wijziging noodzakelijk, en *Nägeli* voert dan ook een andere beteekenis voor deze termen in en verstaat, zooals nog heden ten dage gebruikelijk, onder *endosmose* den stroom, die de cel binnen gaat en noemt *exosmose* het naar buiten treden van stoffen, die in de cel aanwezig waren. Als aanvulling van de termen, door *Dutrochet* gebruikt, schept hij het woord *diosmose*, dat de twee stroomingen samenvat. Ook over in het celvocht opgelost anthocyaan wordt door *Nägeli* een en ander medegedeeld, in het bijzonder over het al of niet uittreden van deze kleurstof. Zoo merkt hij op, dat de onveranderde en levenskrachtige cel het anthocyaan vasthoudt, terwijl bij een veranderden toestand van de cel, de protoplast het gekleurde celvocht laat passeeren en dus evenmin een hinderpaal vormt als de celwand.

⁵⁾ *Walter Stiles*: Permeability. New Phytologist reprint no. 13. 1924.

⁶⁾ *Carl Nägeli und Carl Cramer*: Pflanzenphysiologische Untersuchungen Zürich 1855. pag. 5, 7 & 31.

Ik zou er in dit verband op willen wijzen, dat, hoewel Nägeli omtrent dien veranderden toestand van de cel geen nadere uiteenzetting geeft, hij er toch de aandacht op vestigt, dat het voor hem *een open vraag is, of de cel in dien toestand dood is of leeft*. [Ook Bayliss⁷⁾ stipt de quaestie van de vitaliteit der cellen, als ze de kleurstof hunner vacuolen doen uitstroomen, even aan, en door de wijze, waarop hij dit punt bespreekt, kan men tusschen de regels lezen, dat naar zijn meening die cellen in bepaalde gevallen *niet dood* zijn.]

Aangezien men in sommige weefsels naast elkaar gekleurde en kleurlooze cellen aantreft, bewijst dit volgens N., dat de levende protoplast bij normale temperatuur ondoordringbaar is voor anthocyaan.

Hij vermeldt met betrekking tot deze materie maar één enkel experiment, nl. dit, dat roode en blauwe bloemkroonbladen, waarvan men doorsneden in water legt, gedurende eenigen tijd hun kleurstof vasthouden. Als ze langer in water blijven liggen, bij kamertemperatuur 24 uur en langer, treedt de kleurstof uit. Hij heeft verder waargenomen, dat de doode, of door fysisch-chemische invloeden veranderde protoplast, niet alleen het anthocyaan doorlaat, maar het opneemt en vasthoudt en wel in een sterker concentratie dan de oorspronkelijke celvocht-oplossing het bevatte.

Sachs⁸⁾ heeft het vraagstuk van den invloed der temperatuur op de permeabiliteit besproken en bovendien, meer dan Nägeli, door proefnemingen tot klaarheid trachten te brengen. Het is een onderzoek, dat door hem in Bonn werd uitgevoerd en in 1863 afgesloten; het is opgenomen in *Flora* van 1864. Hij bepaalt zich echter tot het onderzoek bij enkele temperaturen, hooger dan de bovenste temperatuurgrens, en het doel, door hem bij deze proefnemingen beoogd, was, aan te toonen, dat de door hooge temperaturen gedooide cellen zich gedragen als die van het door vorst gedesorganiseerde weefsel. Sachs spreekt in dit verband van *verhoogde permeabiliteit*. Hij nam ook proeven met weefsel van de roode biet en sneed stukjes uit het wortel-parenchym, $\frac{1}{2}$ mM. dik en 1 c.M. breed en lang. Ze werden eerst afgespoeld om het

⁷⁾ W. M. Bayliss: Principles of General Physiology. Fourth Edition. London 1924 pag. 126.

⁸⁾ Julius Sachs: Gesammelte Abhandlungen über Pflanzen-Physiologie Erster Band. Leipzig 1892. pag. 133—136.

anthocyaan der door het mes vernielde cellen te verwijderen. Nu neemt hij eerst drie verschillende proeven:

a. Een aantal weefselstukjes wordt in water van 20 gr. C. gelegd en hij constateert, dat na 18 uur de kleurstof nog niet is uitgetreden.

b. Hij legt een aantal sneden in water van 51 gr. C. en ziet dat de diffusie van de kleurstof dadelijk begint en dat het weefsel na 30 minuten kleurloos is.

c. Hij doet hetzelfde bij een temperatuur van 55 gr. C. met een gelijk resultaat.

Als Sachs de uitkomsten van deze proeven discussieert, stelt hij zich de vraag, of men mag aannemen, dat de cellen gedurende deze proefnemingen niet veranderd zijn en alleen het diffusieproces is versneld. Hij acht nu het bewijs van het tegendeel geleverd door de volgende proef:

Een aantal sneden liggen enkele minuten in water van 51 gr. C. en worden daarna overgebracht in water van 22 gr. C. en nu blijkt hem, dat het uittreden van anthocyaan onafgebroken doorgaat. Op deze laatste proef hoop ik in het hoofdstuk over *Afgebroken ontkleuringen* nader terug te komen.

Met zijn verdere experimenten bewijst Sachs, dat de cellen voor kleurstof permeabel worden, zodra ze gedood zijn. Voortgezette proeven met infra-maximale temperaturen heeft hij dus niet genomen.

*Hofmeister*⁹⁾ behandelt het vraagstuk der permeabiliteit zeer beknopt. Hij merkt op, dat de weerstand van het protoplasma tegen het opnemen en doorlaten van in water opgeloste stoffen grooter is dan die van den celwand. Wat hij over een in de vacuole aanwezige gekleurde vloeistof zegt, raakt de strekking van dit onderzoek. Hij constateert, dat in zoo'n geval het protoplasma zelf kleurloos is en noemt enkele voorbeelden: de haren van de meeldraden bij *Tradescantia virginica*, de enkele cellen uit de epidermis van *Vallisneria spiralis*, die rood celvocht hebben, de cellen in het vruchtvleesch van *Rubus fruticosus*, *Solanum nigrum* enz. Hij stelt vast, dat in vele gevallen de wandstandige protoplasmalaag in staat is, meer dan 24 uur het uittreden van dat gekleurde celvocht tegen te gaan, als men stukken van een

⁹⁾ *Wilh. Hofmeister*: Die Lehre von der Pflanzenzelle, Leipzig 1867. pag. 4 & 5.

dergelijk weefsel in water legt. Hetzelfde neemt hij waar bij versch gesneden stukken plantenweefsel, die suikerhoudend zijn, door te constateeren, dat na 30 minuten het omringende water nog vrij is van suiker. Zijn eindconclusie is dan, dat het protoplasma dit weerstandsvermogen slechts bezit in *onveranderden levenden toestand*. Het levendig opnemen van kleurstoffen uit hun oplossingen door het protoplasma acht hij het stigma van zijn desorganisatie. Langdurig verblijf van dergelijke objecten in water kan hetzelfde gevolg hebben en H. geeft hierbij als tijdgrens aan: 10 uur tot 48 uur.

Ook De Vries¹⁰⁾ ¹¹⁾ ¹²⁾ ¹³⁾ heeft onderzoeken verricht betreffende de temperatuur en de permeabiliteit. Deze publicaties zijn uit een tijd van ernstig onderzoek naar de *bovenste temperatuurgrenzen* van het leven en verschillende onderzoekers werkten met levende planten, die of aan hun wortelstelsel of aan hun bovengrondsche deelen eenigen tijd aan een bepaalde temperatuur werden blootgesteld. Het al of niet dood gaan van deze proefobjecten na korter of langer tijd vormde de basis voor de conclusies. Men komt echter bij dergelijke proeven tot de vraag: wat is de oorzaak van den dood der proefplanten, en zou daarop kunnen antwoorden: de hoge temperatuur; maar zoo eenvoudig is deze vraag niet af te doen. De plant is een ingewikkeld samenstel van verschillende weefsels, die uit een groot aantal cellen bestaan, wier levensverrichtingen bij een voortdurende wisselwerking onderling het levende organisme als resultante geven. De vraag naar de doodsoorzaak wordt dus deze: welke cellen of groepen van cellen zijn in één of meer van hun functies dermate beschadigd door de hoge temperatuur, dat het organisch evenwicht der levensverrichtingen voor goed verbroken is

De Vries neemt proeven met de wortels van *Stratiotes aloides*, houdt die een half uur in kokend water en constateert na de proef een verkorting van 1.2 pct. Hij doet hetzelfde in water van

¹⁰⁾ Hugo de Vries: Sur la mort des cellules végétales par l'effect d'une température élevée. Archives Néerlandaises des sciences exactes et naturelles. T. 6 1871, p. 245.

¹¹⁾ Hugo de Vries: Opera e periodicis collata. Utrecht 1918. Vol. 1 p. 100.

¹²⁾ Idem: Sur la perméabilité du protoplasma des betteraves rouges. Archives Néerlandaises des sciences exactes et naturelles. T. 6. 1871 p. 117.

¹³⁾ Idem: Opera e periodicis collata. Vol. 1 pag. 92.

51.0—52.5 gr. C. en meet de lengte, waarna hem een verkorting van 0.25 pct. blijkt. Zijn eindconclusie is nu, dat de grens van het leven bij deze organen tusschen 52 en 54 gr. C. ligt. Ik zou hier alleen aan toe willen voegen, dat er ook infra-maximale temperaturen zijn, die, voldoende lang toegepast, de een of andere functie van een groep van cellen zòd kunnen schaden, dat het leven van het geheele orgaan er mede gemoeid is en het voortbestaan van het organisme wordt bedreigd.

Hij experimenteerde ook met wortels van een aantal andere plantensoorten, waarbij zijn doel was, na te gaan, bij welke temperatuur de celwanden beschadigd zouden worden, als de wortels $11\frac{1}{2}$ uur in water van die temperatuur werden gehouden. Hij vindt dan voor ramenias, knol, koolraap, peen en peterselie de grens tusschen 46 en 48 gr. C.; voor de radijs en de raap tusschen 48 en 50 gr. C. Verder heeft hij, weer met wortels van *Stratiotes aloïdes*, proeven genomen, om ook een grens te bepalen voor den protoplast. De wortels worden 30 minuten in water van 50 gr. C. gehouden en daarna in een anthocyaan oplossing geplaatst (uit den wortel van de roode biet getrokken), die als indicator dienst moet doen. Na eenigen tijd kleuren de wortels zich donker rood. Hij besluit hieruit, *dat de grens voor de verandering van den celwand dus hooger was dan de grens van het leven.*

De bietenwortel is ook door De Vries onderzocht en wel zeer speciaal met het oog op de permeabiliteit van het protoplasma voor verschillende ionen, zoodat ze geen direct licht op mijn onderzoek werpen; alleen de eindconclusie halen we hier aan: *het levend protoplasma is niet permeabel of het is dat niet dan in een uiterst zwakken graad, voor een groot aantal stoffen, die in water oplosbaar zijn.* Deze conclusie kan dus gezet worden naast dergelijke uitspraken, als ik van *Nägeli* en *Bayliss* memoreerde; ze zien voor het meerendeel op de permeabiliteit voor endosmotische stroomingen en voor een klein deel op die voor exosmotische.

*G. Krabbe*¹⁴⁾ heeft onderzoekingen verricht, die betrekking hebben op mijn onderwerp en welke na zijn dood door *R. Kolkwitz* zijn openbaar gemaakt. Hij werkte met groote weefsel-

¹⁴⁾ *G. Krabbe*: Ueber den Einfluss der Temperatur auf die osmotischen Prozesse lebender Zellen. Pringsheim's Jahrbücher. Bnd 29, 441—498. Berlin. 1896.

complexen nl. heele en halve mergcylinders uit de takken van *Sambucus nigra*, *Inula Helenium* enz. maar ook met wortels van *Vicia Faba* en *Phaseolus multiflorus*. Hij bestudeerde voornamelijk de contractie van deze objecten in sterke suikeroplossingen en dat onder den invloed van verschillende temperaturen. Een gedeelte van zijn proeven belichten dus de permeabiliteit voor water bij exosmose en hij vindt, dat het proces bij 20 gr. C. sneller gaat dan bij 1 gr. C. Andere proeven betreffen de permeabiliteit voor water bij endosmose. Van een mergcylinder van *Helianthus annuus* wordt de eene helft in water van 1—2 gr. C. gelegd en de andere helft in water van 25 gr. C. Beide nemen water op, maar de snelheden zijn zeer verschillend en verhouden zich resp. als 1 : 5. De proeven van Krabbe zijn overtuigend, afgezien van de ongunstige nevenomstandigheid, dat in zijn vrij samengestelde objecten allerlei druk- en trekkrachten werken, die onbekend en dus oncontroleerbaar zijn, met name in de halve centraal-cylinders. Hoewel misschien in mindere mate, is dit toch ook een bezwaar van mijn objecten.

*Fr. van Rysselberghe*¹⁵⁾ heeft bij Pfeffer onderzoekingen over permeabiliteit uitgevoerd bij 6, 12, 16, 20, 25, en als uiterste grens 30 gr. C. Hij gaat met deze onderzoekingen in het voetspoor¹⁶⁾ van Krabbe, door de permeabiliteit voor water na te gaan en werkte ook met sneden van *Tradescantia*, waarbij hij in de snelheid der plasmolyse een maatstaf ziet van de permeabiliteit voor het uittredende water, wat door *Janse*¹⁷⁾ reeds in 1888 bij *Spirogyra* was waargenomen. Uit het verloop der deplasmolyse ziet hij de snelheid der permeabiliteit voor verschillende ionen. Hierbij moet men echter niet uit het oog verliezen, dat er bij deplasmolyse altijd een mogelijkheid open blijft en wel deze, dat *anatonose*¹⁸⁾ er op van invloed is geweest. Als nl. gedurende

¹⁵⁾ *Fr. van Rysselberghe*: Influence de la Temperature sur la Perméabilité du Protoplasma vivant pour l'Eau et les substances dissoutes. 1899. Bulletins de l'Académie royale de Belgique, no. 3, pp. 173—221, 1901.

¹⁶⁾ *Aristides Kanitz*: Temperatur und Lebensvorgänge. Berlin 1915. pag. 90. Naar K's meening heeft v. Rysselberghe geen nieuwe resultaten gevonden maar alleen een bevestiging van hetgeen Krabbe reeds publiceerde.

¹⁷⁾ *Janse*: Die Permeabilität des Protoplasmas. Versl. en mededeel. d. Kon. Akad. van Wetensch. van Amsterdam, afd. Natuurkunde, reeks 3, deel 4, bl. 332.

¹⁸⁾ *R. Höber*: Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. Fünfte Auflage. Leipzig 1922—1924, pag. 409.

de deplasmolyse, in de cel, door welke oorzaken kan in het midden gelaten worden, osmotisch werkzame stoffen worden gevormd, en dat is door *Iljin*¹⁹⁾ en anderen in bepaalde gevallen overtuigend aangetoond, dan verloopt de deplasmolyse sneller en is dus de geconstateerde toename der permeabiliteit geflatteerd.

*Hansteen Cranner*²⁰⁾ heeft maar enkele proeven genomen, die de strekking van mijn onderzoek raken. In Versuchsgruppe 3 gaat hij den invloed der temperatuur na op het uittreden van in water oplosbare phosphatiden en van celkleurstoffen. Hij werkte met schijven bietenweefsel, uit het midden van den wortel genomen, en van de afmetingen 4 bij 5 bij 1 c.M. Hij spoelt het anthocyaan van het verscheurde weefsel af door een krachtige straal van de waterleiding, totdat het water, waarin het materiaal uren had gestaan, geen kleurstof meer bevatte. De voorbehandeling duurde zodoende 12 uur bij een temperatuur van 10—15 gr. C. Nu begint hij enkele proeven in te stellen en gebruikt daarbij gedistilleerd water. Hij constateert dan, dat het uittreden van phosphatiden in den regel hand aan hand gaat met het uittreden van anthocyaan, waarvoor 19 uur in 30 gr. C. en daarna 24 uur in 17 gr. C. noodig was. Als uitzondering vermeldt hij, dat in sommige gevallen bij dezelfde proef het anthocyaan niet uittreedt.

Verder merkt hij nog op, dat deze uittredingsprocessen *volkomen reversibel* zijn, en bij deze uitspraak zouden we even willen stilstaan. Het al of niet reversibele van een physiologisch proces, in casu het uittreden van anthocyaan, komt herhaaldelijk bij tal van physiologische onderzoekingen in discussie. Toch wordt er met deze begrippen (*irreversible* en *reversible*) wel eens lichtvaardig omgesprongen. De dood van een cel of van een celgroep is het eind van een proces, dat op het oogenblik van den dood eerst absoluut *irreversibel* is. In hoeverre vroegere stadia van een dergelijk proces reversibel zijn is moeilijk uit te maken, wat echter de mogelijkheid van hunne reversibiliteit niet uitsluit. Als bijv. bij bietenweefsel, onder invloed van een bepaalde tem-

¹⁹⁾ W. S. *Iljin*: Permeabilität des Plasmas für Salze und die Anatonose. Stud. from the Plant Physiol. Labor. of the Charles Univ. Prague 1923.

²⁰⁾ B. *Hansteen Cranner*: Zur Biochemie und Physiologie der Grenzschichten lebender Pflanzenzellen. Meldinger fra Norges Landbrukshoiskola 1922, pag. 96.

peratuur, het anthocyaan uittreedt en dit uittreden houdt op als men hetzelfde object overbrengt naar een lagere temperatuur, dan mag men daaruit niet besluiten tot de reversibiliteit van dit proces. Het is inderdaad mogelijk, dat men hier met een dusdanig proces te doen heeft, maar er is nog een andere mogelijkheid nl. dat verschillende celgroepen uit dit weefsel van ongelijke resistentie zijn ten opzichte van de toegepaste temperaturen. Het is echter niet wel doenlijk, met het oog op deze en dergelijke proefnemingen tusschen deze twee mogelijkheden een keuze te doen. Hansteen Cranner heeft dus niet het recht, het uittredingsproces van het anthocyaan reversibel te noemen, want zijn proeven leveren daarvoor geen enkel bewijs.

Hansteen Cranner heeft zeer groote stukken bietenweefsel gebruikt en doet bij de beschrijving van zijn proeven niet duidelijk uitkomen, welke maatregelen hij nam om de temperatuur constant te houden. Aangezien hij hier en daar zelf spreekt over *zijn tamelijk constante temperaturen*, laat in dit opzicht de techniek van deze, om andere redenen zoo de aandacht trekkende, onderzoeken te wenschen over.

Lepeschkin ²¹⁾ heeft in een van zijn publicaties het vraagstuk van de correlatie tusschen permeabiliteit en temperatuur besproken. Het was daarbij zijn doel niet in de eerste plaats nieuw feitenmateriaal te verzamelen, hoewel hij toch verschillende experimenten uitvoert, maar wel om reeds voorhanden gegevens te rangschikken en door synthese verklaringen voor reeds bekende verschijnselen te geven. Hij werkte zelf met in hoofdzaak supra-maximale temperaturen 45—85 gr. C. en verklaart de toenemende permeabiliteit uit de voortgaande coagulatie van het protoplasma. Eerst treden moleculair opgeloste stoffen uit, maar later passeeren ook colloïden den protoplast en bij een totale coagulatie treedt ten slotte de in het celvocht colloïdaal opgeloste kleurstof *zeer snel* uit. In verband met mijn eigen waarnemingen moet hier de nadruk gelegd worden op *zeer snel*, want bij veel lagere temperaturen kan men ook kleurstof zien uittreden, en het is zeer de vraag, of het plasma dan reeds gecoaguleerd is. Zoo is *Lepeschkin* ook van oordeel, dat de ontkleuring begint bij een hogere temperatuur dan die, welke het plasma coaguleert. Is dit

²¹⁾ *Lepeschkin*: Zur Kenntnis der Einwirkung supramaximaler Temperaturen auf die Pflanze. Ber. d. D. B. G. Bnd. 30 1912. pag. 703.

juist, dan moet, te beginnen bij 20 gr. C., het plasma bij deze en elke hoogere temperatuur coaguleeren, wat nog bewezen zou moeten worden.

Hij neemt ook proeven met bietenweefsel en gebruikt telkens 5 normaalsneden van 2 m.M. dikte en $6\frac{1}{2}$ kwc.M. oppervlakte. Hij noteert nu den tijd, die noodig is, om zooveel anthocyaan te doen uittreden, dat de kleur van het water gelijk is aan die van een 0.00001 pct. fuchsine oplossing en dat neemt hij aan als de coagulatie-tijd van het protoplasma.

De techniek van zijn onderzoek is minder volkomen, omdat hij door het bijschenken van heet water temperatuurschommelingen moet te boven komen.

*Collander*²²⁾ maakt aanmerking op de technische verzorging van Lepeschkin's onderzoek, maar blijft zelf in gebreke, eenigszins uitvoerig aan te geven, hoe de omstandigheden bij de door hemzelf genomen proeven waren geregeld. Als we hier de onderzoekingen van Collander nader beschouwen, dan vestigen we in de eerste plaats de aandacht op een van zijn opvattingen, die misschien voor aanvulling vatbaar is, nl. deze, dat iedere celsoort een temperatuur-maximum heeft, dat na korter of langer tijd de cel doodt, en de dood treedt sneller in, naarmate dit maximum verder overschreden is. Hij brengt in een koördinaten-systeem de temperaturen en de logaritmen der daarbij behoorende tijden, waarin die temperaturen doodelijk zijn en krijgt dan ongeveer een rechte lijn. Hij werkt ook met bietenweefsel in schijven van 0.3 m.M. dikte, de grootte geeft hij niet op. Hij onderzoekt zijn objecten na de proef en beschouwt bij de biet de deplasmolyseerbaarheid als criterium van het leven. Hij schat dan de verhouding van kleurloze en gekleurde cellen en neemt aan, als de helft der cellen dood is, dat de tijd, die noodig is om het weefsel te dooden, is bereikt. We laten hier tabel 2 uit dit onderzoek volgen:

²²⁾ *Runar Collander: Beobachtungen über die quantitativen Beziehungen zwischen Tötungsgeschwindigkeit und Temperatur beim Wärmetod pflanzlicher Zellen. Societas Scientiarum Fennica. Commentationes Biologicae. Tomus 1 No. 7—9. pag. 1—11.*

proef	40 gr. C.	45 gr. C.	50 gr. C.	55 gr. C.	60 gr. C.
4		330	90	3	
5			80	4,5	0,5
6	1500	420	100	4,5	0,8
7	2500	510		5	0,7
Gemiddeld:	—	420	90	4,3	0,7

Naar aanleiding van het doodelijke temperatuur-maximum, waarover Collander schrijft, zou ik willen opmerken, dat hij de ontkleurde cel opvat als te zijn afgestorven, en dat zou ik in het midden willen laten. Waar ik verder van meening ben, dat een cel van Beta ook bij een temperatuur van 20 gr. C. te ontkleuren is, daar zou ik de vraag willen stellen: *hoe hoog*, of juist *hoe laag* ligt dan het doodelijke temperatuur-maximum voor bepaalde cellen van het bietenweefsel? Waar ik niet weet, hoe groot de door hem gebruikte normaalsneden zijn en ook, omdat ze dikker waren dan de mijne, alsmede door de omstandigheid, dat hij bij een half ontkleurd stuk weefsel aanneemt, dat het dood is, kan ik mijn *ontkleuringstijden* niet vergelijken met zijn *doodingstijden*. Had hij zijn proeven met Beta genomen door weefselfragmenten te nemen uit de zoo ver mogelijk uiteen gelegen regionen van den wortel, dan zou hij andere gemiddelden verkregen hebben.

Uit het voorafgaande blijkt, dat Collander's aandacht niet gevallen is op het groote verschil in permeabiliteit van het boven-einde van den wortel en de punt, noch op haar groote natuurlijke fluctuaties, die in den loop der maanden van November tot Mei in den wortel plaats grijpen.

Merkwaardig is, dat de tijd van 90 minuten, door hem bij een temperatuur van 50 gr. C. gevonden, overeenkomt met den ont-kleuringstijd, dien ik bij die temperatuur heb gevonden. In zijn theoretische slotbeschouwingen heeft hij het over de oorzaak van den dood door hoge temperaturen. Hij denkt daarbij aan het denatureeren van de eiwitstoffen van den protoplast en aan de verstering van thermolabile enzymen.

Zowel Lepeschkin als Collander doen het voorkomen, of het als het ware een uitgemaakte zaak is, dat het plasma uit eiwit-

stoffen bestaat, die door hun gedrag ten opzichte van de onderscheidene temperaturen de verschillende fluctuaties der permeabiliteit beheerschen, maar er zijn reeds tal van feiten bekend geworden, die het vermoeden wettigen, dat misschien stoffen uit een geheel andere groep, in hunne door de temperatuur beïnvloede gedragingen, de meerdere of mindere permeabiliteit veroorzaken of althans daarop van grooten invloed zijn.

A. Weis²³⁾ en verschillende andere onderzoekers²⁴⁾ ²⁵⁾ wijzen in dit verband op lecithine en andere lipoïden.

Kort voor het ter perse gaan vond ik eerst gelegenheid om van een artikel van *Lepeschkin*²⁶⁾ kennis te nemen, waaraan ik nog een en ander zou willen ontleenen. Collander kon deze publicatie alleen in een naschrift van zijn boven aangehaalden arbeid vluchtig bespreken.

L. geeft zeer uitvoerige theoretische beschouwingen, maar ook een groote aantal proeven met *Spirogyra*, die technisch uitnemend verzorgd moeten zijn geweest, want hij geeft op, dat de door hem gebruikte water-thermostaat tot op 0.03 gr. C. constant was.

Hij vergelijkt het plasma met een oververzadigde zoutoplossing m.a.w. het is wel vloeibaar, maar het kan plotseling vast worden, een proces, dat door mechanische invloeden kan worden versneld, zooals dat bij explosieve stoffen het geval is. In tegenstelling met zijn eerder aangehaalde publicatie meent hij nu, dat lipoïden een rol spelen en zegt, dat de continue phase bestaat uit losse verbindingsen van eiwitten met lipoïde stoffen. Ik zou hier willen vragen: is deze opvatting niet in tegenspraak met wat de colloïdchemie thans leert?

Als hij den invloed van de temperatuur op de stabiliteit van het plasma bespreekt, onderscheidt hij twee werkingen van de hooge temperatuur nl. *denaturatie* en *coagulatie*, en het laatste

²³⁾ A. Weiss: Beiträge zur Kenntnis der Plasmahaut. Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie. Bnd 1 Heft 1. Berlin 1925. pag 160.

²⁴⁾ R. Höber: Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. Fünfte neu bearbeitete Auflage. Leipzig 1922—1924, pag. 487.

²⁵⁾ Olof Hammarsten: Lehrbuch der physiologischen Chemie. Achte Aufl. Wiesbaden 1914. pag. 9 en 10.

²⁶⁾ W. Lepeschkin: The Constancy of the Living Substance. (Experiments made on *Spirogyra*). Studies from the Plant Physiological Laboratory of Charles University. Prague 1923. pag. 5—44.

proces acht hij een gevolg van het eerste. Verder spreekt hij van synthetische processen, die in het plasma plaats hebben en zelfs door zouden gaan bij coagulatie van de buitenste laag. Zoodra echter kern en chloroplast coaguleeren, zijn deze processen verstoord.

Hij heeft ook waargenomen, dat de H. ionen-concentratie van invloed is op den coagulatietijd. Een verhoogde concentratie maakt de protoplasten gevoeliger en verlaagt den coagulatietijd, zooals bij mijn proeven door denzelfden invloed de ontkleurings-tijd korter werd.

Tot zoover de bespreking en de algemeene beschouwingen van de voornaamste literatuur, die op mijn onderwerp betrekking heeft.

Een meer algemeene opmerking moet mij nog uit de pen.

Wanneer men de wetenschappelijke publicaties van de laatste jaren nagaat, dan valt het op, dat bij beoefenaars der levensleer van de meest verschillende pluimage, de theoretische aankleeding hunner geschriften steeds omvangrijker wordt. Soms zelfs gaan de eigen onderzoekingen en waarnemingen als het ware schuil achter die theoretische stoffage. Vooral de colloïd-chemie levert uit haar rijken voorraad van begrippen en theorieën de stof voor de dikwijls zoo weinig bevredigende *verklaringen* van de uitkomsten der proeven. Het gebeurt vaak, als men over een en ander zijn licht gaat opsteken bij een colloïd-chemicus van het vak, dat dan die *verklaringen* worden afgewezen of met zeer groote reserve ontvangen. Gaat men terug tot de grootmeesters der physiologie, die de fundamenteen gelegd hebben voor deze wetenschap, dan valt de sobere en eenvoudige poging om te verklaren op, en hun onderzoekingen beschamen u door de uitnemende keuze hunner experimenten, die met zulke eenvoudige hulpmiddelen werden verricht.

Aangezien mijn proefnemingen langs dergelijke problemen heen gaan, valt een dieper gaande theoretische beschouwing van die vraagstukken buiten het kader van deze inleiding, die ik dus hiermede beëindig, om tot een bespreking van den gang van het eigenlijke onderzoek over te gaan.

MATERIAAL EN METHODE.

Het materiaal, dat bij deze proefnemingen heeft dienst gedaan, is het weefsel uit den wortel van de roode biet. De bieten waren gekuild en afkomstig uit de omgeving van Utrecht, terwijl een andere partij, uit den Hoekschen Waard betrokken, in een broeibak werd overgeplant, waarin ze, voorzien van de bladeren uit hun eerste groeiperiode, hebben overwinterd. Toen ik in Maart 1925 van dit laatste materiaal wilde gebruiken, bleek het me, dat de meeste wortels, althans in het bovineinde, geen anthocyaan meer bevatten. De nieuwgevormde bladeren waren daarentegen zeer donker rood gekleurd. Op doorsnede waren deze bieten vaal van kleur en bevatten hier en daar een roestbruine kleurstof, die ik ook wat later bij enkele gekuilde exemplaren naast het anthocyaan zag optreden.

Bij deze partij was een enkel exemplaar, dat door zijn helder groene bladeren opviel. De bladeren waren door roest aangetast (*Uromyces betae Tul?*) en de wortel onderscheidde zich van al de overige door een sterk anthocyaangehalte.

In den loop van het onderzoek rees bij mij het vermoeden, dat de gekuilde bieten langzamerhand veranderden wat betreft de resistentie van de weefsels ten opzichte van de toegepaste temperaturen. Voor het nagaan van deze veranderde en zich steeds wijzigende resistentie zouden enkele jaren noodig zijn, terwijl men daarbij meer eenvormig materiaal zou moeten gebruiken dan waarover ik beschikken kon, door bijv. één enkel landras van bieten als uitgangspunt te nemen.

De biet begint, als tweejarig gewas, aan het eind van de eerste groeiperiode een winterrust, die langzamerhand minder diep wordt, welk proces gepaard gaat met omzettingen van het anthocyaan en een verandering in het gedrag van de kleurstofbevattende cellen ten opzichte van de verschillende temperaturen, die men aanwendt, om het bietenrood te doen uittreden.

In aansluiting aan hetgeen hiervóór werd opgemerkt omtrent de bieten, die niet gekuild werden, maar in broeibakken over-

winterden, mag aangenomen worden, dat het anthocyaan van be- tekenis is voor de levensprocessen, die verband houden met het ontstaan van de donker rood gekleurde bladeren der tweede groeiperiode, en daarbij denk ik dan aan bovengenoemd uit- zonderingsgeval: het exemplaar met groene bladeren en een duidelijk rood gekleurden wortel.

Behalve het uitloopen der bladeren vertoonde het gekuilde materiaal de vorming van een groot aantal kleine wortels, die levendig rood gekleurd waren en soms over een groot deel van de oppervlakte van den hoofdwortel voor den dag kwamen. Deze vorming van zijwortels werd ook waargenomen bij stukken biet, die gedurende enkele dagen in een afgesloten ruimte, met water- damp verzadigd, waren bewaard.

Voor alle proeven werden weefselstukjes van gelijke dikte en oppervlakte gebruikt nl. dikte 0.22 m.M., lengte 2.03 c.M. en breedte 1.16 c.M. Om hun standaarddeering aan te duiden noem ik dergelijke stukjes weefsel: *normaalsneden* (afgekort nmsn.).

De nmsn. werden altijd op dezelfde wijze gesneden en wel zoo, dat de lengteas der sneden zooveel mogelijk evenwijdig was geöriënteerd ten opzichte van de cambiumringen, die bij een dwarse doorsnede van den wortel zoo duidelijk zichtbaar zijn. Het was verder van belang, dat de sneden morphologisch gelijk zouden zijn en daarom gebruikte ik een stukje glas van de grootte der normaalsneden, teneinde langs de loodrecht geslepen wanden daarvan een parallelpipetum uit den wortel te snijden, dat gemakkelijk in het mikrotoom kon worden geklemd en waar- van zoo een groot aantal normaalsneden kon worden vervaardigd.

Om deze normaalsneden alle op dezelfde dikte te krijgen, werd een hand-slede-mikrotoom van *Fritsch*²⁷⁾ gebruikt. De moderne mikrotomen waren voor dit doel niet geschikt, omdat men daar- mede niet zulke dikke sneden kan krijgen. Uit de constructie van dit eenvoudig instrument kan men berekenen, dat de sneden,

²⁷⁾ *Leopold Dippel*: Handbuch der allgemeinen Mikroskopie. 2te umgear- beitete Auflage. 1882. pag. 675 en 676. Hier vindt men een beschrijving en een afbeelding van het door mij gebruikte mikrotoom. Dippel geeft verkeerdelijk op, dat het te snijden object bij het verschuiven van de slede over een streep van den nonius 0,01 m.M. omhoog gaat, dit moet zijn 0,1 m.M.

bij een verschuiven van de slede over twee strepen der schaal, ongeveer 0.22 m.M. dik moeten worden.

Het doel, dat werd beoogd bij het maken der nmsn., was, dat ze morphologisch gelijkwaardig zouden zijn en alleen de uitkomsten, verkregen met nmsn. die aan dien eisch tot op zekere hoogte voldeden, werden met elkaar vergeleken. De *morphologische gelijkheid* der nmsn. was eensdeels door den aard van het materiaal, anderdeels door de methode van snijden, niet absoluut. Hoe betrekkelijk dun de sneden ook zijn, in strikten zin zijn ze, wat hun cellen-materiaal betreft, niet volkomen gelijk, afgezien nog van toevallige ongelijkheden, die bij het gebruik van een dergelijk eenvoudig handmikrotoom niet geheel te vermijden zijn.

Het nastreven eener morphologische gelijkwaardigheid der nmsn. bracht mij er ook toe om den bietenwortel in een viertal loodrecht boven elkaar gelegen étage's te verdeelen, die bij het noteeren der resultaten met de cijfers van 1—4 werden aangeduid. Aangezien de weefselstukjes, uit deze vier, naar beneden in grootte afnemende deelen van den wortel, gesneden, even groot waren, nadert men meer en meer het centrum van den wortel en in de onderste étage wordt het midden meestal getroffen.

Dat de voor een proef gebruikte normaalsneden niet alleen morphologisch maar ook *physiologisch* zooveel mogelijk gelijk zouden zijn, werd langs andere wegen bereikt. Bij den aanvang van mijn onderzoek heb ik de nmsn. eerst afgespoeld onder een straal van de waterleiding, teneinde het anthocyaan uit de door het mes vernielde cellen weg te spoelen; verschillende andere onderzoekers gingen op dezelfde wijze te werk.

Daarna werd het afgespoelde materiaal in water gelegd, om van lieverlede voor de proeven in de toestellen te worden gebracht. Het bleek, dat de ontkleuringstijden door deze voorbehandeling werden beïnvloed en ook het langer of korter verblijf in water van kamertemperatuur had invloed op die tijden. De vier stukken, waarin een wortel werd verdeeld, kwamen in glazen bakjes met ingeslepen deksels, waardoor deze kleine ruimten spoedig met waterdamp verzadigd waren, en het materiaal dagen lang hard en versch kon blijven. Ook deze wijze van doen leidde tot een physiologische ongelijkheid, van minder belang dan de boven omschrevene, maar die toch ongewenscht

bleek met het oog op de vergelijking van de uitkomsten der verschillende proeven. Zoo meende ik dan de physiologische gelijkheid van het materiaal het best te kunnen verwezenlijken door voortaan alleen materiaal te gebruiken, dat even voor den aanvang der proef uit een biet was gesneden, dat niet onder de kraan was afgespoeld en dus eerst met water in aanraking kwam, als het in het toestel werd gedaan. Dadelijk na het maken van een nmsn. werd deze in een vochtige ruimte gebracht, om, zoodra het vereischte aantal was vervaardigd, daarmede een proef te beginnen.

Het nemen van proeven met morphologisch en physiologisch zooveel mogelijk equivalent materiaal maakt het werken met twee toestellen noodzakelijk. Beschikt men slechts over een enkel toestel en wil men den invloed van twee verschillende temperaturen nagaan, dan kan men voor de morphologische gelijkheid van het materiaal de gebruikelijke voorzorgen nemen, maar de physiologische gelijkheid is dan een fictie, want als men de tweede proef gaat instellen op een lagere temperatuur, zijn de nmsn. reeds in verschillende opzichten physiologisch ongelijk aan die, welke bij de eerst genomen proef dienst deden.

Een methode, die groote voordeelen zou kunnen bieden boven de hier gevolgde, lijkt me die, waarbij een bladknipper kan dienst doen en *anthocyaan-houdende bladeren* het materiaal vormen. Tot mijn spijt heb ik alleen deze methodiek kunnen uitwerken en toetsen, maar de verkregen uitkomsten zijn van te weinig belang, doordat ik te weinig proeven met deze werkwijze kon nemen, zoodat ik hier maar twee tabellen met de daarbij behorende lijnen kan geven. Men zou sterk anthocyaan-houdende bladeren kunnen gebruiken van de biet en van verschillende andere plantensoorten, waarbij ik in het bijzonder de aandacht zou willen vestigen op *Iresine Lindenii*, die sterk gekleurd is door een rood anthocyaan, dat door oudere onderzoekers wel gerekend wordt tot dezelfde groep als het bietenrood.²⁸⁾ ²⁹⁾

²⁸⁾ L. Weigert: Beiträge zur Chemie der roten Pflanzenfarbstoffe. Jahresb. d. ömol. u. pomol. Lehranstalt z. Klosterneuburg. 1894—1895.

²⁹⁾ R. Willstätter: Untersuchungen über Anthocyane. Liebigs Annalen der Chemie. 401 (1913), 404 (1915) & 412 (1917). W. verwerpt de indeeling van Weigert in 2 groepen en verdeelt zelf de anthocyanen in 6 groepen. Hij spreekt niet van *Iresine*, maar rekent wel de kleurstof van *Chenopodium* tot dezelfde groep als die van *Beta*.

Het gebruik van den bladknipper maakt het gemakkelijk, om snel een groot aantal stukken normaalweefsel te verkrijgen, die morphologisch en physiologisch *volkomen gelijk* zijn. De morphologische gelijkheid is reeds door het gebruik van den bladknipper verzekerd en door links en rechts op gelijke afstanden van de hoofdnerf te blijven. De physiologische gelijkheid is verzekerd, door de snelheid, waarmede normaalsneden kunnen worden vervaardigd en door andere voorzorgen, die hiervoor reeds werden aangegeven. Het wondvlak, de uitgangspoort voor het anthocyaan, is *altijd even groot* en wordt gevormd door het mantelvlak van den lagen cylinder, waaruit een stukje normaalweefsel bestaat. Het zal zelfs mogelijk zijn, het aantal aanwezige anthocyaan houdende cellen nauwkeurig te berekenen. De meest gebruikte bladknipper berust op het *afknellen* van een stukje van een blad, maar men zou er een moeten construeeren, waarbij de eene helft aan het einde een massieve plaat heeft met een cirkelronde gleuf en de andere helft een vertikaalstaand cirkelrond mes, als van een scherp lepel, welk mes nauwkeurig in de gleuf moet passen.

Gebruikt men een dergelijk instrument, dan zal men bij het maken van normaalsneden steeds een ongeveer even groot aantal anthocyaan-houdende cellen treffen. Het zoo vrijgekomen anthocyaan zal daardoor een vrij constante hoeveelheid zijn en als men het uittredende anthocyaan daarin uitdrukt, dan zullen deze colorimetrische waarden meer stabiliteit hebben dan de door mij berekende.

Met een zekere periodiciteit van de permeabiliteit der anthocyaan houdende cellen zal men niet alleen moeten rekenen, maar die zou zelfs het doel van het onderzoek kunnen zijn, zoowel wat de verschillende groeiperioden van de plant betreft als wat die van het enkele blad betreft en bovendien wat aangaat haar verloop in 24 uur.

We laten hieronder een tweetal tabellen volgen, die betrekking hebben op gegevens, die verkregen werden met nmsn. uit bladeren. Tabel 1 van *Iresine Lindenii* en tabel 2 van *Beta*. De colorimetrische waarden zijn in beide gevallen berekend naar een 10 pct. anthocyaan oplossing, uit dezelfde objecten verkregen.

Tabel 1 en Tabel 2.

Temperatuur 50 gr. C. no. v. d. proef: 309. Materiaal: Bladen v. Iresine.				Temperatuur 50 gr. C. no. v. d. proef: 310. Materiaal: Bladen v. Beta.			
opl.	tijd in min.	col.	% anth.	opl.	tijd in min.	col.	% anth.
1	5	410/100	41,—	1	5	243/291	11,78
2	5	294/390	7,53	2	5	225/484	4,64
3	5	—	—	3	10	234/410	5,70
4	10	295/305	9,67	4	10	234/207	11,30
5	10	295/240	12,29	5	10	234/126	18,56
6	10	295/114	25,87	6	10	234/170	13,76
7	10	295/127	23,22	7	10	234/240	9,75
8	15	295/97	30,41	8	15	234/272	8,60
9	15	295/147	20,06	9	15	247/415	6,67

De maxima der uittredingen zijn vet gedrukt.

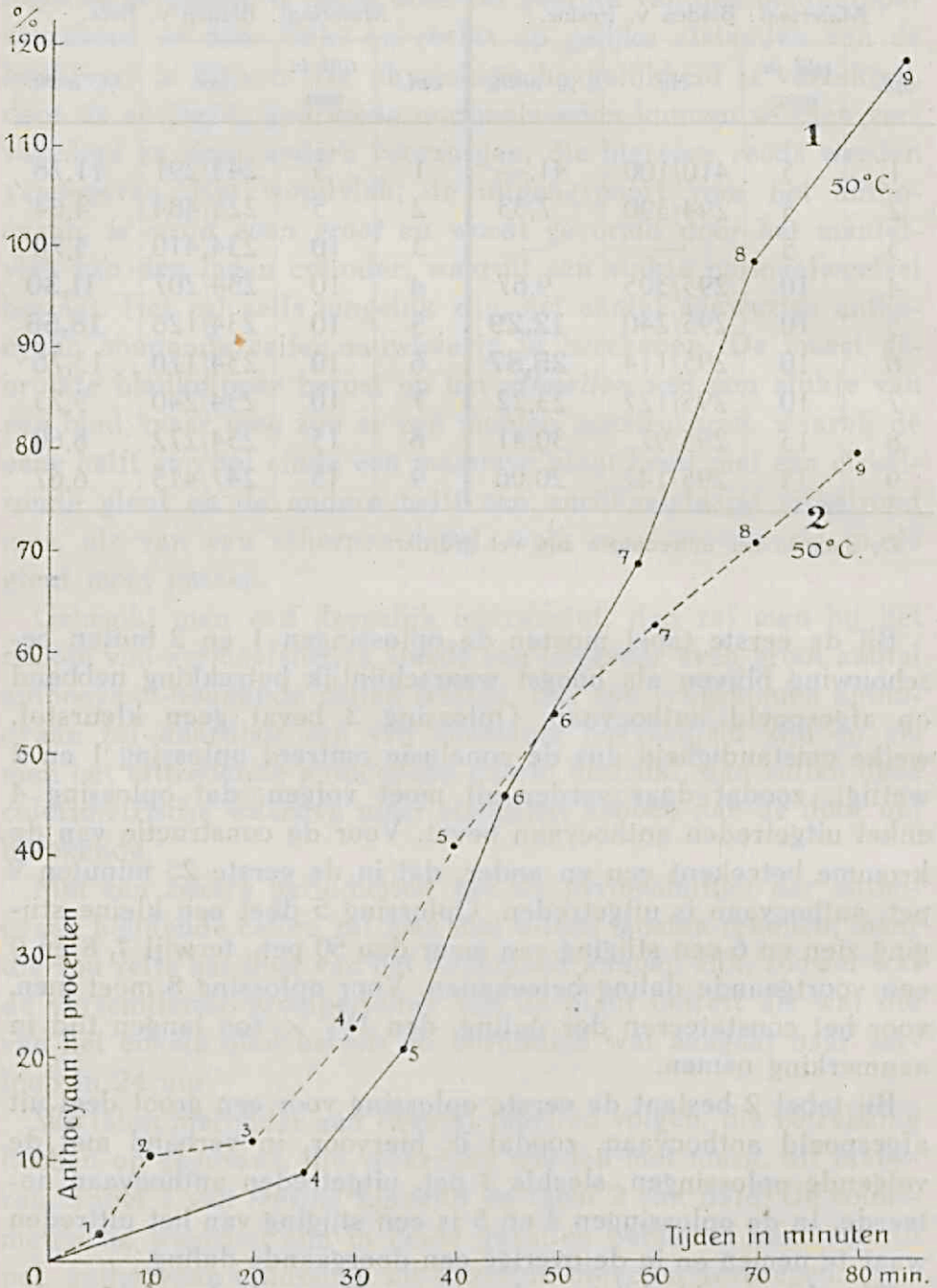
Bij de eerste tabel moeten de oplossingen 1 en 2 buiten beschouwing blijven als hoogst waarschijnlijk betrekking hebbend op afgespoeld anthocyaan. Oplossing 3 bevat geen kleurstof, welke omstandigheid dus de conclusie omtrent oplossing 1 en 2 wettigt, zoodat daar verder uit moet volgen, dat oplossing 4 enkel uitgetreden anthocyaan bevat. Voor de constructie van de kromme beteekent een en ander, dat in de eerste 25 minuten 9 pct. anthocyaan is uitgetreden. Oplossing 5 doet een kleine stijging zien en 6 een stijging van meer dan 50 pct., terwijl 7, 8 en 9 een voortgaande daling beteekenen. Voor oplossing 8 moet men, voor het constateeren der daling, den $11\frac{1}{2} \times$ zoo langen tijd in aanmerking nemen.

Bij tabel 2 bestaat de eerste oplossing voor een groot deel uit afgespoeld anthocyaan, zoodat ik hiervoor, in verband met de volgende oplossingen, slechts 3 pct. uitgetreden anthocyaan noteerde. In de oplossingen 4 en 5 is een stijging van het uittreden waar te nemen en in de overige een doorgaande daling.

We plaatsen hierbij twee krommen, die na de bespreking der bijbehorende tabellen geen uitgebreid commentaar behoeven. Alleen wil ik even opmerken, dat vòòr de kruising der lijnen

het blad van Iresine meer resistent blijkt dan dat van Beta en dat het na de kruising juist andersom is.

Lijn 1 & 2.



Bij de constructie van deze en alle volgende krommen ben ik als volgt te werk gegaan. Ieder traject van de lijn vertegenwoor-

digst een aantal procenten anthocyaan, dat in een bepaalde oplossing colorimetrisch kon worden aangetoond. Het *nummer van de oplossing staat aan het eind van elk traject* aangegeven. Het gehalte van de volgende oplossing wordt door het onmiddellijk volgende traject voorgesteld en zoo vervolgens.

Er werden twee toestellen gebruikt, die voor dit gedeelte der techniek een zoo volkomen betrouwbaarheid en nauwkeurigheid waarborgden, als bij dergelijke onderzoeken, voor zoover ik dat kon nagaan, nog nimmer werd bereikt. Waar andere onderzoekers soms hun toevlucht moesten nemen tot het bijschenken van koud of heet water om een verbroken temperatuur-evenwicht te herstellen, daar was dit bij deze toestellen nooit noodzakelijk. De verdienste hiervoor komt toe aan den Amanuensis *P. A. de Bouter*, die de toestellen construeerde en naging.

We laten een korte beschrijving der toestellen hier volgen.

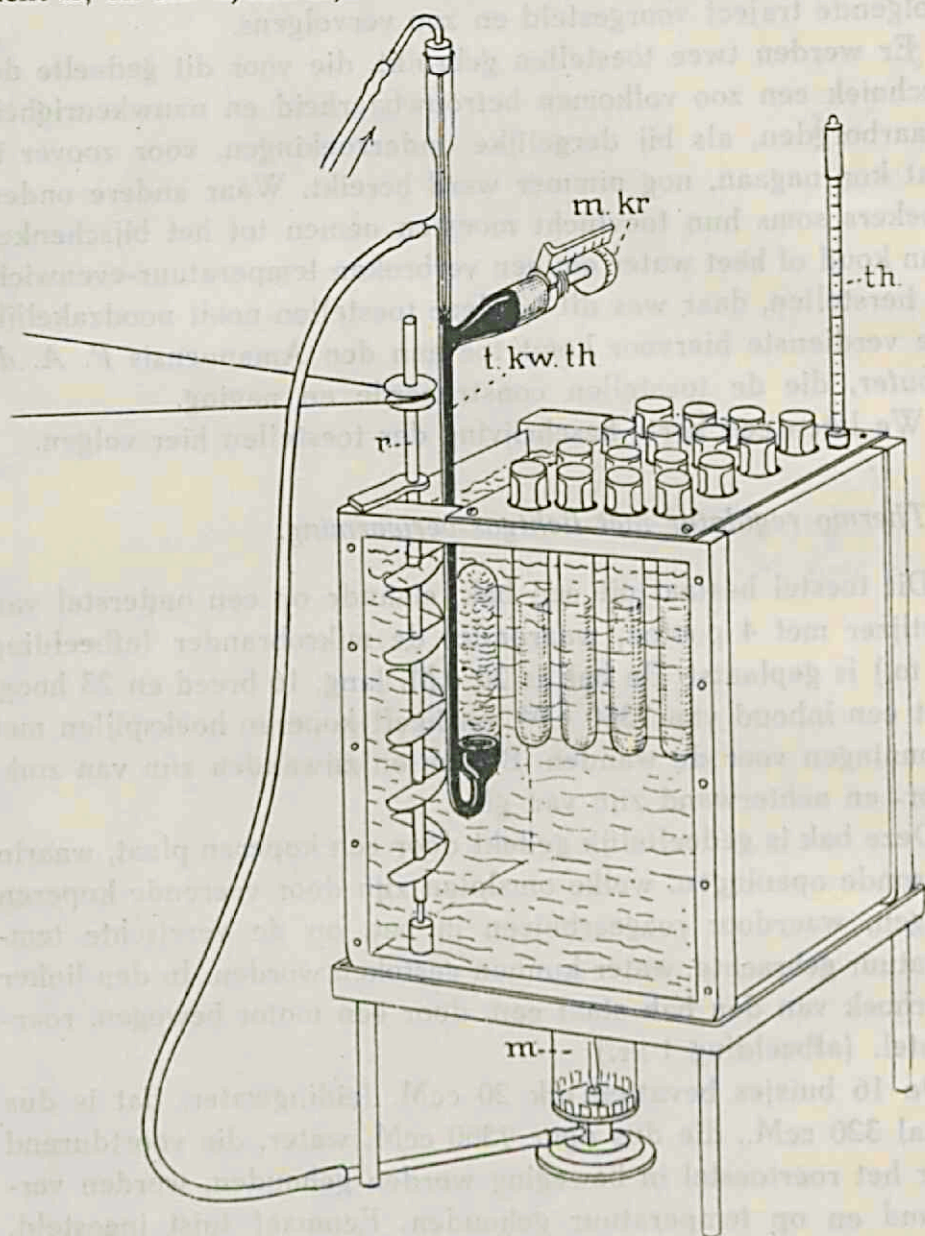
Thermo regulator met lichtgas-verwarming.

Dit toestel bestaat uit een bak, staande op een onderstel van gietijzer met 4 pooten, waaronder de mikrobrander (afbeelding 1 : m.) is geplaatst. De bak is 20 c.M. lang, 16 breed en 23 hoog, met een inhoud van 7360 c.M. en heeft koperen hoekspijlen met sponningen voor de wanden. Bodem en zijwanden zijn van zink, voor- en achterwand zijn van glas.

Deze bak is gedeeltelijk gedekt door een koperen plaat, waarin 16 ronde openingen, welke omsloten zijn door veerende koperen kragen, waardoor reageerbuisen in het, op de vereischte temperatuur gebrachte, water kunnen gestoken worden. In den linker voorhoek van den bak staat een, door een motor bewogen, roer-toestel. (afbeelding 1 : r.)

De 16 buisjes bevatten elk 20 ccM. leidingwater, dat is dus totaal 320 ccM., die dus door 7360 ccM. water, die voortdurend door het roer-toestel in beweging worden gehouden, worden verwarmd en op temperatuur gehouden. Eenmaal juist ingesteld, zijn er practisch geen temperatuurschommelingen van beteekenis, ook niet als de objecten, die per buisje een volume van ruim 1 ccM. hebben, in het toestel worden gebracht; verder mag hierbij nog wel opgemerkt worden, dat er nooit meer dan 4 groepen van nmsn. (met een gezamenlijk volume van ruim 4ccM.) tegelijk werden onderzocht, meestal echter niet meer dan 2. Een

temperatuurschommeling is bij dit onderzoek eerst van belang te achten door haar invloed op de betrouwbaarheid der resultaten, als er een betrekkelijk lange tijd verloopt, voor er weer evenwicht is, en die tijden zijn inderdaad zoo enorm klein in verhou-

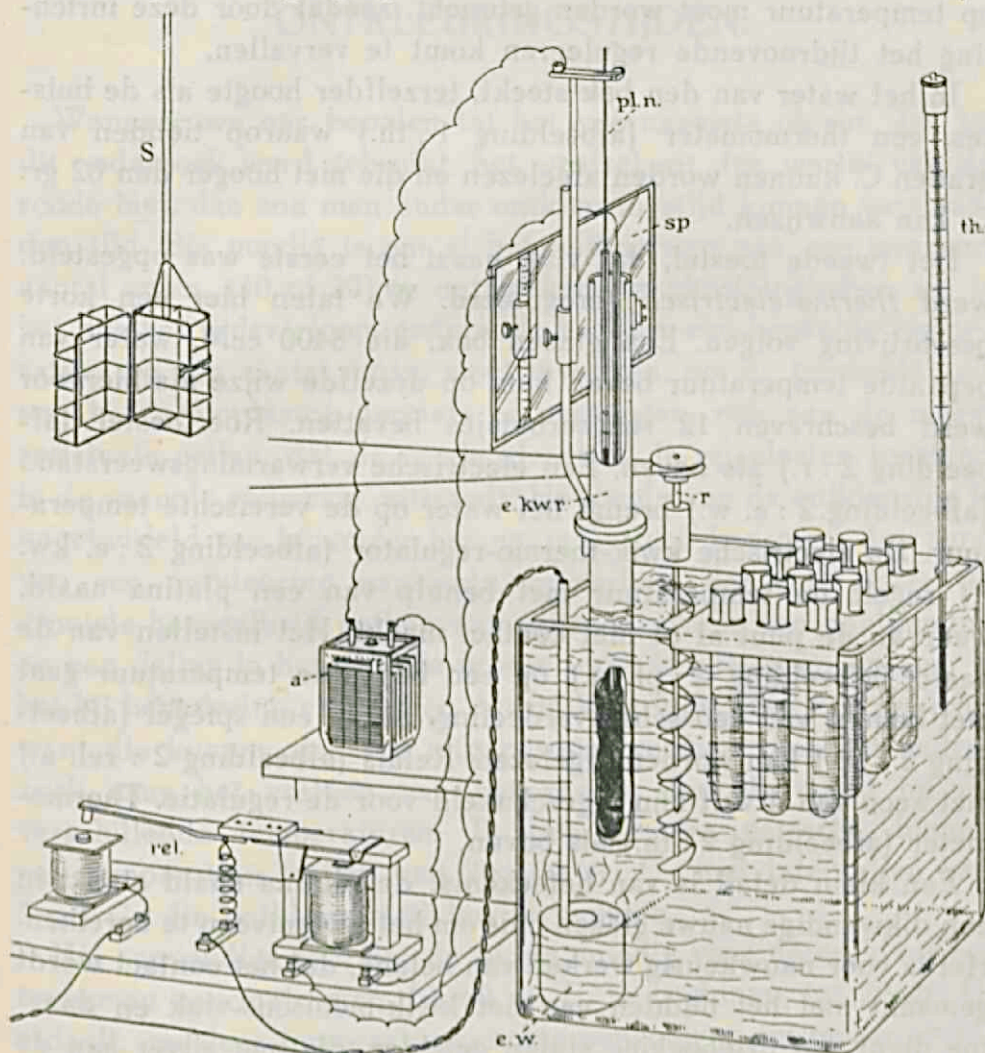


Afbeelding 1.

ding tot de ontkleuringstijden, dat zeker voor de proeven bij 50 gr. C. en lager, maar zelfs voor die bij 55 en 60 gr. C. hun eventuele invloed geheel verwaarloosd kan worden.

De reageerbuizen met het water zijn reeds eenigen tijd op temperatuur als het materiaal er wordt ingebracht. Dit geschiedt met

behulp van een voorgewarmde koperen sonde (afbeelding 2 : S.), die eindigt in een kleine koperen kooi met sluiting, waarin zich de nmsn. bevinden. De mazen van dit netwerk van koperdraad zijn zoo groot mogelijk genomen, zoodat het water onmiddellijk



Afbeelding 2.

de normaalsneden aan alle kanten omspoelt en ze niet ontsnappen kunnen. Dit kleine handige instrument (zie afbeelding) stelde me in staat 20 normaalsneden 10 seconden, ja zoo noodig zelfs 5 seconden, aan een bepaalde temperatuur bloot te stellen om ze in nog veel korter tijd, 2 à 3 seconden, in een ander buisje of zelfs in een toestel van een andere temperatuur over te brengen.

In den bak steekt de algemeen bekende toluol-kwik-thermoregulator (afbeelding 1 : t. kw. th.), die echter van een nieuwe inrichting voorzien is, een mikrokraan met schaalverdeeling (zie

afbeelding 1 : m. kr.), een vinding van *De Bouter*, die van groot practisch nut is. De bijbehorende schaalverdeeling maakt het mogelijk, iederen stand der kraan bij elke bepaalde temperatuur te noteeren, om deze aanwijzingen te gebruiken, als het toestel op temperatuur moet worden gebracht, zoodat door deze inrichting het tijdroovende reguleeren komt te vervallen.

In het water van den bak steekt, terzelfder hoogte als de buisjes, een thermometer (afbeelding 1 : th.) waarop tienden van graden C. kunnen worden afgelezen en die niet hooger dan 62 gr. C. kan aanwijzen.

Het tweede toestel, dat vlak naast het eerste was opgesteld, werd *thermo-electrisch* gereguleerd. We laten hier een korte beschrijving volgen. Een glazen bak, die 8400 ccM. water van bepaalde temperatuur bevat, kan, op dezelfde wijze als hiervoor werd beschreven 12 reageerbuisjes bevatten. Roertoestel (afbeelding 2 : r.) als boven. Een elektrische verwarmingsweerstand (afbeelding 2 : e. w.) brengt het water op de vereischte temperatuur. De elektrische kwik-thermo-regulator (afbeelding 2 : e. kw. r.) regelt de temperatuur met behulp van een platina naald, waarvan de punt al of niet contact maakt. Het instellen van de naald (afbeelding 2 : pl. n.) op een bepaalde temperatuur gaat met behulp van een schaalverdeeling, die in een spiegel (afbeelding 2 : sp.) kan worden afgelezen. Relais (afbeelding 2 : rel. a.) met accu van 4 volt zijn ingeschakeld voor de regulatie. Thermometer (afbeelding 2 : th.) als boven.

Een klein detail is van beteekenis: de platina naald steekt in een dikwandige nauwe glazen buis om het kwikniveau te bereiken. Het is voor nauwkeurig werken van belang, dat het contact wordt gemaakt met het midden van het kwik-meniscus-vlak en daartoe dient een driehoekige stalen geleider, die met zilver aan de naald gesoldeerd is.

ONTKLEURINGSTIJDEN.

Wanneer we ons bepalen tot het voornaamste object, dat bij dit onderzoek werd gebruikt, het weefsel uit den wortel van de roode biet, dan zou men onder ontkleuringstijd kunnen verstaan, den tijd, die noodig is om al het anthocyaan aan een constant aantal nmsn. (10 of 20) te onttrekken. In physiologischen zin is het dus het tijdsverloop, gedurende hetwelk een bepaalde temperatuur op een aantal nmsn. moet inwerken, om de permeabiliteit van het protoplasma dermate te verhoogen, ook van de meest resistente cellen, dat de roode kleurstof, in opgelosten toestand in de vacuole aanwezig, uittreedt. Het begin van de ontkleuring is ongetwijfeld van bijzonder belang, maar toch kan men, den gang van een ontkleuring nagaande, opmerken, dat eerst later de grootste hoeveelheid anthocyaan uittreedt. Er is een opklimming en een daling in het diffusie-proces waar te nemen en daarom is het bij benadering vaststellen der ontkleuringstijden van gewicht, want die kunnen dan het uitgangspunt vormen voor het onderzoek naar het verloop van het proces der uittreding bij de verschillende temperaturen. Ik heb daarom getracht, binnen een temperatuur-traject van 20—60 gr. C., met intervallen van 5 gr. C., die ontkleuringstijden te bepalen.

Het eenvoudige feit, dat de tijden, noodig voor de ontkleuring, *toenemen* naarmate men, bij 60 gr. C. te beginnen, tot 20 gr. C. afdaalt, om deze temperaturen achtereenvolgens, en onder overigens zooveel mogelijk gelijke omstandigheden, op het weefsel te laten inwerken, bewijst al, dat de permeabiliteit in belangrijke mate van de temperatuur afhankelijk is. Bij de toepassing der hoogere temperaturen, waar de ontkleuringstijd maar enkele minuten bedraagt, viel me op, dat de voorbehandeling van het materiaal op dien tijd van invloed is. Zoowel het afspoelen der nmsn. als het daarna korter of langer tijd verblijven in water, doet den ontkleuringstijd, tot een bepaalde grens, grooter worden, om bij een overschrijding van die grens weer aanleiding te zijn tot een kleiner worden. Waar echter bij alle proeven het mate-

riaal in water aan den invloed eener bepaalde temperatuur werd blootgesteld, daar was elimineeren van de inwerking van het water als vanzelf uitgesloten, maar het was wel mogelijk, bij de voorbehandeling dien invloed geheel uit te schakelen. Zoo gebruikte ik dan voortaan niet-afgespoelde nmsn. die, dadelijk nadat ze gesneden waren, voor een proef dienst moesten doen. Toch heb ik, echter alleen voor de temperatuur van 60 gr. C. den invloed van de inwerking van het water bij de voorbehandeling nagegaan.

Zoodra een proef afgeloopen is, worden de nmsn. op vloeipapier uitgespreid en gedroogd, waarna met enkele praedicaten de totale ontkleuring of de mate van ontkleuring wordt aangegeven. Ik onderscheid daartoe behalve kleurlooze nmsn. zulke met zeer kleine anthocyaan-resten, met kleine resten, groote resten en zeer groote resten.

Om den invloed van de voorbehandeling met water eenigszins toe te lichten geven we hieronder de volgende cijfers:

no. v. d. proef no. v. h. materiaal	uren in water	min. op 60 gr.	toestand nmsn.				
			kl.	z. kl. r.	kl. r.	gr. r.	z. gr. r.
14 ; 2	14	12	1	—	—	9	
15 ; 2	14½	15	7	—	3		
16 ; 2	17	16	7	3			
17 ; 2	17½	15	1	4	5		
18 ; 2	17½	15	2	—	8		
19 ; 2	18½	17	8	2			
28 ; 3	1½	5	4	—	6		
30 ; 3	1½	6	8	—	2		
34 ; 3	26	6	—	—	4	—	6
35 ; 3	26	12	2	—	8		
36 ; 3	26½	14	5	—	5		

Als men bij de beschouwing van deze cijfers bedenkt, dat de ontkleuringstijd voor versch materiaal op 6 min. kan gesteld worden, dan ziet men er uit, dat de behandeling der nmsn. met water, in plaats van ze dadelijk versch te gebruiken, den ontkleuringstijd kan verlengen. Het materiaal is van twee verschillende

bieten afkomstig, maar uit dezelfde étage. Ik heb bij 55 gr. C., twee proeven genomen, een vergelijkende ontkleuring dus, die hetzelfde gemakkelijker dan bovenstaande tabel, doet zien. Twee groepen van nmsn., in alle opzichten volkomen equivalent, werden gedurende 20 minuten in water van 55 gr. C. gehouden. De eene groep was versch gesneden en *niet afgespoeld* en de tweede groep eveneens versch gesneden maar *wel afgespoeld*. Het resultaat was, dat de nmsn. van de eerste groep *alle kleurloos* waren en die van de tweede *alle belangrijke anthocyaan resten* hadden.

Een tweede, nog meer voor de hand liggende eisch, voor het bepalen van vergelijkbare ontkleuringstijden is, het constant zijn van oppervlakte en dikte der nmsn. De oppervlakte zoowel als de dikte zijn op die tijden van invloed, maar die van den laatsten factor is grooter dan die van eerstgenoemden. Men kan dit aantoonen met een drietal proeven, waarbij men den ontkleuringstijd bepaalt van 20 nmsn., van 20 halve nmsn. en daarna van 20, die $1\frac{1}{2}$ maal de gebruikelijke dikte van 0.22 m.M. hebben. Ik zal deze proeven in het hoofdstuk, dat over vergelijkende ontkleuringen handelt, uitvoerig documenteeren en hier alleen het eindresultaat vermelden. Men vindt dan bij 60 gr. C. ontkleuringstijden, die zich verhouden als 73 : 49 : 181, terwijl die getallen, als de ontkleuringstijd recht evenredig afhankelijk resp. van oppervlakte en dikte der nmsn. was, zouden moeten zijn: 72 : $37\frac{1}{2}$: $110\frac{1}{2}$. Bij het snijden gebeurt het meermalen, dat een der randen van een nmsn. wat dikker uitvalt en dan zal daar een kleurstofrest blijven nadat zoo'n object gedurende den bepaalden ontkleuringstijd van een bepaalde temperatuur, daaraan is blootgesteld.

Na deze algemeene beschouwingen over *ontkleuringstijd* gaan we over tot de bespreking van de vast te stellen tijden voor de verschillende temperaturen.

De ontkleuringstijd van 10 of 20 nmsn. is bij 60 gr. C. op ongeveer 6 minuten te stellen, wat uit onderstaande tabel kan worden afgeleid.

Tabel 3.

Ontkleuringstijden bij 60 gr. C.

no. v. d. proef no. v. h. materiaal	étage	tijd in min.	toestand nmsn.				
			kl.	z. kl. r.	kl. r.	gr. r.	z. gr. r.
50 ; 3	1	5	—	—	10		
51 ; 3	1	6	8	—	2		
66 ; 4	1	6	5	—	5		
348 ; 73	1	$5\frac{25}{60}$	8	—	12		
349 ; 73	1	$5\frac{25}{60}$	20				
350 ; 73	4	$5\frac{25}{60}$	20				
351 ; 74	1	$6\frac{5}{60}$	16	—	4		
275 ; 39	3	$2\frac{1}{2}$	20				

Men ziet uit deze cijfers, dat er ontkleuringen zijn, die binnen 6 min. afloopen, wat zijn oorzaak zou kunnen vinden in de omstandigheid, dat de methode van het snijden geen volkomen waarborg biedt voor de gelijkmatige dikte der nmsn. Er zijn echter afwijkingen van dezen ontkleuringstijd, die veel grooter zijn en die hun oorzaak niet *kunnen* vinden in een eventueel ongelijke dikte der nmsn. Zoo vond ik een enkele maal ontkleuring in $2\frac{1}{2}$ minuut (proef 275) en dergelijke snelle ontkleuringen zouden kunnen wijzen op een individueele gevoeligheid van een bepaald object voor de permeabiliteitsverhooging door deze temperatuur. Dit vermoeden krijgt een zekere mate van waarschijnlijkheid als men de gedragingen van dit object bij 55 gr. C. nagaat en wanneer dan blijkt, dat ook daar de ontkleuringstijd daalt ver beneden de bij verschillende andere objecten benooidigde.

De ontkleuringstijd bij 55 gr. C. zou bij benadering kunnen worden vastgesteld uit Tabel no. 4.

Tabel 4.

Ontkleuringstijden bij 55 gr. C.

no. v. d. proef no. v. h. materiaal	étage	tijd in min.	loestand nmsn.				
			kl.	z. kl. r.	kl. r.	gr. r.	z. gr. r.
68 ; 4	1	14	3	—	—	7	
69 ; 4	1	20	6	—	4		
70 ; 4	1	20	7	3			
71 ; 4	1	20	10				
83 ; 5	1	20	4	3	—	3	
266 ; 35	2	8	8	—	2		
267 ; 38	1	11	8	—	12		
267' ; 38	1	11	14	—	4	2	
270 ; 39	1	6	15	—	5		
271 ; 39	2	6	15	—	5		
273 ; 39	4	6	20				
274 ; 39	5	6	17	—	3		
348 ; 73	1	6	2	—	6	12	
349 ; 73	1	6	6	14			
350 ; 73	4	6	10	—	6	4	
352 ; 75	1	10½	12	—	—	8	

Er zijn in deze tabel resultaten van proeven verwerkt, waarbij de ontkleuringstijd belangrijk hooger is dan 10 minuten, men lette in dit verband op de nummers: 68, 69, 70, 71 en 83. Andere proeven gaven als tijd, noodig voor ontkleuring, minder dan 10 min. bijv. 273 en 274. Waar ik bij de bespreking van de ontkleuringstijden voor 60 gr. C. de aandacht vestigde op proef no. 275, daar wijs ik hier nog even op de nummers 273 en 274. De beide laatste nummers zijn nl. van hetzelfde exemplaar afkomstig als 275 (materiaal 39). De grootere individueele gevoeligheid van dezen wortel blijkt dus zoowel bij 60 gr. C. als bij 55 gr. C. Ook de nummers 68, 69, 79 en 71 met hunne voor deze temperatuur zoo betrekkelijk hooge ontkleuringstijden zijn van eenzelfde plant. Behalve de individueele verschillen van de verschillende objecten en de verschillende groepen van nmsn. kan hier een meer diepgaand verschil tot uiting zijn gekomen. De eerstgenoemde nummers werden omstreeks 25 Januari bewerkt en de num-

mers 273 en 274 zijn van begin Maart, en in dit tijdsverloop kan een natuurlijke verhooging der permeabiliteit hebben plaats gegrepen, die verband houdt met het ontwaken uit de winterrust bij den aanvang der tweede groeiperiode.

Na deze verschillende overwegingen te hebben doen gelden, meende ik den ontkleuringstijd bij 55 gr. C. op ongeveer 10 minuten te mogen benaderen.

De ontkleuringstijd bij 50 gr. C. zou men op 90 minuten kunnen stellen. Tabel 5 geeft verschillende proeven, die voor een groot deel in die richting wijzen. Een berekend gemiddelde heeft, wat het vaststellen van deze ontkleuringstijden betreft, geen zin, ten eerste, omdat er dan veel meer proeven zouden moeten worden genomen, in de tweede plaats zou men meer eenvormig materiaal moeten gebruiken dan ik in staat was te doen en in de derde plaats zou men rekening moeten houden met de maanden, waarin men dergelijke proeven neemt en de uitkomsten van November tot Mei volkomen uit elkaar moeten houden.

Tabel 5.

Ontkleuringstijden bij 50 gr. C.

no. v. d. proef no. v. h. materiaal	étage	tijd in min.	toestand nmsn.				
			kl.	z. kl. r.	kl. r.	gr. r.	z. gr. r.
117 ; 6	1	80	3	—	17		
118 ; 6	1	80	5	—	15		
109 ; 7	1	70	6	—	8	6	
99 ; 7	1	80	18	—	2		
150 ; 10	1	75	6	—	14		
152 ; 10	4	75	13	—	7		
153 ; 10	4	75	11	—	9		
157 ; 11	4	70	16	—	4		
154 ; 11	1	70	13	—	7		
205 ; 12	1	70	12	—	8		
207 ; 16	1	70	2	7	4	7	
208 ; 17	1	70	13	5	2		
215 ; 19	1	50	2	1	11	6	
284 ; 45	1	114	7	5	8		
284' ; 45	1	105	—	—	7	13	

no. v. d. proef no. v. h. materiaal	étage	tijd in min.	toestand nmsn.				
			kl.	z. kl. r.	kl. r.	gr. r.	z. gr. r.
285 ; 45	1	86	—	—	6	14	
289 ; 46	1	41	—	—	—	20	
294 ; 46	2	56	1	—	6	13	
295 ; 46	1	56	—	—	—	4	16
297 ; 47	2	86½	—	—	20		
299 ; 48	1	86½	4	3	—	6	7
300 ; 48	2	86½	—	—	13	7	
301 ; 48	3	86½	2	9	9		
302 ; 48	4	86½	9	—	11		
302' ; 48	4	86½	7	—	13		
304 ; 50	4	52	20				

Uit deze tabel kan men weer, als in de voorgaande, de individuele verschillen der gebruikte objecten lezen, maar toch wijzen bijna alle nummers er op, dat de ontkleuringstijd voor 20 nmsn. op ongeveer 90 minuten kan worden gesteld.

Uit de nummers 284, 284' en 285 tegenover 299 en 300 blijkt duidelijk, dat biet no. 45 meer resistent was ten opzichte van deze temperatuur dan no. 48. Let men op de nummers 299, 300, 301, 302, 302', welke proeven alle met materiaal van biet no. 48 genomen zijn, dan zou daarin een afnemende resistentie te zien zijn in de verschillende étage's van den wortel en wel van boven naar beneden (étage 1—4).

Proef 304 behoeft een nadere toelichting. De ontkleuringstijd wijkt sterk af van het gemiddelde en waar de 20 nmsn. allen kleurloos zijn, daar zou de inrichting van deze tabel ruimte laten voor de opvatting, dat de totale ontkleuring nog binnen de aangegeven 52 minuten heeft plaats gehad. Ik heb het verloop van deze ontkleuring colorimetrisch nagegaan en kunnen zien, dat in het watermonster, aan het eind der 52 minuten er af geschonken, nog 4.51 pct. anthocyaan (berekend naar een gelijktijdig vervaardigde standaard-oplossing, uit volkomen aequivalent materiaal getrokken) aanwezig was, waardoor dus de duur der ontkleuring meer vast komt te staan. Een bijzondere omstandigheid geeft m.i. een verklaring van dezen sterk afwijkenden ontkleuringstijd. De

bij deze proef gebruikte 20 nmsn. waren afkomstig van een biet die gedurende den geheelen winter, voorzien van de bladeren van het eerste jaar, in een broeibak had gestaan. Het verschil met materiaal van gekulde exemplaren afkomstig wordt hier dus zeer waarschijnlijk veroorzaakt door grootere gevoeligheid van het wortelweefsel voor permeabiliteitsverhooging bij 50 gr. C. omdat dit object door zijn afwijkende behandeling verhinderd werd in de winterrust te gaan.

Een enkele opmerking, over de drie thans besproken ontkleuringstijden kan het best hier een plaats vinden.

Bij het vergelijken der ontkleuringstijden van 60 gr. C., 55 gr. C. en 50 gr. C. valt het op, dat bij gelijke temperatuur-intervallen (5 gr. C.) de ontkleuringstijd bij 50 gr. C. zoo belangrijk verschilt van die bij 55 gr. C. en bij 60 gr. C., welke laatste ontkleuringstijden betrekkelijk zoo weinig verschillen. Het groote verschil wijst naar ik meen, op het verschil in de uitwerking van *supra-maximale* en *infra-maximale* temperaturen. Zal theoretisch iedere temperatuur, die met deze methode op dit weefsel wordt toegepast [zeker tot aan 20 gr. C. maar misschien nog wel lager], na korter of langer tijd in staat zijn om de permeabiliteit te verhoogden tot een punt, waarbij de opgeloste vacuolen-kleurstof uit-treedt, dan blijkt toch uit deze drie ontkleuringstijden, dat de grens tusschen supra- en infra-maximale temperaturen voor deze objecten en omstandigheden loopt tusschen 55 gr. C. en 50 gr. C.

De ontkleuringstijd bij 45 gr. C. is op ongeveer 360 minuten te stellen, wat, gezien de in onderstaande tabel vereenigde gegevens, eerder te hoog dan te laag zal zijn.

Tabel 6.

Ontkleuringstijden bij 45 gr. C.

no. v. d. proef no. v. h. materiaal	étage	tijd in min.	toestand nmsn.				
			kl.	z. kl. r.	kl. r.	gr. r.	z. gr. r.
185 ; 10	1	240	—	—	—	—	20
186 ; 11	1	240	5	15	—	—	—
187 ; 12	1	240	8	—	2	—	10
193 ; 12	4	240	—	8	7	—	5
197 ; 12	3	240	—	—	3	12	5

no. v. d. proef no. v. h. materiaal	étage	tijd in min.	toestand nmsn.				
			kl.	z. kl. r.	kl. r	gr. r.	z. gr. r.
201 ; 12	2	300	—	—	9	—	11
168 ; 13	5'	160	1	—	8	11	
169 ; 13	5"	160	14	—	6		
170 ; 13	5'''	160	15	5			
171 ; 13	5''''	160	14	6			
184 ; 14	1	200	—	9	2	9	
188 ; 14	1	240	4	—	3	5	
189 ; 16	1	180	—	—	—	20	
190 ; 16	2	180	—	—	2	18	
191 ; 16	3	180	2	—	18		
192 ; 16	4	180	1	—	18	1	
315 ; 53	1	218	—	—	—	—	20
315' ; 53	1	225	—	—	—	—	20
204 ; 18	2	300	7	4	9		
200 ; 18	3	240	1	4	10	5	
196 ; 18	4	240	11	9			
203 ; 17	2	300	1	14	5		

De nummers 200, 201, 203, 204, 315, 315', 197, 185, 187 spreken meer of minder duidelijk voor een ontkleuringstijd, hooger dan 300 minuten.

De nummers 168, 169 170, 171 nam ik in deze tabel op, omdat ze een hoogere gevoeligheid voor temperatuur illustreeren, die men in een vijfde étage van de biet kan onderscheiden. Het is de uiterste punt, die weer in vier stukken werd verdeeld. De resistentie tegen de toegepaste warmtegraad neemt naar beneden toe af, wat de gegevens van 5', 5'', en 5''' doen zien. Het verschil tusschen 5''' en 5'''' is te klein om hieruit een conclusie omtrent het verdere verloop van die resistentie te trekken.

Ook in de nummers 204, 200 en 196 is hetzelfde verschijnsel voor de hoogere étage's van de biet waar te nemen.

Bij 40 gr. C. zullen ongeveer 600 minuten noodig zijn om 20 nmsn. volkomen te ontkleuren. Van de temperaturen, die lange

ontkleuringstijden vorderen, heb ik, uit den aard der zaak, minder gegevens dan van die, welke in korter tijd tot ontcleuring leiden. Onderstaande tabel geeft enkele op deze temperatuur betrekking hebbende gegevens.

Tabel 7.

Ontkleuringstijden bij 40 gr. C.

no. v. d. proef no. v. h. materiaal	étage	tijd in min.	toestand nmsn.				
			kl.	z. kl. r.	kl. r.	gr. r.	z. gr. r.
222 ; 19	1	580	18	—	2		
223 ; 19	2	580	9	—	11		
220 ; 22	1	580	20				
221 ; 22	2	580	10	10			
240 ; 28	1	420	5	—	2	8	5
241 ; 28	2	420	—	—	—	20	
242 ; 30	1	420	8	—	3	—	9
243 ; 30	2	420	10	—	2	2	6
317 ; 54	1	315	—	—	—	—	20
318' ; 55	1	320	—	—	—	—	20

De nummers 220 en 221 wijzen op een ontcleuring bij ongeveer 600 minuten. Het object no. 22, dat bij deze twee proeven dienst deed, bevatte anthocyaan van een paarsroode nuanceering. Vele andere objecten, die ik gebruikte, hadden een meer *geelroode* kleurstof. Het verschil van kleur is in de oplossingen zeer duidelijk waar te nemen. Deze kleurverschillen worden veroorzaakt door een verschil in de aciditeit van het celvocht³⁰⁾ ³¹⁾. In het algemeen kon ik opmerken, dat het paarsroode anthocyaan gemakkelijker uittreedt dan het geelroode.

Bij 35 gr. C. is de ontcleuringstijd zeer moeilijk aan te geven, omdat die bij verschillende objecten zoo sterk uiteen loopt, wat uit tabel 8 kan blijken.

³⁰⁾ Hans Molisch; Mikrochemie der Pflanze 3te Auflage. Jena 1923. Pag. 264 e.v.

³¹⁾ R. Willstätter: Untersuchungen über Anthocyane. Liebigs Annalen der Chemie 1913, 1915 en 1917.

Tabel 8.

Ontkleuringstijden bij 35 gr. C.

no. v. d. proef no. v. h. materiaal	étage	tijd in min.	toestand nmsn.				
			kl.	z. kl. r.	kl. r.	gr. r.	z. gr. r.
228 ; 26	1	810	20				
229 ; 26	2	810	20				
230 ; 26	3	810	20				
231 ; 26	4	810	20				
236 ; 28	1	735	20				
237 ; 28	2	735	20				
238 ; 28	3	735	20				
239 ; 28	4	735	20				
319 ; 55	2	1080	—	—	—	—	20
320 ; 56	1	1215	—	—	—	10	10
322 ; 57	1	1540	5	5	10		
324 ; 58	1	1540	—	—	—	14	6
328 ; 60	1	1470	10	—	10		
330 ; 61	1	1350	20				
342 ; 70	1	3210	15	—	15		
342' ; 70	4	3210	—	9	9	2	
344 ; 71	1	2580	3	—	4	13	
344' ; 71	4	2580	20				

Uit de nummers 228, 229, 230 en 231, alle op denzelfden wortel betrekking hebbend, zou men afleiden, dat de ontkleuringstijd 810 minuten is, maar het is best mogelijk, dat de totale ontkleuring reeds eerder is ingetreden en dat is zelfs waarschijnlijk, als men bedenkt, dat er geen verschil is tusschen de uitkomsten van materiaal, dat uit verschillende étage's genomen is.

Dezelfde opmerking geldt voor de nummers 236, 237, 238 en 239; daar zal de werkelijke ontkleuringstijd dus waarschijnlijk kleiner geweest zijn dan 735 minuten. Aangezien ik bij het nemen van deze proeven nog niet over een colorimeter kon beschikken, is daarbij het verloop der ontkleuringen niet nagegaan, en kan ik dus niet aangeven, hoeveel die tijden beneden 735 minuten blijven.

Hoewel de nummers 319, 320 en 322 van verschillende bieten zijn resp. 55, 56 en 57, kunnen ze toch wel met elkaar vergeleken worden en mag men de ontkleuringstijd voor alle drie op meer dan 1540 minuten stellen. Uit de nummers 342 en 342' blijkt, dat de ontkleuringstijd voor biet no. 70 op meer dan 3210 minuten moet worden gesteld. De nummers 344 en 344' toonen duidelijk een toenemende resistentie van 4 naar 1.

De ontkleuringstijd bij 30 gr. C. kan uit tabel 9 blijken en is even fluctuabel als bij 35 gr. C.

Tabel 9.

Ontkleuringstijden bij 30 gr. C.

no. v. d. proef no. v. h. materiaal	étage	tijd in min.	toestand nmsn.				
			kl.	z. kl. r.	kl. r.	gr. r.	z. gr. r.
224 ; 25	1	1110	1	—	6		13
225 ; 25	2	1110	14	1	5		
226 ; 25	3	1110	10	7	—	3	
227 ; 25	4	1110	16	4			
321 ; 56	1	1095	—	—	—	—	20
323 ; 57	1	1540	—	—	—	—	20
325 ; 58	1	1540	—	—	—	—	20
327 ; 59	1	1320	—	—	—	—	20
329 ; 60	1	1470	—	—	—	12	8
331 ; 61	1	1350	—	—	—	7	13
331' ; 61	1	2170	12	—	8		
343 ; 70	1	3110	—	—	10	5	5
343' ; 70	4	3110	20				
345 ; 71	1	2560	—	—	—	3	17
345' ; 71	4	2560	—	—	—	7	13

De nummers 224, 225, 226 en 227 zouden voor biet no. 25 op een betrekkelijk lagen ontkleuringstijd wijzen, welke voor étage 1 op 1500 minuten is te schatten. De resistentie-verschillen van 1 en 4 komen duidelijk uit, die tusschen 2 en 3 omgekeerd, als men bij een geleidelijke afname der resistentie naar beneden toe, zou verwachten.

Alle overige nummers uit deze reeks, voor zoover ze betrekking hebben op de hoogste étage der objecten en afkomstig zijn van 8 verschillende bieten, zijn vergelijkbaar en wijzen op een ontkleuringstijd ver boven 1540 minuten en waarschijnlijk zelfs nog hoger dan 3110 minuten. Nummer 343' toont weer duidelijk de hoogere gevoeligheid van de vierde étage en wettigt de conclusie, dat, althans voor biet no. 70, de eerste étage enkele uren langer dan 3110 minuten nodig zal hebben voor de totale ontkleuring.

De ontkleuringstijd bij 25 gr. C. is voor de eerste étage op meer dan 4000 minuten te stellen. Tabel 10 bevat de gegevens die daarop wijzen.

Tabel 10.

Ontkleuringstijden bij 25 gr. C.

no. v. d. proef no. v. h. materiaal	étage	tijd in min.	toestand nmsn.				
			kl.	z. kl. r.	kl. r.	gr. r.	z. gr. r.
334 ; 63	1	3965	3	—	—	9	8
334' ; 63	2	3965	16	—	4		
334'' ; 63	3	3965	—	—	—	—	20
334''' ; 63	4	3965	20				
335 ; 64	1	2730	1	—	17	2	
335' ; 64	2	2730	15	5			
335'' ; 64	3	2730	—	—	—	20	
335''' ; 64	4	2730	20				
336 ; 65	1	2820	—	—	8	5	7
336' ; 65	2	2820	—	—	10	10	
336'' ; 65	3	2820	—	—	—	8	12
336''' ; 65	4	2820	—	—	18	2	

Er is materiaal gebruikt van drie verschillende wortels, de nummers 63, 64 en 65. Merkwaardig is de opvallend verhoogde resistentie van étage 3, die zelfs grooter is dan die bij 1 en 2. Ook hier valt weer in het oog, dat étage 4 het minste weerstand biedt en vergeleken met de andere deelen in denzelfden tijd een sterker verhoogde permeabiliteit vertoont.

Uit de nummers van biet 64 blijkt, dat de ontkleuringstijd voor étage 1 lager is dan 4000 minuten en wellicht op ongeveer 3000

zal komen te staan. Biet 65 zal echter in resistentie met 63 ongeveer overeenkomen.

Ontkleuringstijden te bepalen bij 20 gr. C. zou een geheel afzonderlijke techniek vereischen. Het materiaal moet te lang in het toestel blijven, zoodat infectie's door Bacteriën en Actinomycten vaak voorkomen, wat aan den vorm der ontkleuringen in sommige gevallen te zien is. Er treden dan zeer scherp afgegrensde ontkleurde plekken op, die men bij ontkleuring door temperatuur-invloeden nooit waarneemt. Wel heb ik enkele gegevens van die temperatuur verzameld, maar een betrouwbare totale ontkleuring heb ik nooit verkregen. In een bepaald geval was na ongeveer 6000 minuten maar een betrekkelijk kleine hoeveelheid anthocyaan uitgetreden. In een hoofdstuk over vergelijkende ontkleuringen zal er gelegenheid zijn op deze temperatuur en de daarmede verkregen gegevens terug te komen.

HET VERLOOP DER ONTKLEURINGEN.

Om het verloop van een ontkleuring na te gaan en daaromtrent cijfers te verkrijgen, die voor het construeeren van krommen konden dienen, heb ik eerst een methode uitgewerkt, die later weliswaar werd verlaten, omdat het gebruik van een colorimeter de voorkeur verdient, maar die toch dienst kan doen, als men niet over zoo'n instrument kan beschikken.

Deze methode berust op het vervaardigen van een normaalschaal van anthocyaan-oplossingen. Het maken van een dergelijke *kleurenschaal* kan op verschillende wijzen geschieden en het kwam er op aan daaruit die te kiezen, waarbij de kleuren het langst houdbaar zijn. Trekt men de kleuren uit door middel van zoutzuuroplossingen van 3 pct.—10 pct., dan kan men weliswaar in zeer korten tijd een normaalschaal samenstellen, maar ze is weinig houdbaar en bovendien moet men iedere, door proefneming verkregen, anthocyaan-oplossing eerst aanzuren om ze te kunnen vergelijken met een nummer van de schaal. Verder trachtte ik met kunstmatige kleurstoffen een vergelijkbare schaal samen te stellen door toepassing van de verdunningsmethode, maar het leverde geen bevredigend resultaat. Zoo maakte ik schalen van *carmijn-nacaraat* en ook van *saffranine*, maar de nuanceeringen waren bijna nooit te vergelijken met die van natuurlijke anthocyaan-oplossingen.

Misschien zal het mogelijk blijken een kleurenschaal te maken uit het roode precipitaat, dat men verkrijgt, wanneer men lood-acetaat aan een anthocyaan-oplossing toevoegt, terwijl dit tevens de weg zou kunnen zijn om een quantitatieve bepaling van de anthocyaan-oplossingen te verkrijgen, die ongetwijfeld aan de verschillende daaruit verkregen cijferwaarden meer vastheid zouden geven, dan de door mij langs anderen weg gevondene bezitten.

Ik maakte dan op de volgende wijze een natuurlijke kleuren-schaal van anthocyaan-oplossingen van verschillend gehalte, die

vergeleken konden worden met de oplossingen, die bij proefneming verkregen werden, om zodoende het uittreden van anthocyaan in cijfers te brengen.

In 10 of 20 ccM. leidingwater van 55 gr. C. worden 10 of 20 nmsn. volkomen ontkleurd. Het geheel kleurlooze weefsel wordt verwijderd en de verkregen oplossing wordt in een reageerbuisje gegoten. Deze normaaloplossing krijgt in de kleurenschaal het getal 100.

In 10 of 20 ccM. leidingwater van 55 gr. C. worden 9 of 18 nmsn. volkomen ontkleurd. Het ontkleurde weefsel enz. enz. (als boven). Deze normaaloplossing vertegenwoordigt in de kleuren-schaal het getal 90.

Op dezelfde wijze worden de getallen 80-70-60-50-40-30-20 en 10 verkregen. In sommige gevallen heeft men de getallen 15-25-35 enz. nodig, welke gemakkelijk door mengen verkregen kunnen worden. Het getal 100 stelt dus voor: *de totale hoeveelheid anthocyaan, die in 10 of 20 nmsn. aanwezig is*, opgelost in 10 of 20 ccM. water.

Het getal 10 stelt voor: *de totale hoeveelheid anthocyaan, die in 1 of 2 nmsn. aanwezig is*. enz.

Het voordeel van deze schaal is, dat ze betrekkelijk goed houdbaar is en althans in den loop van 24 uur niet belangrijk verandert. Langer constant blijven van de kleuren is niet noodzakelijk, gezien de omstandigheid, dat men alleen weefselfragmenten van eenzelfde biet vergelijkt en elken dag versch materiaal neemt.

De anthocyaan-oplossingen, die bij proefnemingen verkregen worden, zijn dadelijk te vergelijken met de nummers van de schaal en behoeven dus niet eerst een bewerking te ondergaan, zooals bij het gebruik van zoutzuur het geval is.

Het vergelijken der verschillende kleur-nuanceeringen vereischt oefening, het gaat op de volgende wijze. Men plaatst de verkregen oplossing achtereenvolgens naast de nummers uit de schaal, iets boven een witten ondergrond en kijkt loodrecht in de monding der buisjes. Al vergelijkende sluit men het proef-object in tusschen twee nummers van de schaal, tenzij het met een dier nummers juist in kleur overeenkomt.

Zoo verkrijgt men dan bruikbare cijferwaarden.

Deze methode biedt een enkel voordeel boven die met den colorimeter, nl. dit, dat men vloeistofkolommen heeft van 10-15

cm. hoogte, terwijl bij een colorimeter voor kleine hoeveelheden die kolom slechts 5 cm. hoog is.

Het spreekt wel vanzelf, dat men in het algemeen met een colorimeter veel nauwkeuriger kan werken dan op de boven beschreven manier. Ik gebruikte dan ook voortaan dien van *Jules Dubosq*, die in tweeërlei uitvoering in den handel wordt gebracht nl. voor het onderzoek van groote hoeveelheden vloeistof en geschikt voor dat van kleine hoeveelheden. Aangezien de eerstbedoelde uitvoering cuvetten heeft, die 80 ccM. kunnen bevatten, gebruikte ik het andere toestel, waarbij de inhoud der cuvetten 13 ccM. bedraagt.

Zooals bekend is, kunnen bij dit instrument twee verticaal staande cylindervormige cuvetten op en neer bewogen worden door twee instelschroeven, teneinde den meniscus van de vloeistof, die zich er in bevindt, in aanraking te brengen met twee vaste kristallen dompelaars, die op die wijze het hinderlijke meniscus-verschijnsel volkomen elimineeren. Zoo kan men, door een boven aan het toestel zich bevindend oculair, twee aaneensluitende halve cirkelvlakken zien, door een loodrechte middellijn gescheiden en een of beide schroeven zoolang instellen, tot kleur- en lichtintensiteit van beide vlakken volkomen gelijk zijn. Het licht, door een spiegel omhoog geworpen, passeert de glazen bodems der cuvetten en de vloeistof-zuilen, gaat door de kristallen dompelaars, wordt door een prisma naar het cirkelvormig gezichtsveld gebroken en komt door het oculair in het oog.

Men moet bij het gebruik van dit eenvoudige toestel in acht nemen, dat men vóór het bepalen van een colorimetrische waarde, het toestel zonder cuvetten op 0 stelt om daarna hetzelfde te doen met de ledige cuvetten, en dan eerst de te vergelijken vloeistoffen er in te schenken. Waar het gebruik van den colorimeter berust op de kleurgevoeligheid van het menschelijk oog, daar zal een individueele invloed op het bepalen van colorimetrische waarden niet kunnen worden uitgeschakeld. Het bleek mij verder, zoowel bij mezelf als bij anderen, dat linker en rechter oog niet in gelijke mate gevoelig zijn voor de een of andere kleur, zoodat men bij het instellen daarmede moet rekenen.

Het verdient aanbeveling de linker cuvette steeds voor de standaard-vloeistof te gebruiken en de rechter altijd voor het te bepalen kleurstof-monster. Bij het aflezen van de schaalverdeling, met behulp van een nonius, leest men eerst den linker kant

af en dat getal is de teller van een breuk, die als noemer heeft het rechts af te lezen getal. Deze breuk geeft aan, na in procenten te zijn omgerekend, welk anthocyaan-gehalte de monster-oplossing heeft van de standaard-oplossing.

Het komt herhaaldelijk voor, dat de te vergelijken kleuren colorimetrisch niet volkomen zijn overeen te brengen, zoodat men zich dan met de intensiteit moet tevreden stellen en dan doet men het best om de standaard-zijde iets *hooger* (letterlijk) in te stellen, zoodat die helft dan een eenigszins *lagere intensiteit* in het oculair-beeld geeft.

Er blijft ook bij het gebruik van dit toestel iets te wenschen over. In sommige gevallen voelde ik het gemis aan een colorimeter voor kleine hoeveelheden met een grootere cuvetten-hoogte, want die is bij de groote colorimeter 10 c.M. maar bij den door mij gebruikten slechts 5 c.M.

Toen ik colorimetrische waarden ging bepalen was de eerste vraag, die moest worden beantwoord: met welke standaard-oplossing moeten de verschillende anthocyaan-oplossingen vergeleken worden?

In het eerst heb ik gebruik gemaakt van een oplossing, die gemaakt werd, terwijl het te onderzoeken object aan een bepaalde temperatuur werd blootgesteld. Het materiaal voor de standaardoplossing en dat voor de proef was zooveel mogelijk gelijkwaardig:

van dezelfde biet, uit dezelfde étage, van hetzelfde parallelipedum, gelijktijdig gesneden met om den ander een normaal-snede voor de proef en voor de standaard-oplossing; hetzelfde aantal nmsn.; gelijktijdig in het toestel gebracht; op hetzelfde oogenblik er weer uitgehaald.

Daar ik van te voren niet afspoelde, bevatte het eerste kleurstof-monster, dat van het proefobject werd afgegoten, *afgespoeld* anthocyaan. Het was nu moeilijk uit te maken of dit monster ook *uitgetreden* anthocyaan bevatte en ook bij het tweede monster kon nog afgespoeld anthocyaan zijn. De standaard-oplossing bevatte al het anthocyaan, zoowel het afgespoelde als het uitgetreden. Volgens deze werkwijze ging ik het verloop van talrijke ontkleuringen na. Later heb ik het maken van standaard-oplossingen, naast de te nemen proeven, nagelaten en wel voornamelijk, omdat bij deze methode toch altijd *twee groepen* van 20

nmsn. gebruikt moesten worden. Ik ging toen anders te werk en bracht bij het begin van een proef de te onderzoeken nmsn. met de sonde in het toestel, waarna de sonde, gedurende enkele seconden bij de hoogere temperaturen en wat langer bij de lagere, snel heen en weer werd bewogen. Dit eerste monster, dat dadelijk werd afgegoten, werd in plaats van de vroegere standaard-oplossing gebruikt en alle op een proef betrekking hebbende oplossingen werden dus met het op dezelfde temperatuur afgespoelde anthocyaan van *dezelfde* nmsn. vergeleken. Op het eerste gezicht lijkt deze methode een minder vaste basis te geven voor de colorimetrische bepalingen. Zonder twijfel is ze in zekere mate relatief te noemen. Als men echter het afgespoelde anthocyaan van *verschillende groepen van normaalsneden* in afzonderlijke oplossingen van eenzelfde aantal ccM. water brengt, daarna die oplossingen colorimetrisch onderling vergelijkt en de gevonden waarden in procenten omrekent, dan blijken de verschillen, die men vindt, 5 pct. meestal niet te boven te gaan.

Om het verloop van een ontkleuring na te gaan doet dit verschil absoluut niet ter zake en bij het maken van vergelijkende ontkleuringen en afgebroken ontkleuringen is het van bijzonder weinig beteekenis.

We zullen nu enkele ontkleuringen bij de verschillende temperaturen nagaan en bespreken.

In de eerste plaats dan een ontkleuring bij 60 gr. C. zonder gebruik te maken van een afzonderlijke standaard-oplossing, maar waarbij de colorimetrische waarden zijn verkregen door de afgeschonken monsters te vergelijken met het in de eerste 5 seconden afgespoelde anthocyaan.

Tabel 11.

Temperatuur: 60 gr. C.

no. v. d. proef: 348.

no. v. h. materiaal: 73—1.

no. v. d. opl.	tijd in sec.	col. waarde	% anth.
1	5	—	—
2	10	50/340	14,70
3	10	30/410	7,31

<i>no. v. d. opl.</i>	<i>tijd in sec.</i>	<i>col. waarde</i>	<i>% anth.</i>
4	10	35/330	10,60
5	10	35/360	9,72
6	10	30/310	9,67
7	10	49/300	16,33
8	10	36/300	12,—
9	10	40/347	11,52
10	20	50/233	21,45
11	40	50/223	22,42
12	60	38/250	10,85
13	120	50/290	17,24

12 zeer kleine anthocyaan-resten en 8 kleurloos.

Men ziet in deze tabel bij de eerste oplossing geen colorimetrische waarde ingevuld, omdat dit een oplossing is van *afgespoeld* anthocyaan, waarmee alle overige oplossingen (van 2—13) van *uitgetreden* anthocyaan vergeleken zijn. Vergelijkt men de procenten van de oplossingen 2, 3 en 4, dan mag men hieruit afleiden dat no. 1 niet al het afgespoelde anthocyaan bevatte, maar dat ook een deel in het tweede monster is gekomen, in verband met de omstandigheid, dat het uittredingsproces langzaam begint en geleidelijk in snelheid toeneemt. Men mag dus met het oog op de 7.31 pct. van het derde monster aannemen, dat in 2 ongeveer 6 pct. uitgetreden anthocyaan is en 8.7 pct. afgespoeld anthocyaan. Bij het maken van een kromme is de consequentie van het hiervoor opgemerkte: dat in de eerste 15 sec. dat de proef duurde ongeveer 6 pct. anthocyaan is uitgetreden. Verder wordt uit een en ander *waarschijnlijk*, dat in de eerste 5 seconden geen anthocyaan uittreedt.

Na 35 seconden (oplossing 3) is er een stijging in het proces van uittreding, dat daarna weer gedurende twee perioden van 10 seconden stationair blijft. In oplossing 7; 65 seconden na het begin van de proef, een laatste belangrijke stijging, daarna daling en stabiliteit in 4 perioden van 10 seconden, als men oplossing 10 beschouwt als twee intervallen van 10 seconden te vertegenwoordigen. Nu volgt een sterke daling (50 pct. van de voorgaande perioden) 145 seconden na het begin, wat kan blijken uit oplos-

sing 11. In oplossing 12 is de daling van het anthocyaan-gehalte verder gegaan, zoodat dit nog geen 35 pct. van de voorgaande oplossing bedraagt. In de laatste oplossing is eveneens daling te constateeren. Dat het verloop van deze ontkleuring een juist beeld geeft van het uittredingsproces, bewijst de omstandigheid, dat nog 12 zeer kleine resten achter zijn gebleven. Is alles kleurloos, dan is de tijdduur voor het maken van de laatste oplossing geen juiste maatstaf meer.

Bij andere ontkleuringen van 60 gr. C. kan het proces soms andere fluctuaties vertoonen.

In Tabel 12 zijn de gegevens van een andere ontkleuring opgenomen, waarbij men, gelet op de nummers der oplossingen 3 en 5, hetzelfde verloop kan zien met eenzelfde voortgezette daling in de nummers van 6 tot en met 10.

Tabel 12.

Temperatuur: 60 gr. C.

no. v. d. proef: 351.

no. v. h. materiaal: 74—1.

<i>no. v. d. opl.</i>	<i>tijd in sec.</i>	<i>col. waarde</i>	<i>% anth.</i>
1	5	—	—
2	15	27/315	8,75
3	15	39/340	11,47
4	15	30/300	10,—
5	15	50/320	15,62
6	30	66/290	22,75
7	30	58/300	19,33
8	60	57/330	17,27
9	60	40/375	10,66
10	120	37/340	10,88

16 nmsn. kleurloos: 4 met kleine resten.

De maxima der uittreding zijn vet gedrukt.

Voor de ontkleuring bij 55 gr. C. kiezen we proef 349' van het materiaal-nummer 73, een exemplaar met sterk uitgelopen bladeren en wortels. De gegevens vindt men in de volgende tabel.

Tabel 13.

Temperatuur: 55 gr. C.

no. v. d. proef: 349'.

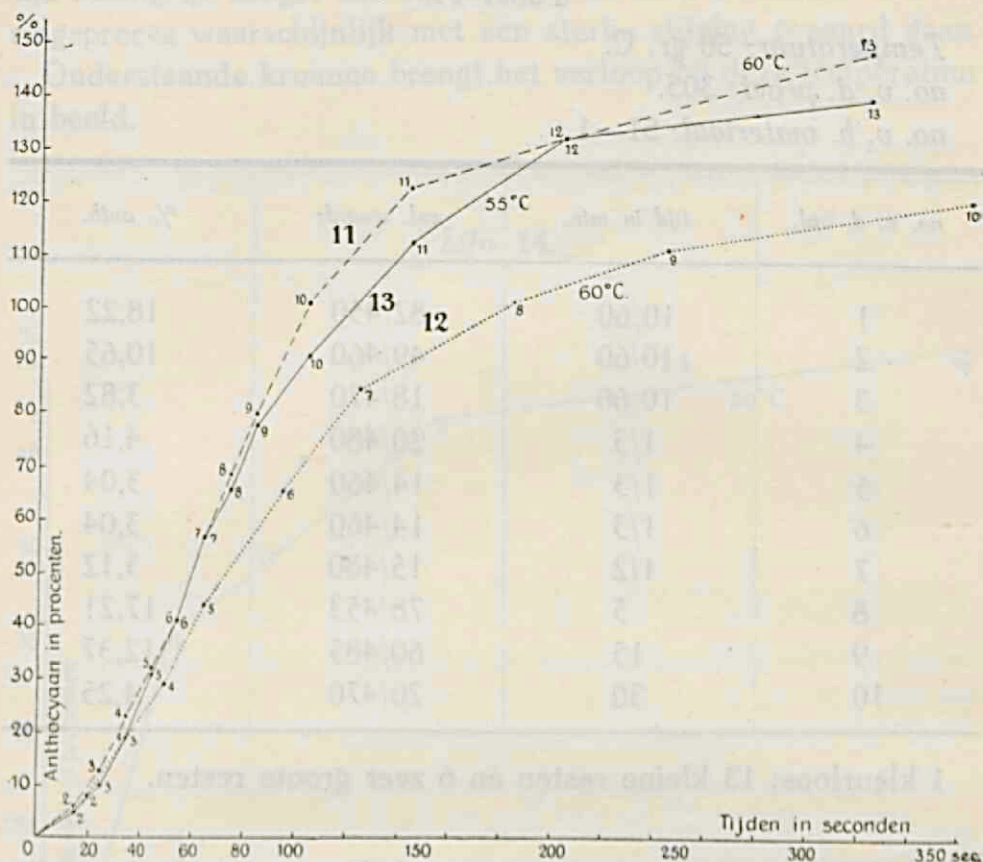
no. v. h. materiaal: 74—1.

no. v. d. opl.	tijd in sec.	col. waarde	% anth.
1	5	—	—
2	10	30/404	7,42
3	20	20/380	5,26
4	10	35/380	9,21
5	10	50/400	12,5
6	10	40/380	10,52
7	10	50/300	16,66
8	10	40/440	9,09
9	10	40/330	12,12
10	20	47/350	13,42
11	40	80/350	22,85
12	60	65/320	20,31
13	120	38/440	8,63

De maxima der uittreding zijn vet gedrukt.

Er is geen standaard-oplossing gemaakt, maar oplossing 1 is de maatstaf waarmede de colorimetrische waarden der overige oplossingen werden bepaald. Waar oplossing 2, 3 en 4 resp. 7.42 pct., 5.26 pct. en 9.21 pct. geven, ligt het voor de hand, gezien de overal door mij waargenomen kleinere aanvangssnelheid van het ontkleuringsproces, dat oplossing 2 nog *afgespoeld* anthocyaan bevat, zoodat men het gehalte van deze oplossing op ongeveer 5 pct. mag stellen en dat zal eerder te hoog dan te laag zijn. Bij het construeeren van de kromme stelde ik het vast op 5 pct. Het proces stijgt tot oplossing 5, daling in oplossing 6, belangrijke stijging in oplossing 7, sterke daling in oplossing 8, stijging in 9 en voortgezette toenemende daling tot het einde. Ook hier is nog niet alles volkomen ontkleurd, want er zijn 14 zeer kleine anthocyaan-resten.

Lijn 11, 12 en 13.



Deze krommen hebben betrekking op de gelijknamige tabellen. Na de uitvoerige bespreking der tabellen nog enkele opmerkingen naar aanleiding van deze lijnen. De krommen 11 en 13 zijn van eenzelfde wortel en illustreeren behalve het verloop der ontcleuring bij 60 gr. C. en 55 gr. C. de betrekkelijk geringe afwijking van dat verloop bij supra-maximale temperaturen, die slechts 5 graden C. uiteen liggen.

In lijn 12 zijn gegevens van een anderen wortel gebruikt en het verloop van deze kromme bewijst, dat het verschil in individueele resistentie bij verschillende wortels vaak zeer belangrijk kan zijn, grooter zelfs dan bij een temperatuur-interval van 5 gr. C. bij gelijkwaardig materiaal tot uiting komt.

De methode, waarop de lijnen werden geconstrueerd, is op pag. 32 uiteengezet.

Voor de ontcleuring bij 50 graden C. deed proef 305 dienst om het verloop na te gaan. Het materiaal-nummer is 51. Tabel 14 bevat alle gegevens.

Tabel 14.

Temperatuur: 50 gr. C.

no. v. d. proef: 305.

no. v. h. materiaal: 51—1.

no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarde	% anth.
1	10/60	82/450	18,22
2	10/60	49/460	10,65
3	10/60	18/470	3,82
4	1/3	20/480	4,16
5	1/3	14/460	3,04
6	1/3	14/460	3,04
7	1/2	15/480	3,12
8	5	78/453	17,21
9	15	60/485	12,37
10	30	20/470	4,25

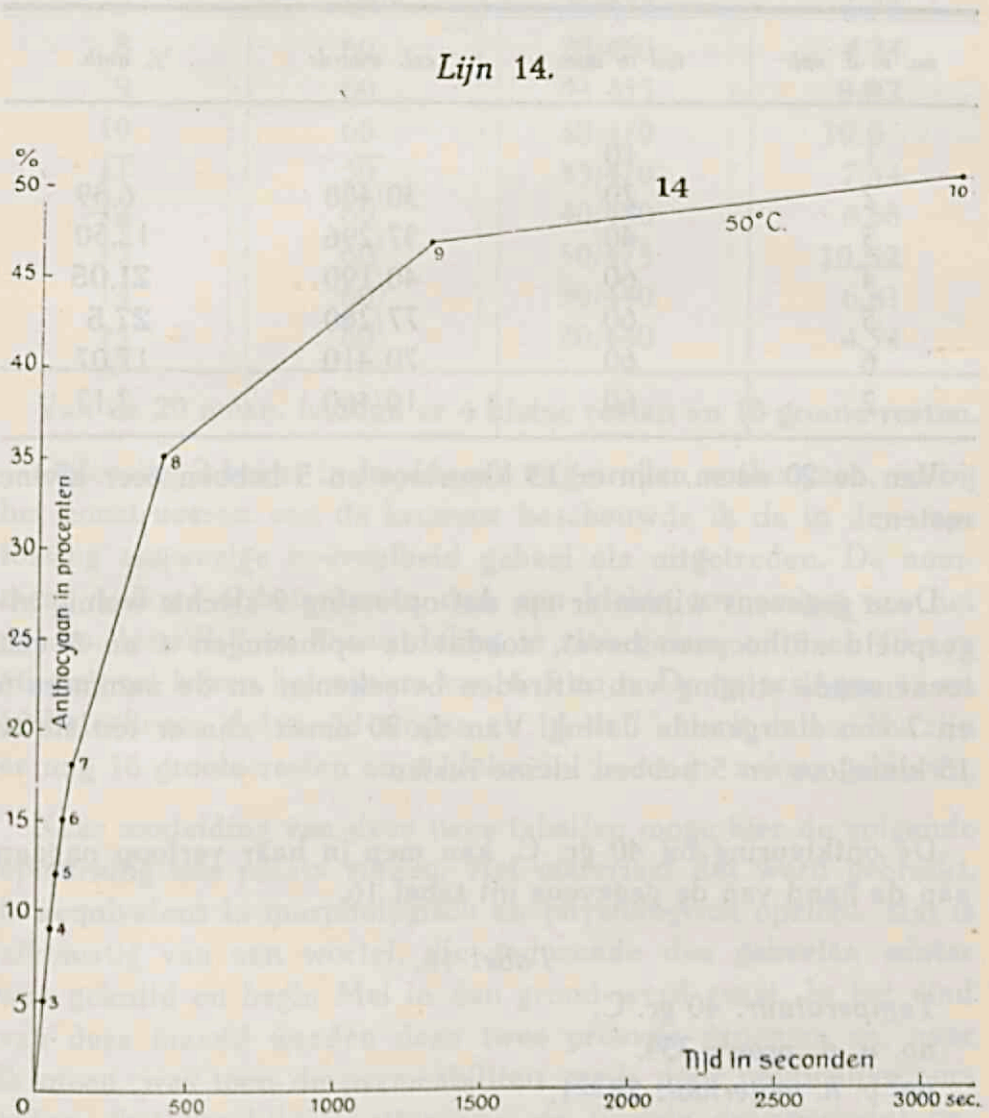
1 kleurloos; 13 kleine resten en 6 zeer groote resten.

De gegevens uit deze tabel geven al direct aanleiding tot discussie, omdat hier met een standaard-oplossing is gewerkt, en de eerste vraag welke beantwoord moet worden, alvorens men een kromme kan uitzetten, deze is: waar is de grens tusschen het *afgespoelde* en het *uitgetreden* anthocyaan? De getallen wijzen in dit geval die grens betrekkelijk duidelijk aan. Oplossing 1 bestaat waarschijnlijk geheel uit *afgespoeld* anthocyaan en oplossing 2 grootendeels, zoodat men naar schatting hoogstens 2 pct. van die oplossing, aangegeven op 10.65 pct., mag beschouwen als te behooren tot het *uitgetreden* anthocyaan.

Dit is dan ook de basis voor de constructie van het eerste traject voor de kromme, die bij deze temperatuur behoort. Bij het uitzetten van lijnen liet ik overal de cijfers achter het decimaalteeken buiten beschouwing. De oplossingen 1, 2 en 3 werden dus samen genomen, de tijd is dan 30 seconden en het *uitgetreden anthocyaan* 5 pct. Bij 4 trad dus dadelijk een daling in, voortgezet bij 5. Verder geven de nummers 7, 8, 9 en 10 een toenemende daling te zien. Waar nu de behandelde nmsn. op dit oogenblik nog 6 zeer groote resten en 13 kleine bevatten, is de ontkleurings-

tijd belangrijk hoger dan 52 minuten, en zal het verdere ontkleuringsproces waarschijnlijk met een sterke stijging gepaard gaan.

Onderstaande kromme brengt het verloop bij deze temperatuur in beeld.



Van de ontkleuring bij 45 gr. C. bepaalde ik met de gegevens van tabel 15 het verloop.

Tabel 15.

*Temperatuur: 45 gr. C.**no. v. d. proef: 360.**no. v. h. materiaal: 78—1.*

<i>no. v. d. opl.</i>	<i>tijd in min.</i>	<i>col. waarde</i>	<i>% anth.</i>
1	10	—	—
2	20	30/488	6,89
3	40	37/296	12,50
4	60	40/190	21,05
5	60	77/280	27,5
6	60	70/410	17,07
7	60	10/460	2,17

Van de 20 nmsn. zijn er 15 kleurloos en 5 hebben zeer kleine resten.

Deze gegevens wijzen er op, dat oplossing 2 slechts weinig afgespoeld anthocyaan bevat, zoodat de oplossingen 4 en 5 een toenemende stijging van uittreden beteekenen en de nummers 6 en 7 een doorgaande daling. Van de 20 nmsn. zijn er ten slotte 15 kleurloos en 5 hebben kleine resten.

De ontkleuring bij 40 gr. C. kan men in haar verloop nagaan aan de hand van de gegevens uit tabel 16.

Tabel 16.

*Temperatuur: 40 gr. C.**no. v. d. proef: 359.**no. v. h. materiaal: 78—1.*

<i>no. v. d. opl.</i>	<i>tijd in min.</i>	<i>col. waarde</i>	<i>% anth.</i>
1	10	—	—
2	20	15/433	3,46
3	40	20/465	4,32
4	60	30/390	7,69
5	60	30/384	7,81

no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarde	% anth.
6	60	26/320	8,12
7	60	25/437	5,72
8	60	20/460	4,34
9	60	44/433	9,93
10	60	50/470	10,6
11	50	35/470	7,44
12	60	40/450	8,88
13	60	50/475	10,52
14	60	30/440	6,81
15	60	20/440	4,54

Van de 20 nmsn. hadden er 4 kleine resten en 16 groote resten.

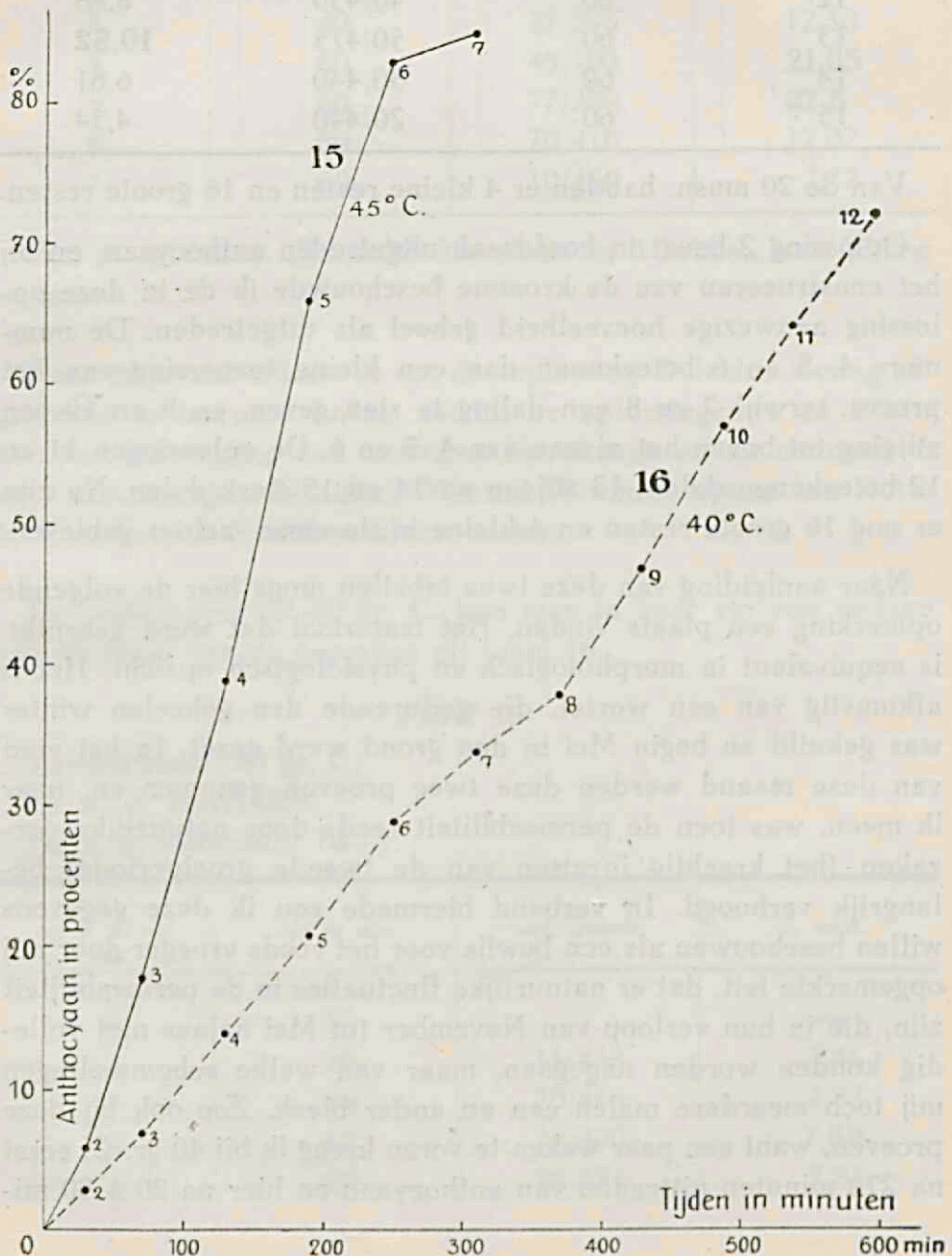
Oplossing 2 bevat in hoofdzaak uitgetreden anthocyaan, en bij het construeeren van de kromme beschouwde ik de in deze oplossing aanwezige hoeveelheid geheel als uitgetreden. De nummers 4, 5 en 6 beteekenen dan een kleine toeneming van het proces, terwijl 7 en 8 een daling te zien geven, en 9 en 10 een stijging tot boven het niveau van 4, 5 en 6. De oplossingen 11 en 12 beteekenen dalen, 13 stijgen en 14 en 15 sterk dalen. Nu zijn er nog 16 groote resten en 4 kleine in de nmsn. achter gebleven.

Naar aanleiding van deze twee tabellen moge hier de volgende opmerking een plaats vinden. Het materiaal dat werd gebruikt, is equivalent in morphologisch en physiologisch opzicht. Het is afkomstig van een wortel, die gedurende den geheelen winter was gekuild en begin Mei in den grond werd gezet. In het eind van deze maand werden deze twee proeven genomen en, naar ik meen, was toen de permeabiliteit reeds door natuurlijke oorzaken (het krachtig inzetten van de tweede groeiperiode) belangrijk verhoogd. In verband hiermede zou ik deze gegevens willen beschouwen als een bewijs voor het reeds vroeger door mij opgemerkte feit, dat er natuurlijke fluctuaties in de permeabiliteit zijn, die in hun verloop van November tot Mei helaas niet volledig konden worden nagegaan, maar van welke schommelingen mij toch meerdere malen een en ander bleek. Zoo ook bij deze proeven, want een paar weken te voren kreeg ik bij 40 gr. C. eerst na 270 minuten uittreden van anthocyaan en hier na 20 à 30 mi-

nuten. Bij 45 gr. C. zag ik toen het eerste uittreden na 210 minuten, terwijl dat nu ook reeds na 20 à 30 minuten gebeurde.

Hieronder volgen twee krommen, die naar gegevens van de tabellen 15 en 16 zijn geconstrueerd. Zooals we reeds opmerkten, was het materiaal, gebruikt voor de proeven, die hier in beeld zijn gebracht, gelijkwaardig, zoodat deze krommen ook als illustratie voor een z.g. *vergelijkende ontkleuring* kunnen dienen. Ze zijn als zoodanig zelfs zeer instructief.

Lijn 15 en 16.



Voor het verloop van het proces der ontkleuring bij 35 gr. C. gebruikte ik de gegevens van tabel 17.

Tabel 17.

Temperatuur: 35 gr. C.

no. v. d. proef: 342.

no. v. h. materiaal: 70—1.

no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarde	% anth.
1	15	—	—
2	30	—	—
3	60	—	—
4	60	—	—
5	60	—	—
6	120	—	—
7	300	—	—
8	720	14/17	83,35
9	60	60/230 × 8	21,48
10	180	116/300 × 9	8,30
11	180	—	—
12	345	20/420	4,76
13	660	50/384	13,02
14	240	140/440 × 13	4,14
15	180	—	—

15 nmsn. zijn kleurloos en 5 hebben kleine resten van anthocyaan.

Van de oplossingen 1—7 is alleen de eerste helder gekleurd en wel uitsluitend door *afgespoeld* anthocyaan, wat ook volgt uit de omstandigheid, dat er 6 kleurlooze monsters op volgen. In een tijdsverloop van 645 minuten, te rekenen vanaf het begin van de proef, is dus niets *uitgetreden*. De ontkleuring is dus daarna begonnen, maar wanneer dat proces precies aanving is moeilijk vast te stellen binnen de grenzen van den tijdduur van 8 (720 minuten). Ongeveer is het wel na te gaan, als men de snelheid van 9 tot uitgangspunt neemt, voor de kleinere aanvangssnelheid 100 minuten rekent en dan zoo komt tot het begin der ontkleuring bij 400 minuten na het begin van de 8e periode. Zoo wordt daar-

door de tijd, dat er geen kleurstof uittreedt, vanaf het begin van de proef, 1045 minuten. Ik heb deze overwegingen bij het construeeren van de bijbehorende kromme niet doen gelden.

Oplossing 9 zal echter wel een stijging beteekenen, omdat de aanvangssnelheid van het uittreden in het algemeen kleiner is.

Oplossing 10 ontstond onder een sterke daling van het uittredingsproces, evenals 12, terwijl 11 colorimetrisch niet te bepalen was.

Oplossing 13 is weer een stijging, die in 14 ongeveer stationair blijft. Het resultaat is, dat er 15 nmsn. kleurloos waren en 5 kleine resten vertoonden. Oplossing 15 is niet te bepalen.

Voor 30 gr. C. werd proef 343 gebruikt, met 70 als materiaalnummer en daarvan de meest gevoelige étage 4.

Tabel 18.

Temperatuur: 30 gr. C.

no. v. d. proef: 343.

no. v. h. materiaal: 70—4

no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarde	% anth.
1	15	—	—
2	30	9/460	1,95
3	60	9/384	2,34
4	60	198/455 $\times$ 3	1,01
5	60	—	—
6	120	—	—
7	300	—	—
8	720	12/425	2,82
9	60	178/340 $\times$ 8	1,47
10	180	400/470 $\times$ 9	1,25
11	180	20/380	5,26
12	345	50/410	12,19
13	660	134/139	96,40
14	240	20/120 $\times$ 13	16,06
15	180	—	—

Zonder standaardoplossing; het afgespoelde anthocyaan vormde de basis voor de colorimetrische bepalingen.

In verband met de hooge ontkleuringstijden bij deze temperatuur moeten de oplossingen 2, 3 en 4 gewantrouwd worden, wat betreft de herkomst van het daarin aanwezige anthocyaan.

Het kan afgespoeld zijn, of afkomstig van cellen, waarvan de protoplasten door het mes licht beschadigd waren, wat op hetzelfde neerkomt.

In oplossing 8 vinden we dus de eerste 2 pct. *uitgetreden* anthocyaan. In 10 is een daling merkbaar, stijgen in 11 met in 13 een zeer sterk toenemen van de uittreding en sterke daling in 14 tot volkomen ontkleuring, die uit 15 kan blijken.

Voor 25 gr. C. is het moeilijk bij mijn proeven een ontkleuring te vinden, die een duidelijk beeld geeft van het proces van uittreding. Ik koos daarom zeer gevoelig materiaal uit étage 4 van 64, wat tot een totale ontkleuring mocht leiden.

Tabel 19.

Temperatuur: 25 gr. C.

no. v. d. proef: 335.

no. v. h. materiaal: 64—4.

<i>no. v. d. opl.</i>	<i>tijd in min.</i>	<i>col. waarde</i>	<i>% anth.</i>
1	15	—	—
2	15	—	—
3	1140	100/275	36,36
4	180	25/183	13,66
5	1200	55/67	82,08

Oplossing 2 is kleurloos en 3 bevat 36 pct. als het resultaat van 1170 minuten. Ik zag, dat in 4 het uittreden dadelijk verder ging, en zoo vormt dit nummer dan ook een sterke stijging ten opzichte van 3. Voor 5 waren 1200 minuten noodig, en als deze tijd geheel voor het produceeren van de 82 pct. anthocyaan heeft moeten dienen, dan is de snelheid in 4 en 5 gelijk gebleven.

Van 20 gr. C. kon, om redenen, die ik reeds eerder ontwikkelde, moeilijk een volkomen ontkleuring verkregen worden.

Tabel 20.

Temperatuur: 20 gr. C.

no. v. d. proef: 338.

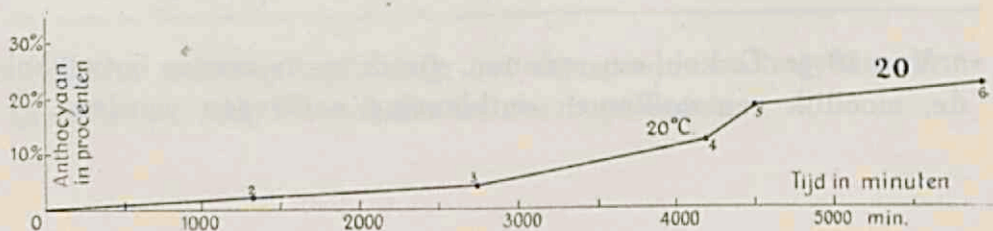
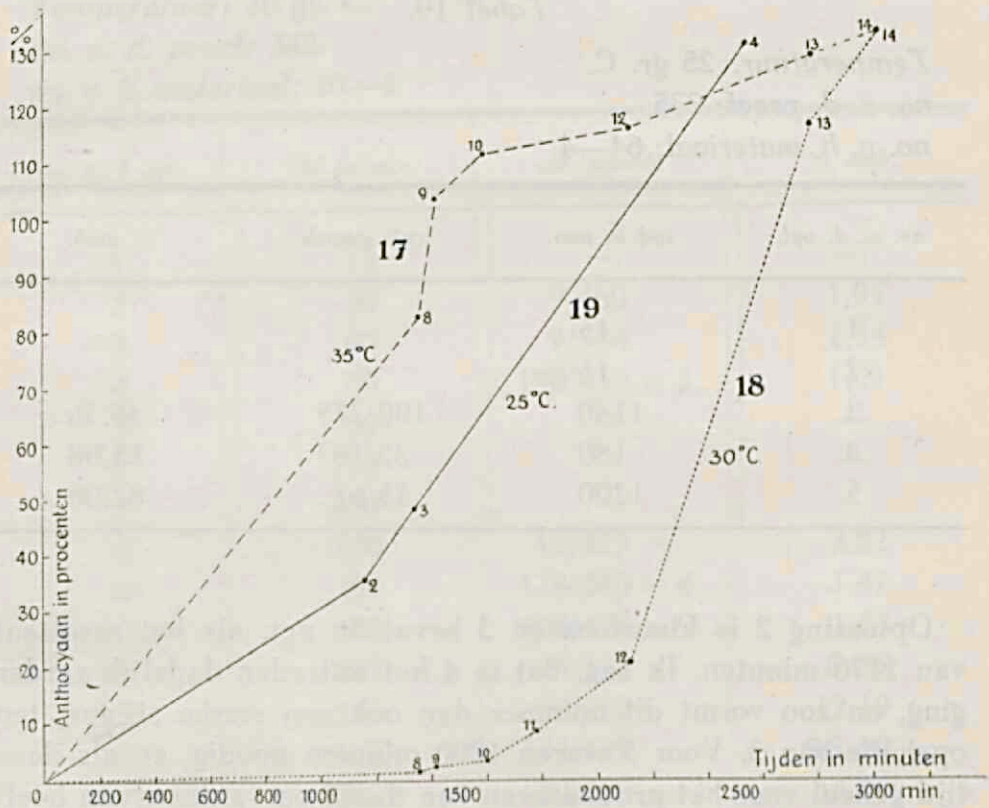
no. v. h. materiaal: 67—1.

no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarde	% anth.
1	30	—	—
2	1280	10/344	2,90
3	1440	10/422	2,36
4	1440	35/430	8,13
5	300	$304/364 \times 4$	6,79
6	1440	$244/378 \times 5$	4,38

De cijfers uit deze tabel zijn weinig zeggend, maar ze zijn bruikbaar voor het uitzetten van het begin van een kromme.

Bij de 4 voorgaande tabellen behooren de onderstaande krommen.

Lijn 17, 18, 19 en 20.



De opvallende uitspringende hoeken in lijn 17 bij de punten 9 en 10 maken deze kromme weinig instructief. De verklaring ligt in het grootte tijdsinterval van 720 minuten, want indien het verloop van de uittreding van deze 83 pct. was nagegaan, door ontbinding van deze 720 minuten in een aantal kleinere intervallen, dan zou de inzinking bij 8 wegvallen en het verloop van de geheele lijn meer normaal zijn geworden.

Lijn 18 heeft betrekking op hetzelfde materiaal, dat echter uit étage 4 genomen werd. Waar hier echter de temperatuur 5 graden lager was dan bij 17, daar mag het verloop van 18 ten opzichte van 17 normaal genoemd worden.

Lijn 19 is van étage 4 en ik had dan ook het verloop ten opzichte van 18 geheel anders verwacht en wel *achter lijn 18 om*. Een uitkomst voor de moeilijkheid kan zijn, dat het materiaal van een anderen wortel afkomstig is dan dat van 17 en 18, wat hier inderdaad het geval is. Hier zou dus een zeer sterk uiteenlopende gevoeligheid in het spel zijn, wat wel mogelijk is, gezien de omstandigheid, dat ik geen eenvormig bietenras kon krijgen, maar me tevreden moest stellen met een allegaartje, dat een groentenhandelaar me leverde.

Kromme no. 20 illustreert den invloed van de laagste door mij toegepaste temperatuur. Geen enkele van de geconstrueerde lijnen blijft zoo dicht bij de abscisse.

VERGELIJKENDE ONTKLEURINGEN.

De vergelijkende ontcleuringen moeten opheldering geven omtrent verschillende vragen, die, bij het zonder meer bepalen van ontcleuringstijden (Hoofdstuk 3) of bij het nagaan van het verloop der verschillende ontcleuringsprocessen (Hoofdstuk 4), bij mij opkwamen en in verband met hun beantwoording al het een of ander vermoeden gaven, maar waarbij ten slotte alleen een doelbewust experiment zekerheid kon geven.

Voor sommige van deze proeven was één toestel voldoende: bijvoorbeeld om de uiteenloopende gevoeligheid van de verschillende étage's van den wortel na te gaan.

Andere experimenten vereischten echter twee toestellen, die gelijktijdig in werking konden zijn. Dat is bijv. noodzakelijk voor het onderzoek van morphologisch en physiologisch zooveel mogelijk gelijkwaardig materiaal bij verschillende temperaturen.

Hier zullen dus verschillende typen van vergelijkende ontcleuringen worden nagegaan en aan de hand van tabellen besproken.

In de eerste plaats dan over het verschil in resistentie van weefsels, uit verschillende deelen van den wortel genomen.

Reeds uit de sterk uiteenloopende ontcleuringstijden kan blijken, dat de verhooging der permeabiliteit niet enkel afhangt van temperatuur en tijd, maar ook van het object. Vooral bij lagere temperaturen zijn die verschillen zeer duidelijk.

Enkele in het oog loopende verschillen vinden hier een plaats.

- a. De tijd voor totale ontcleuring is bij weefsel uit étage 1 veel grooter dan bij materiaal uit étage 4.
- b. Het uittreden van het anthocyaan begint bij de eerste étage veel later dan bij de vierde.
- c. Het verloop van de ontcleuring, gebleken uit de colorimetrische getallen, is in beide gevallen anders en vooral de oogenblikken van versneld uittreden van anthocyaan, vallen niet altijd samen.
- d. Het eindresultaat van temperatuursinvloeden van denzelfden tijdduur, op materiaal uit verschillende étage's

toegepast, na het afbreken van de proef aan het uiterlijk der nmsn. beoordeeld, toont duidelijk, dat bijv. de kleurstofresten van het dikke einde van den wortel veel grooter zijn dan die van de punt.

Er zijn mij echter omstandigheden bekend geworden, waarbij de onder a—d aangegeven verschijnselen niet kunnen worden waargenomen, maar eerder het omgekeerde het geval is. Als oorzaak beschouw ik de door natuurlijke oorzaken verhoogde permeabiliteit bij het begin van de tweede groeiperiode. Dan kan het uittreden gelijktijdig beginnen, étage 4 kan grooter tijd vorderen voor de ontcleuring dan 1 en dan zijn dus de anthocyaan-resten, bij het afbreken van de vergelijkende ontcleuring, in de nmsn. van étage 4 grooter dan bij 1. Aan het slot van dit hoofdstuk zullen een tabel met de daarbij behorende krommen dit nader toelichten.

We laten thans enkele voorbeelden volgen, waaruit het fluctueeren van de permeabiliteitsverhoging in de verschillende regionen van den wortel blijken kan.

Tabel 21.

Temperatuur: 45 gr. C.

no. v. d. proef: 355.

no. v. h. materiaal: 76; 1 en 4.

no. v. d. opl.	tijd in min.	Col. waarden		% anthocyaan	
		étage 1	étage 4	étage 1	étage 4
1	10	—	—	—	—
2	120	40/255	70/238	15,68	29,41
3	60	38/230	60/196	16,52	30,62
4	60	29/284	24/220	10,21	10,90
5	60	14/460	7/470	3,04	1,48
6	120	140/396 × 5	—	1,07	—

Van 1 zijn alle nmsn. kleurloos, van 4 idem.

Bij het nagaan van deze gegevens, ziet men, dat geen standaard-oplossing werd gebruikt, maar dat het in de eerste 10 minuten afgespoelde anthocyaan dienst deed bij het bepalen der

colorimetrische waarden. Nu is een nauwkeurige vergelijking alleen mogelijk, als men de colorimetrische verhouding kent van oplossing 1 der eerste étage tot dezelfde oplossing van de vierde. Ik heb verschillende afgespoelde monsters vergeleken en kwam in die gevallen tot een schommeling van 5 pct. m.a.w. als men de sterkste oplossing uitdrukt in de zwakkere, dan zou, bijv. in het geval van tabel 19, oplossing 1 van het vierde stuk 105 pct. zijn van dezelfde oplossing van het eerste stuk. Deze verschillen konden, zonder bezwaar voor de te trekken conclusies, verwaarloosd worden.

We merken bij tabel 19 verder op, dat de maximale snelheden van het uittreden op dezelfde hoogte liggen. Of het uittreden gelijktijdig begint is niet uit te maken, omdat het tweede tijd-interval daarvoor te groot genomen is (120 minuten). Waar het resultaat in beide gevallen gelijk is, nl. de totale ontkleuring van de 20 nmsn., blijkt de meerdere gevoeligheid van étage 4 uit het eerder afloopen der ontkleuring.

In de volgende tabel komt hetzelfde tot uiting bij een temperatuur van 25 gr. C.

Tabel 22.

Temperatuur: 25 gr. C.

no. v. d. proef: 341.

no. v. h. materiaal: 69; 1 en 4.

no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarden		% anthocyaan	
		étage 1	étage 4	étage 1	étage 4
1	30	—	—	—	—
2	1440	—	48/385	—	12,46
3	1440	—	60/312	—	19,23
4	1440	40/403	139/426	11,91	32,62
5	1440	97/417	113/402	23,26	28,10

De cijfers uit deze tabel toonen duidelijk aan, en meer sprekend dan de voorgaande, dat de resistentie van de uitersten van den wortel sterk uiteenloopt en dat dit bij een zooveel lagere temperatuur meer tot uiting komt dan bij de hogere temperatuur. Totale ontkleuring werd niet verkregen, zoodat het slot der uittredingsprocessen niet vergeleken kon worden. Het begin van

de uittreding is echter in dit geval een overtuigend bewijs voor de snellere reactie van het lagere weefsel op den invloed van deze temperatuur, want daar begint het uittreden 1880 minuten eerder.

Reeds bij de bespreking van de tabellen 7 en 8 wees ik er op, dat er enkele kleine aanwijzingen waren voor een mindere gevoeligheid van étage 3 ten opzichte van 2. Terwijl dus de resistentie van 1 naar 2 afneemt, is er van 2 naar 3 weer toename en van 3 naar 4 daling van resistentie waar te nemen.

We geven in dit verband twee tabellen, waarin de regionen van den wortel alle zijn vertegenwoordigd, teneinde de verschillende gevoeligheid van het weefsel uit die verschillende worteldeelen te illustreeren.

Tabel 23.

Temperatuur: 25 gr. C.

no. v. d. proef: 334.

no. v. h. materiaal: 65; 1 — 2 — 3 — 4.

no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarden				% anthocyaan			
		1	2	3	4	1	2	3	4
1	5	—	—	—	—	—	—	—	—
2	3960	20/34	70/67	9/40	1	58,82	104,47	22,5	100

Tabel 24.

Temperatuur: 25 gr. C.

no. v. d. proef: 336.

no. v. h. materiaal: 65; 1 — 2 — 3 — 4.

no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarden	% anthocyaan
1	5	—	—
		—	—
		—	—
		—	—
2	30	—	—
		—	—
		—	—

no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarden	% anthocyaan
3	60	—	—
		—	—
		—	—
		—	—
4	1020	10/230	4,34
		20/150	13,33
		18/174	10,34
		17/140	12,14
5	180	20/147 $\times$ 4	0,59
		70/90 $\times$ 4	10,37
		90/234 $\times$ 4	3,97
		70/110 $\times$ 4	7,72
6	180	30/190 $\times$ 4	0,68
		—	—
		—	—
		109/220 $\times$ 4	6,01
7	360	28/164	17,07
		14/150	9,33
		10/200	5,—
		20/140	14,28
8	720	38/110	34,54
		40/110	36,36
		19/126	15,07
		30/93	32,25
9	180	50/130 $\times$ 8	13,28
		60/142 $\times$ 8	15,36
		80/200 $\times$ 8	6,03
		30/110	27,27

De colorimetrische waarden zijn voor ieder nummer opgegeven in volgorde van de verschillende étage's van boven naar beneden.

De toestand der normaalsneden na de proef.

1. 8 met kleine resten, 5 groote en 7 zeer groote.
2. 10 kleine resten en 10 met groote resten.
3. 8 groote resten en 12 zeer groote resten.
4. 18 kleine resten en 2 groote resten.

Als men van tabel 23 de procenten uitgetreden anthocyaan nagaat, dan geven die een zeer duidelijk beeld van de gevoeligheid voor permeabiliteitsverhooging in de deelen van den wortel. Zoo is bij étage 1 58.82 pct. uitgetreden, tegen 104.47 pct. bij étage 2, wat m.i. een overtuigend bewijs is voor de meerdere gevoeligheid van 2 boven 1. Etage 3 heeft echter slechts 22.5 pct., wat dus wijst op zeer groote resistentie en het eind van den wortel heeft 100 pct., een bewijs voor de zeer groote gevoeligheid van dit gedeelte van den wortel voor temperatuur-invloeden.

Tabel 24 geeft dergelijke verschijnselen te zien voor een ander object bij dezelfde temperatuur. Uit oplossing 4 en 5 blijkt groote gevoeligheid van de étage's 2 en 4 en mindere gevoeligheid van 1 en 3. Bij alle oplossingen is de grootere resistentie (synoniem met mindere gevoeligheid) van étage 3 duidelijk uit de cijfers te lezen.

In de tweede plaats kunnen vergelijkende ontkleuringen het bewijs leveren van den invloed, die de grootere aciditeit van het celvocht heeft. Het kan blijken uit de gegevens, die ik van een bepaald object verkreeg, dat zich daar zoo bijzonder goed toe leende, omdat de eerste étage geelrood anthocyaan bevatte en de 4e paarsrood. Zooals reeds werd opgemerkt is dit kleurverschil een gevolg van het verschil in *pH* bij den inhoud der vacuolen.

Tabel 25 bevat de daarop betrekking hebbende gegevens.

Tabel 25.

Temperatuur: 30 gr. C.

no. v. d. proef: 343.

no. v. h. materiaal: 70; 1 en 4.

no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarden		% anthocyaan	
		étage 1	étage 4	étage 1	étage 4
1	15	—	—	—	—
2	30	—	9/460	—	1,95
3	60	—	9/384	—	2,34
4	60	—	198/455 × 3	—	1,01
5	60	—	—	—	—
6	120	—	—	—	—

no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarden		% anthocyaan	
		étage 1	étage 4	étage 1	étage 4
7	300	—	—	—	—
8	720	—	12/425	—	2,82
9	60	—	178/340 × 8	—	1,47
10	180	—	400/470 × 9	—	1,25
11	180	18/424	20/380	4,24	5,26
12	345	30/410	50/410	7,31	12,19
13	660	100/415	134/139	24,09	96,40
14	240	250/455	20/120 × 13	13,23	16,06
15	180	30/375	—	8	—

Bij het afsluiten van de proef is de toestand der nmsn.

étage 1 van de 20 nmsn. zijn er 10 met kleine resten, 5 met groote en 5 met zeer groote.

étage 4 alle nmsn. zijn kleurloos.

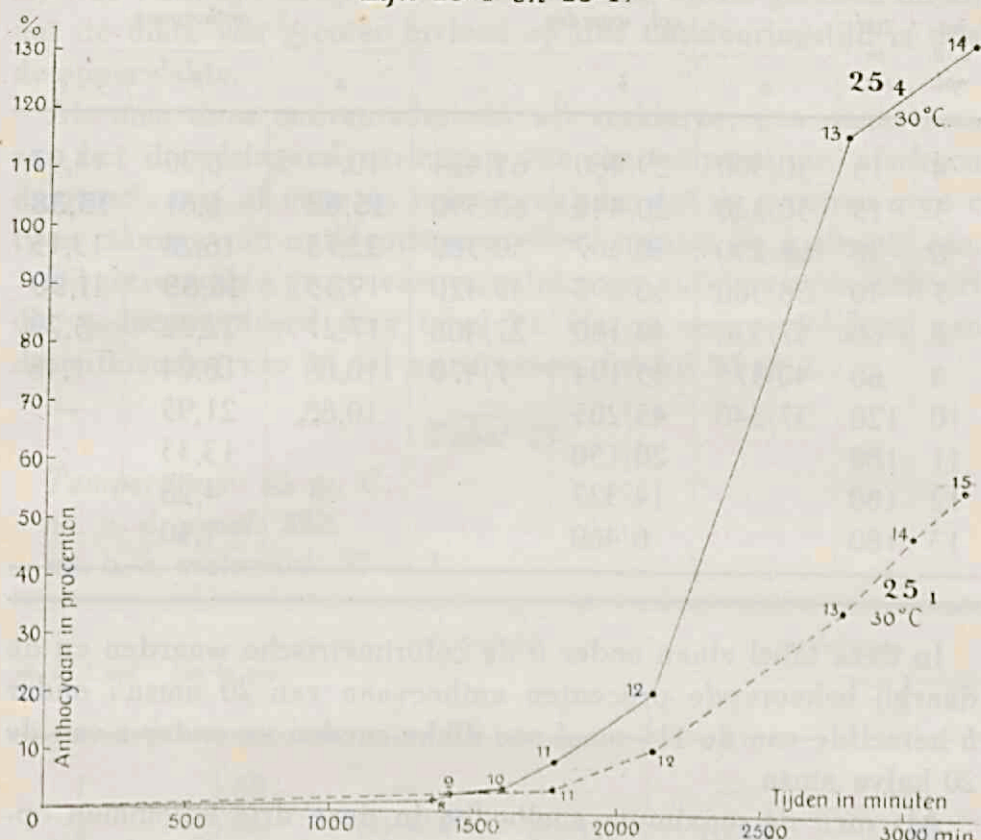
Laat men de colorimetrische waarden voor étage 4 van de oplossingen 2, 3 en 4 buiten beschouwing (ze zouden betrekking kunnen hebben op losgeweekt anthocyaan), dan begint het uit-treden bij het weefsel met een hooge H ionen concentratie 420 minuten eerder dan bij dat van geringer aciditeit.

In oplossing 13 is het laatste maximum van het uittredingspro-ces reeds bereikt voor étage 4, maar bij étage 1 is in oplossing 14 eerst een maximum waar te nemen (als men let op de tijd-intervallen), zoodat bij deze laatstgenoemde étage, gezien den toestand der nmsn. bij het sluiten van de proef, misschien nog een tweede maximum kan verwacht worden.

De totale ontkleuring is bij 4 reeds een feit, vóór het afloopen van de proef, terwijl die bij 1 nog wel langen tijd op zich zal laten wachten, want van die nmsn. is nog geen enkele kleurloos en zijn er nog overal anthocyaanresten: 10 kleine, 5 groote resten en 5 zeer groote.

We geven hieronder de lijnen 25-4 en 25-1, die zonder verder commentaar voldoende duidelijk maken, wat bij de bespreking van tabel 25 werd opgemerkt.

Lijn 25-4 en 25-1.



Een tweetal vergelijkende ontkleuringen zijn van belang om den invloed van oppervlakte en dikte der normaalsneden op de ontkleuringstijden na te gaan.

Er werden 20 nmsn. van de standaard-dikte genomen (a), 20 die $1\frac{1}{2}$ maal zoo dik waren (b) en 20 nmsn. van standaard-dikte maar van de halve oppervlakte (c).

Tabel 26 bevat de hierop betrekking hebbende gegevens.

Tabel 26.

Temperatuur: 60 gr. C.

no. v. d. proef: 351.

no. v. h. materiaal: 74 — 1.

no. v. d. opl.	tijd in sec.	col. waarden			% anthocyaan		
		a	b	c	a	b	c
1	5	—	—	—	—	—	—
2	15	27/315	40/425	63/407	8,57	9,41	15,47
3	15	39/340	28/440	90/470	11,47	6,36	19,14

no. v. d. opl.	tijd in sec.	col. waarden			% anthocyaan		
		a	b	c	a	b	c
4	15	30/300	29/460	65/434	10,—	6,30	14,97
5	15	50/320	30/440	60/390	15,62	6,81	15,38
6	30	66/290	50/307	50/380	22,75	16,28	13,15
7	30	58/300	50/296	49/420	19,33	16,89	11,90
8	60	57/330	40/180	27/466	17,27	22,22	5,79
9	60	40/375	35/194	7/470	10,66	18,04	1,48
10	120	37/340	45/205	—	10,88	21,95	—
11	180		20/150			13,33	
12	180		14/327			4,28	
13	180		6/460			1,30	

In deze tabel staan onder *a* de colorimetrische waarden en de daarbij behorende procenten anthocyaan van 20 nmsn.; onder *b* hetzelfde van de $1\frac{1}{2}$ maal zoo dikke sneden en onder *c* van de 20 halve nmsn.

Als men de maximum snelheden in deze drie kolommen opzoekt, dan blijkt *a* twee maxima te hebben en wel in de oplossingen 3 en 5; *b* heeft een enkel maximum en het valt op, dat dit in een hoogere oplossing voorkomt (7). Oplossing 2 van *b* zal nog wat afgespoeld anthocyaan bevatten en is dus geen maximum.

In de waarden-reeksen voor *c* komen ook twee maxima voor, op dezelfde plaats* als bij *a*, in de oplossingen 3 en 5. Bij alle groepen volgt op het laatste uittredingsmaximum een tot het eind voortgaande daling van de snelheid der ontkleuring. Bij *a* is de toestand der nmsn. bij het sluiten van de proef zoo, dat er 16 kleurloos zijn en er 4 kleine resten hebben. De nmsn. van *b* en *c* zijn alle kleurloos.

De tijden van ontkleuring van de groepen *a*, *b* en *c* *verhouden zich als* 73 : 181 : 49, terwijl die getallen bij een recht evenredige afhankelijkheid van resp. oppervlakte en dikte der nmsn. zouden moeten zijn: 73 : $110\frac{1}{2}$: $37\frac{1}{2}$.

Bij deze overwegingen zijn de 4 kleine resten in groep *a* buiten beschouwing* gebleven. Rekent men daar 60 seconden voor, wat stellig niet te laag is, dan wordt de verhouding: 85 : 181 : 49, terwijl die bij recht evenredige afhankelijkheid zouden moeten

zijn: $85 : 127\frac{1}{2} : 42\frac{1}{2}$, zoodat ook dan nog uit de getallen blijkt, dat de dikte van grooter invloed op den ontkleuringstijd is dan de oppervlakte.

Als men deze onevenredigheid wil verklaren, dan denkt men aan het doordringend vermogen van de temperatuur, ofschoon daarmee min of meer in tegenspraak is, dat de groepen *a* en *c* twee maxima van ontkleurings-snelheid hebben en *b* slechts één.

Bij deze zelfde groep van vergelijkende ontkleuringen behoort die, gedocumenteerd door tabel 27. Het is een vergelijking van de ontkleuring van 20 (*b*) en 10 nmsn. (*a*) bij 55 gr. C.

Tabel 27.

Temperatuur: 55 gr. C.

no. v. d. proef: 352.

no. v. h. materiaal: 75 — 1.

no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarden		% anthocyaan	
		<i>a</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>b</i>
1	5/60	—	—	—	—
2	25/60	60/364	80/453	16,45	17,66
3	$\frac{1}{2}$	63/410	100/310	15,36	32,25
4	1	116/380	176/264	30,52	66,66
5	2	137/310	150/220	44,19	68,18
6	2	125/390	110/404	32,05	27,22
7	2	87/340	40/460	25,58	8,69
8	2	70/400	9/475	17,5	1,89

Van *a* zijn er 12 kleurloos en 8 hebben groote anthocyaan-resten.
Van *b* zijn alle 10 kleurloos.

Uit deze cijfers blijkt, dat de snelheids-maxima in dezelfde oplossing te voorschijn komen, zoowel voor groep *a* (20 nmsn.) als voor groep *b* (10 nmsn.) in oplossing 4. (De tijden moeten in aanmerking genomen worden bij het aanwijzen van de maxima).

Na oplossing 4 geven de overige nummers (5, 6, 7 en 8) een voortdurende daling te zien. De daling in *a* en *b* is echter verschillend, want in *a* is die vrij geleidelijk en schommelt om de 30 pct. van de onmiddellijk voorafgaande oplossing, terwijl in *b* die daling van 50-75 pct. bedraagt. Uit den toestand der nmsn.,

bij *a* volgt, dat de totale ontkleuring nog enkele minuten zal uitblijven, terwijl groep *b* al geheel ontkleurd is.

Ook uit deze gegevens blijkt, dat de ontkleuringstijden niet recht evenredig zijn met de oppervlakte der nmsn.

We laten thans enkele tabellen volgen, die betrekking hebben op vergelijkende ontkleuringen bij verschillende temperaturen, die 5 gr. C. of meer verschillen. Ze zijn, als de voorgaande, gemaakt met twee toestellen, gelijktijdig, en van gelijkwaardig materiaal.

Tabel 28.

Temperaturen: 60 gr. C. en 55 gr. C.

no. v. d. proeven: 349 en 349'.

no. v. h. materiaal: 73 — 1.

no. v. d. cpl.	tijd in sec.	col. waarden		% anthocyaan	
		349	349'	349	349'
1	5	—	—	—	—
2	10	60/317	30/404	18,92	7,42
3	10	68/320	20/380	21,25	5,26
4	10	87/365	35/380	23,83	9,21
5	10	68/240	50/400	28,33	12,5
6	10	63/320	40/380	19,68	10,52
7	10	70/386	50/300	18,13	16,66
8	10	50/395	40/440	12,65	9,09
9	10	28/300	40/330	9,33	12,12
10	20	40/357	47/350	11,20	13,42
11	40	38/355	80/350	10,70	22,85
12	60	25/320	65/320	7,81	20,31
13	120	17/440	38/440	3,86	8,63

Van 349 zijn alle nmsn. kleurloos en van 349' zijn er 6 kleurloos en 14 hebben kleine resten.

Deze twee ontkleuringen doen zien, dat bij 60 gr. C. in oplossing 5 het eenige maximum gelegen is, terwijl bij 55 gr. C. drie maxima zijn aan te wijzen, die echter van verschillenden aard zijn. Ze komen voor in de oplossingen 5, 7 en 9; en dat

van 7 steekt boven de andere uit en vertegenwoordigt als het ware het maximum bij 60 gr. C., zoodat hieruit blijken kan, dat bij een lagere temperatuur het maximum *verplaatst wordt in de richting van het einde van het proces.*

De eindtoestand der nmsn. wijst, even duidelijk als bij alle ontkleuringen, op de omstandigheid, dat de temperatuurshoogte van invloed is op de mate, waarin de permeabiliteit wordt verhoogd, want, waar bij 60 gr. C. alles kleurloos is, daar hebben de nmsn. van 55 gr. C. nog 14 zeer kleine resten.

In tabel 29 zijn de gegevens verzameld van een vergelijkende ontkleuring bij veel lagere temperatuur nl. 35 gr. C. en 30 gr. C.

Tabel 29.

Temperaturen: 35 gr. C. en 30 gr. C.

no. v. d. proeven: 342 en 343.

no. v. h. materiaal: 70 — 1.

no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarden		% anthocyaan	
		342	343	342	343
1	15	—	—	—	—
2	30	—	—	—	—
3	60	—	—	—	—
4	60	—	—	—	—
5	60	—	—	—	—
6	120	—	—	—	—
7	300	—	—	—	—
8	720	14/17	—	82,35	—
9	60	60/230 × 8	—	21,48	—
10	180	116/300 × 9	—	8,30	—
11	180	—	18/424	—	4,24
12	345	20/420	30/410	4,76	7,31
13	660	50/384	100/415	13,02	24,09
14	240	140/440 × 13	250/455 × 13	4,14	13,23
15	180	—	30/375	—	8,—

Van 342 zijn 15 nmsn. kleurloos en 5 hebben kleine resten.

Van 343 zijn er 10 met kleine resten, 5 met groote resten en 5 met zeer groote resten.

Deze getallen geven aanleiding tot de volgende beschouwing. Voor proef 342, bij 35 gr. C. genomen, ligt de maximum-snelheid van het uittreden der kleurstof in oplossing 9. Ook als in oplossing 8 het uittreden begonnen zou zijn bij den aanvang van het tijdsinterval van 720 minuten, ook dan zou oplossing 9 nog een belangrijk versneld uittreden beteekenen, maar aangezien dit zeer onwaarschijnlijk is, wordt het maximum van 9 daardoor relatief zooveel hoger, zoowel ten opzichte van 8 als van 10.

Dat voor 11 geen colorimetrisch cijfer is opgegeven, beteekent niet, dat deze oplossing geen anthocyaan zou bevatten, zoodat dit nummer een schakel is in de sterk doorgaande daling van het proces, die zich tot het einde toe voortzet.

Voor proef 343 bij 30 gr. C., begint het uittreden ongeveer 960 minuten later en komt er een maximum voor den dag, 5 oplossingen verder dan bij 342, in oplossing 14. Het is een stijging van meer dan 50 pct. ten opzichte van oplossing 13, de tijden in aanmerking genomen. Aangezien deze groep van nmsn. nog veel kleurstof bevat bij het sluiten van de proef, is een tweede maximum te verwachten, wat bij de andere groep van nmsn. uitgesloten is.

Bij een vergelijking van ontkleuringen bij 30 gr. C. en 25 gr. C. moet ik helaas een minder gelukkig voorbeeld aanhalen, waarvan tabel 30 de cijfers geeft.

Tabel 30.

Temperaturen: 30 gr. C. en 25 gr. C.

no. v. d. proeven: 332 en 333.

no. v. h. materiaal: 62 — 1.

no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarden		% anthocyaan	
		332	333	332	333
1	15	—	—	—	—
2	15	25/113	10/100	22,12	10,—
3	180	12/60	8/42	20,—	5,63
4	180	55/150	—	7,33	—
5	180	65/240	—	5,41	—
6	180	—	—	—	—
7	600	35/65	—	53,84	—
8	240	30/120	—	25,—	—

Het onmiddellijk aanvangen der ontkleuringen is hier slechts schijn. De cijfers van de oplossingen 2, 3, 4 en 5 van no. 332 en van de oplossingen 2 en 3 van 333 moeten gedeeltelijk beschouwd worden als betrekking hebbend op afgespoeld anthocyaan, gedeeltelijk toegeschreven worden aan de kleurstof van door het mes beschadigde cellen. Van oplossing 7 en 8 bij 332 kan met zekerheid gezegd worden, dat het uitgetreden anthocyaan is, terwijl dan verder blijkt, dat bij 333 nog geen kleurstof is uitgetreden 840 minuten nadat het uittreden bij 332 begonnen is.

Als slot van dit hoofdstuk geven we tabel 31, met gegevens, die duidelijk doen zien, dat étage 4 in bepaalde gevallen een grootere resistentie kan vertoonen dan 1, zoodat het materiaal van 4 een langeren ontkleuringstijd vordert.

Tabel 31.

Temperatuur: 40 gr. C.

no. v. d. proef: 359.

no. v. h. materiaal: 78 — 1.

Temperatuur: 40 gr. C.

no. v. d. proef: 359 a.

no. v. h. materiaal: 78 — 4.

no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarden	% anth.	no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarden	% anth.
1	10	—	—	1	10	—	—
2	20	15/433	3,46	2	20	16/450	3,55
3	40	20/465	4,32	3	40	20/478	4,18
4	60	30/390	7,69	4	60	28/360	7,77
5	60	30/384	7,81	5	60	20/385	5,19
6	60	26/320	8,12	6	60	30/300	10,—
7	60	25/437	5,72	7	60	19/430	4,41
8	60	20/460	4,34	8	60	20/450	4,44
9	60	44/433	9,93	9	60	30/460	6,52
10	60	50/470	10,6	10	60	28/480	5,83
11	50	35/470	7,44	11	50	27/475	5,68
12	60	40/450	8,88	12	60	20/478	4,18
13	60	50/475	10,52	13	60	29/430	6,74
14	60	30/440	6,81	14	60	27/500	5,40
15	60	20/440	4,54	15	60	20/470	4,25

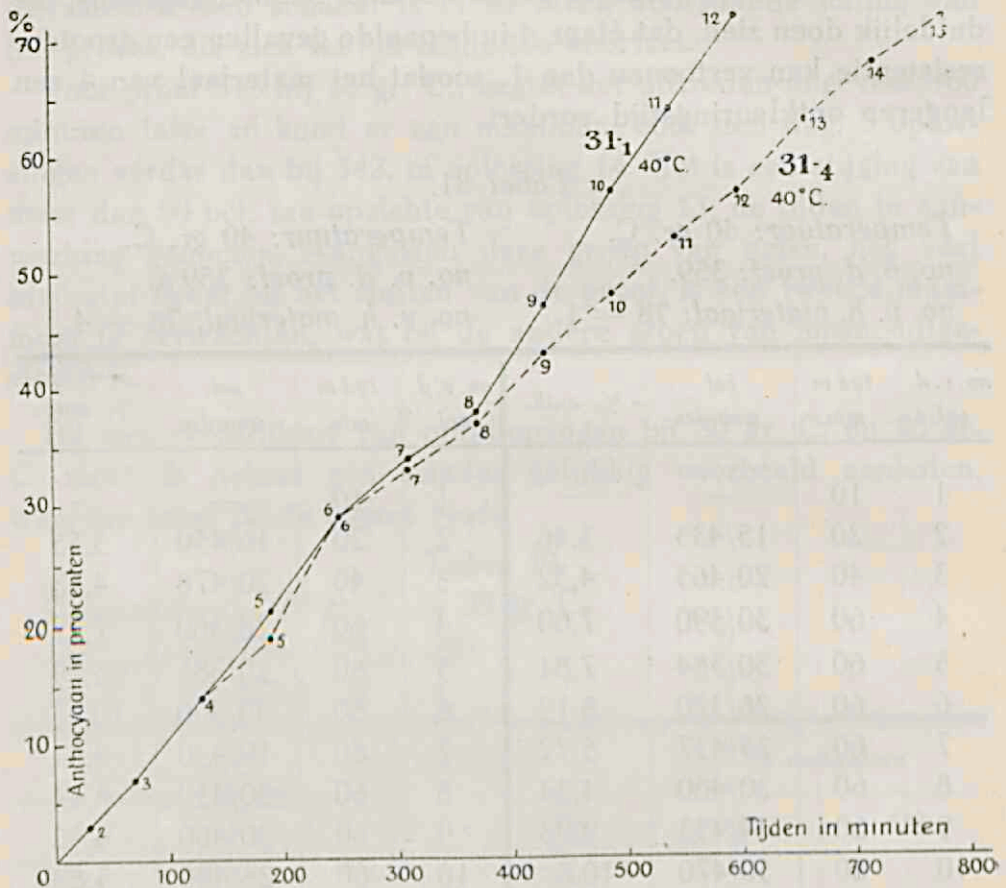
Van de 20 nmsn. hadden er 4 kleine resten en 16 groote resten.

Alle 20 nmsn. hebben groote resten.

Hier valt op: het gelijktijdig beginnen van het uittredingsproces en de anthocyaan resten, die bij 4 belangrijker zijn dan bij 1, want het materiaal van 1 heeft 4 kleine resten en 16 groote resten en dat van 4 heeft nog 20 groote resten.

De bijbehorende krommen (lijn 31-1 en 31-4) illustreeren het voorafgaande.

Lijn 31-1 en 31-4.



De strepenlijn is van étage 4 en nadert dus meer de abscisse dan de getrokken lijn, die étage 1 voorstelt. Het naderen van de tijdlijn is in het algemeen een bewijs voor de grootere resistentie der cellen.

Het samengaan in de drie eerste trajecten is duidelijk en wijst op gelijktijdig uittreden, terwijl toch het materiaal van 4 daarin

vooruit is, in bijna alle door mij onderzochte objecten. Men vergelijke deze twee krommen met die, welke bij tabel 25 behooren (pag. 77) en kan daar zien, dat de strepenlijn, die betrekking heeft op étage 1, de tijdlijn nadert en de getrokken lijn (van étage 4) daarvan ver afbuigt. Hier is étage 4 door haar grootere aciditeit wel meer gevoelig, maar de bijna algemeene regel van de grootere gevoeligheid van de punt van den wortel kan bovendien overtuigend blijken uit de tabellen, die in het hoofdstuk over *Ontkleuringstijden* werden opgenomen.

AFGEBROKEN ONTKLEURINGEN.

Het doel van dit hoofdstuk is, enkele aanwijzingen te geven omtrent het al of niet reversibele van de ontkleuringsprocessen. De vraag, die hier beantwoording kan vinden is deze; kan, door het ingrijpen met een *lagere temperatuur* in een bij een *hoogere temperatuur begonnen* ontkleuringsproces, wijziging worden gebracht; kunnen maxima verplaatst worden m.a.w. kan door een dergelijke bewerking het proces in zijn snelheid gewijzigd worden.

Als inderdaad de toestand van den protoplast de permeabiliteit voor anthocyaan beheerscht, zal vermindering van de snelheid van het uittreden een bewijs zijn voor het binnen zekere grenzen reversibel zijn van de veranderingen, die door de *hoogere temperatuur* in het protoplasma worden teweeg gebracht.

Mijn aandacht viel in de eerste plaats op proeven met gedeeltelijk ontkleurde nmsn. die dan onmiddellijk aan een veel lagere temperatuur werden blootgesteld, om na te gaan, of er na dien nog kleurstof uittreedt. In proef 319 van materiaal 55-2 paste ik een temperatuur van 35 gr. C. toe. Na 1080 minuten was 27.16 pct. anthocyaan, berekend naar een standaardoplossing, van gelijkwaardig materiaal vervaardigd, *uitgetreden*. Dit in gang zijnde ontkleuringsproces werd nu afgebroken door de nmsn. snel over te brengen in water van 14 gr. C. Na 22 uur, 48 uur, 72 uur, en 144 uur, werd dit water onderzocht in kolommen van 16 cM. hoogte (dat is ruim 3 maal de hoogte der colorimeter-cuvetten).

In geen van deze gevallen was ook maar een spoor van roodkleuring waar te nemen, niettegenstaande de nmsn. nog zeer veel anthocyaan bevatten. Bij 30 gr. C. werd hetzelfde waargenomen na verblijf van 336 uren in water van 14 gr. C. Bij dergelijke langdurige proeven nam ik enkele eenvoudige voorzorgen om infectie van het materiaal door schimmels en bacteriën te voorkomen.

In de tweede plaats viel mijn aandacht op een bepaalde proef van Sachs, die ik in het historisch overzicht al vermeldde. Hij

legt een aantal nmsn. in water van 51 gr. C., waarin ze *enkele minuten* blijven. Daarna brengt hij ze snel over in water van 22 gr. C. en hij ziet het uittreden van anthocyaan onafgebroken doorgaan. Sachs meent, dat deze uitkomst bewijst, dat in 51 gr. niet alleen het diffusie proces is versneld, maar *dat de cellen inderdaad veranderd zijn*. Ik trachtte door enkele experimenten dit resultaat van S. te toetsen. De uitkomsten zijn samengebracht in onderstaande tabellen.

Tabel 32.

Temperaturen: 52 gr. C. en 22 gr. C.

no. v. d. proef: 346 : a, b, c, d, e, f, g, h.

no. v. h. Materiaal: 72 — 1; telkens met 5 nmsn.

	tijd in min. 52 gr. C.	idem 22 gr. C.	col. waarden	% anthocyaan
a	1	5	40/450	8,88
		10	—	—
		15	—	—
		30	—	—
b	2	5	46/439	10,47
		10	—	—
		15	—	—
		30	—	—
c	3	5	68/440	15,45
		10	40/425	9,41
		15	—	—
		30	—	—
d	4	5	46/440	10,45
		10	—	—
		15	—	—
		30	—	—
e	5	5	16/480	3,33
		10	—	—
		15	—	—
		30	—	—
f	6	5	40/460	8,69
		10	—	—
		15	—	—
		30	—	—

	tijd in min. 52 gr. C.	idem 22 gr. C.	col. waarden	% anthocyaan
g	7	5	50/430	11,62
		10	—	—
		15	—	—
		30	—	—
h	8	5	10/440	2,27
		10	—	—
		15	—	—
		30	—	—

Toestand der nmsn. na de proeven:

- a. alle met zeer groote resten.
- b. 1 kleine rest, 4 groote resten.
- c. 4 groote resten; 1 zeer groote rest.
- d. 5 zeer groote resten.
- e. 3 kleurloos, 2 met kleine resten.
- f. 2 kleine, 1 groote rest, 2 zeer groote resten.
- g. 5 groote resten.
- h. 5 zeer kleine resten.

Tabel 33.

Temperaturen: 52 gr. C. en 22 gr. C.

no. v. d. proef: 347 : a, b, c, d, e.

no. v. h. materiaal: 72 — 4; telkens met 5 nmsn.

	tijd in min. 52 gr. C.	idem 22 gr. C.	col. waarden	% anthocyaan
a	3	5	30/430	6,97
		10	10/470	2,12
		15	—	—
		30	—	—
b	6	5	46/400	11,5
		10	20/455	4,39
		15	—	—
		30	—	—
c	9	5	30/465	6,45
		10	—	—
		15	—	—
		30	—	—

	<i>tijd in min.</i> 52 gr. C.	<i>idem 22 gr. C.</i>	<i>col. waarden</i>	<i>% anthocyaan</i>
d	12	5	20/475	4,21
		10	—	—
		15	—	—
		30	—	—
e	15	5	20/450	4,44
		10	13/420	3,09
		15	—	—
		30	—	—

Toestand der nmsn. na de proeven:

- a. 1 met groote rest en 4 met zeer groote resten.
- b. 2 met groote resten en 3 met zeer groote resten.
- c. 1 groote rest en 4 met zeer groote resten.
- d. 5 met kleine resten.
- e. 5 met kleine resten.

Deze proeven werden aldus ingericht, omdat Sachs spreekt van *enkele minuten* en dus werden, zooals tabel 32 aangeeft, de 5 nmsn. resp. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 of 8 minuten in 52 gr. C. gelaten om daarna 5, 10, 15 of 30 minuten in water van 22 gr. C. te blijven. Het overbrengen ging zeer vlug. Met opzet nam ik de eerste temperatuur een graad hooger dan S. deed, om de uitkomsten des te meer te doen spreken. We zien inderdaad in alle gevallen het uittreden van anthocyaan *eenigen tijd* doorgaan, maar nergens leidt het tot geheele ontkleuring, want bij alle groepen van nmsn. zijn nog grootere of kleinere resten van anthocyaan.

De verklaring van Sachs zou doen denken aan een doorgaan van het uittredingsproces tot volkomen ontkleuring toe, maar het resultaat van deze proeven wijst in een geheel andere richting.

Men moet hierbij bedenken, dat door de inrichting der toestellen de nieuwe temperatuur *zeer snel* wordt overgenomen. Een bewijs hiervoor is te putten uit de omstandigheid, dat 20 ccM. water slechts 4 minuten noodig hebben om in het toestel van 14 gr. C. op 50 gr. C. te komen, wat door mij verschillende malen is

nagegaan. De 5 nmsn. hebben samen een inhoud van ongeveer 0.25 ccM., dus zullen in belangrijk korter tijd dan 4 minuten de lagere temperatuur hebben aangenomen.

In enkele gevallen, tabel 32c, gaat ook gedurende het tweede tijd-interval, dat de nmsn. in 22 gr. C. verblijven, het uittreden door. Hetzelfde komt op tabel 33 drie malen voor. Het daar gebruikte materiaal is veel gevoeliger, want het is uit de vierde étage, wat het meermalen voorkomen van dit verschijnsel eenigszins verklaart.

Bij 30 gr. C. en bij 35 gr. C. nam ik geen spoor van voortgezette uittreding waar, toen het materiaal snel in water van 14 gr. C. werd gebracht. De temperatuur-verschillen waren hier veel kleiner: resp: 16 gr. C. en 21 gr. C. en die bedroegen bij de proeven van Sachs 30 gr. C. Deze overwegingen brengen mij er toe om hier te denken aan een bijzonder verschijnsel, waarvoor als hoofdomstandigheden dan zouden worden vereischt:

a. het verblijf van het weefsel in een supra-maximale temperatuur,

b. het zeer snel overgaan der objecten in een infra-maximale temperatuur die belangrijk lager is (hier 30 gr. C.).

Dit verschijnsel brengt plotseling stilstand in het reageeren van den protoplast op de temperatuur, zoodat bij de veel lagere temperatuur het uitstroomen evengoed voortgaat als bij de hogere, totdat de protoplast *zich herstelt* en het uittreden ophoudt.

Men zou het nog eenigszins anders kunnen uitdrukken: *het bedoelde verschijnsel* *) *fixeert plotseling den toestand van den protoplast, die op dat oogenblik een verhoogde permeabiliteit heeft* en het herstel gaat geleidelijk, wat eenigszins geïllustreerd wordt door de omstandigheid, dat in de 10 minuten, die op de eerste periode van 5 minuten volgt nooit meer of evenveel, maar altijd *veel minder* anthocyaan uittreedt en deze tweede periode dus altijd een daling van 25 pct.—60 pct. beteekent, afgezien van den tijd, die hier niet in aanmerking kan genomen worden, omdat niet is na te gaan, wanneer het uittreden ophoudt.

Voor *werkelijke reversibiliteit*, weliswaar binnen zeer nauwe grenzen, pleiten de volgende gegevens, verzameld in de tabellen

*) De beoefenaars van de levensleer van het dier, zouden in dit geval van „Shock” spreken.

34 en 35. De proefnemingen hebben betrekking op twee, zooveel mogelijk evenwijdig loopende ontkleuringsprocessen, nl. een *doorlopende* ontkleuring op 55 gr. C. en daarnaast een *afgebroken* ontkleuring van 55 gr. C. op 50 gr. C. Deze beide proeven zijn genomen met 10 nmsn. van gelijkwaardig materiaal.

Tabel 34.

Temperatuur: 55 gr. C.

no. v. d. proef: 352 b.

no. v. h. materiaal: 75 — 1.

Temperatuur: 55 gr. C. en 50 gr. C.

no. v. d. proef: 353.

no. v. h. materiaal: 75 — 1.

no. v. d. opl.	tijd in sec.	col. waarden	% anth.	no. v. d. opl.	tijd in sec.	col. waarden	% anth.
1	5	—	—	1	5	—	—
2	25	80/453	17,66	2	25	80/320	25,
3	30	100/310	32,25	3	30	130/430	30,23
4	60	176/264	66,66	4	60	200/360	55,55
5	120	150/220	68,18				
6	120	110/404	27,22				
7	120	40/460	8,69				
8	120	9/475	1,89				

352b 55° C.	353 55° C. en 50° C.
van 2 op 3; belangrijke stijging.	vrijwel gelijk blijven.
„ 3 „ 4; kleine stijging	kleine daling.
	<i>afgebroken</i>
	50° C.
„ 4 „ 5 sterke daling (kleine 50 %) .	idem (meer dan 50 %).
„ 5 „ 6 sterke daling (grootte 50 %) .	idem (meer dan 50 %).
„ 6 „ 7 sterke daling (meer dan 65 %)	kleinere daling (ruim 30 %).
„ 7 „ 8 grootte daling (ruim 75 %) .	kleinere daling (ongeveer 71 %).
„ 8 „ 9 <i>alles reeds kleurloos</i>	50 % daling.
„ 9 „ 10 „ „ „	ongeveer gelijk blijven.
„ 10 „ 11 „ „ „	daling van 19 %.
„ 11 „ 13 „ „ „	daling van 40 %.

Beschouwen we deze gegevens nader, dan valt het op, dat we bij de *doorlopende* ontkleuring na oplossing 4 een daling zien optreden, die niet meer te stuiten is en zelfs cumuleerend mag genoemd worden, zoodat de ontkleuring na 10 minuten een feit is.

Bij de na 4 plotseling *afgebroken* ontkleuring (353), onmiddellijk voortgezet op 5 gr. C. lager, zien we in oplossing 7 het dalingsproces veel langzamer voortgaan. Ook in de volgende periode gaat de daling langzamer dan bij 352b. De verdere daling is niet cumuleerend, maar *schommelend* en de totale ontkleuring treedt eerst 13 minuten later in.

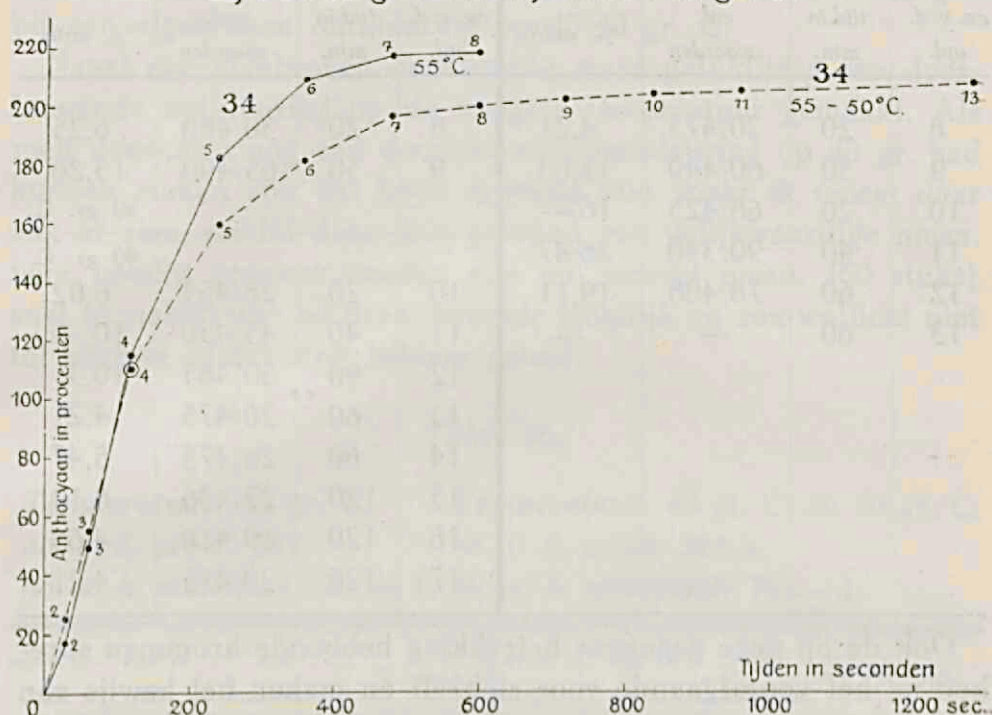
Oplossing 12 is niet te bepalen, maar is waarschijnlijk anthocyaanhoudend. Het is in ieder geval een sterke daling.

De conclusie ligt m.i. betrekkelijk voor de hand, dat de loop der ontkleuring, door het plotseling afbreken en onmiddellijk voortzetten op een 5 gr. C. lagere temperatuur, sterk vertraagd is. Het blijkt zoowel uit de totale ontkleuringstijden als uit de vergelijking der anthocyaan-oplossingen, welke doen zien, dat de gelijkmatige daling van het uittredingsproces in een ongelijkmatige is veranderd.

Ik vind dan ook vrijmoedigheid om hier te spreken van *reversibiliteit*. Een reeds bereikte permeabiliteits-toestand van het protoplasma is, door een ingrijpen met de lagere temperatuur, teruggedaan in de richting van haar normale wijze van functioneeren.

Deze overtuiging wordt belangrijk versterkt door de beschouwing van nevenstaande krommen.

Lijn 34-55 gr. C. en lijn 34-55-50 gr. C.



De omcirkelde stip bij 4 markeert het oogenblik, dat in een ontkleuringsproces, op 55 gr. C. ingezet, met de temperatuur van 50 gr. C. werd ingegrepen. Men ziet daar het onmiddellijk afbuigen van de lijn der afgebroken ontkleuring.

In tabel 35 komt de reversibiliteit nog sterker tot uiting, omdat hier de afgebroken ontkleuring op een 10 gr. C. lagere temperatuur werd voortgezet.

Tabel 35.

Temperatuur: 50 gr. C.

Temperatuur: 50 gr. C. en 40 gr. C.

no. v. d. proef: 362.

no. v. d. proef: 363.

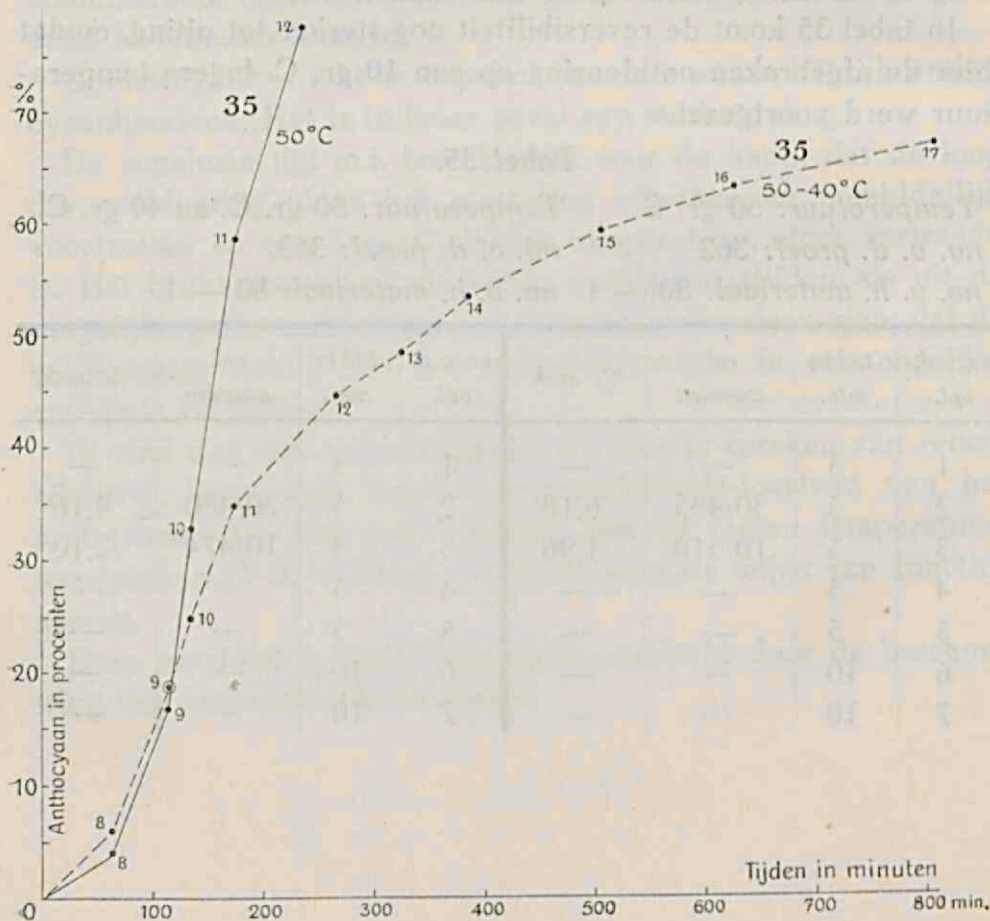
no. v. h. materiaal: 80 — 1. no. v. h. materiaal: 80 — 1.

no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarden	% anth.	no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarden	% anth.
1	3	—	—	1	3	—	—
2	5	30/485	6,18	2	5	20/480	4,16
3	5	10/510	1,96	3	5	10/474	2,10
4	5	—	—	4	5	—	—
5	5	—	—	5	5	—	—
6	10	—	—	6	10	—	—
7	10	—	—	7	10	—	—

no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarden	% anth.	no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarden	% anth.
8	20	20/475	4,21	8	20	30/480	6,25
9	50	60/440	13,63	9	50	65/490	13,26
10	20	68/425	16,—	50 gr. C.			
11	40	90/340	26,47	40 gr. C.			
12	60	78/408	19,11	10	20	28/465	6,02
13	60	—	—	11	40	45/450	10,—
				12	90	50/483	10,3
				13	60	20/475	4,21
				14	60	26/475	5,47
				15	120	27/436	6,19
				16	120	19/410	4,63
				17	120	20/475	4,21

Ook de op deze gegevens betrekking hebbende krommen spreken na het voorafgaande voor zichzelf en maken het bewijs van mijn opvatting volledig, want hier is het temperatuur-verschil bij het afbreken twee maal zoo groot als bij de andere proeven, wat in het wijder uiteengaan der lijnen zoo mooi tot uiting komt.

Lijn 35-50 gr. C. en lijn 35-50-40 gr. C.



In tabel 36 bracht ik de getallen bijeen, die werden verkregen bij een afgebroken ontkleuring op 45-40 gr. C.

Naast een afgebroken ontkleuring werd getijktijdig een doorlopende ontkleuring op de hoogste temperatuur gemaakt. Als men daarnaast nog een doorlopende ontkleuring op 40 gr. had kunnen maken zou dat beter geweest zijn, maar ik moest daar van af zien, omdat daar drie groepen van gelijkwaardige nmsn. voor noodig geweest zouden zijn en zooveel nmsn. (60 stuks) snel te maken was bij deze methode moeilijk en zou wellicht niet tot zuivere uitkomsten hebben geleid.

Tabel 36.

Temperatuur: 45 gr. C.

Temperatuur: 45 gr. C. en 40 gr. C.

no. v. d. proef: 361.

no. v. d. proef: 361 a.

no. v. h. materiaal: 79 — 1. no. v. h. materiaal: 79 — 1.

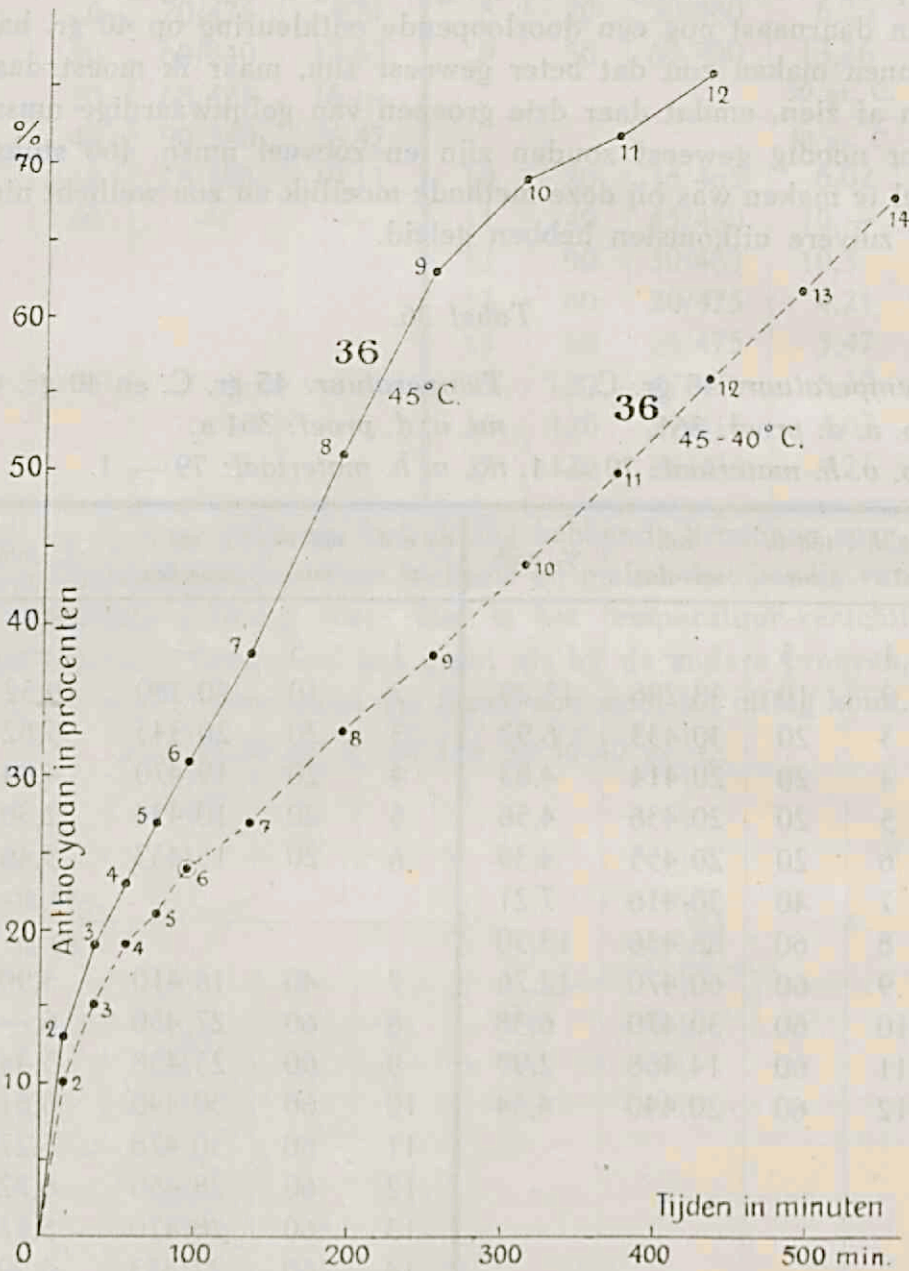
no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarden.	% anth.	no. v. d. opl.	tijd in min.	col. waarden.	% anth.
1	5	—	—	1	5	—	—
2	10	38/286	13,29	2	10	40/380	10,52
3	20	30/433	6,92	3	20	20/343	5,82
4	20	20/414	4,83	4	20	19/470	4,04
5	20	20/438	4,56	5	20	10/434	2,30
6	20	20/455	4,39	6	20	15/433	3,46
7	40	30/416	7,21				
8	60	68/436	13,30				45 gr. C.
9	60	60/470	12,76				40 gr. C.
10	60	30/470	6,38	7	40	16/410	3,90
11	60	14/468	2,99	8	60	27/450	6,—
12	60	20/440	4,54	9	60	25/458	5,44
				10	60	30/440	6,81
				11	60	30/478	6,27
				12	60	28/450	6,22
				13	60	28/470	5,97
				14	60	27/453	5,99

Van de 20 nmsn. zijn er 10 met kleine resten en 10 zijn kleurloos.

Van de 20 nmsn. zijn er 4 kleurloos en 4 hebben kleine resten, 12 met groote resten.

Onderstaande lijnen toonen de reversibiliteit overtuigend genoeg, zoodat ik van verdere toelichtingen zal afzien.

Lijn 36-45 gr. C. en lijn 36-45-40 gr. C.



SAMENVATTING.

Het raadplegen van de literatuur over het permeabiliteitsprobleem bracht er mij in de eerste plaats toe om de prioriteit van de ontdekking der osmose voor den *Abt Nollet* (1748) op te eischen. In de tweede plaats bleek mij, dat de permeabiliteit van het plasma voor endosmotische stroomingen en die voor exosmotische niet in voldoende mate als afzonderlijke vraagstukken zijn beschouwd en dat de laatste betrekkelijk weinig het onderwerp van nauwgezet onderzoek was. Waar het bestudeeren van die exosmotische stroomingen onder invloed van plasmolyseerende ionen mij minder juist voorkwam, heb ik zooveel mogelijk alleen den invloed der temperatuur nagegaan.

Of de cellen, die, door toepassing van verschillende temperaturen, een verhoogde permeabiliteit verkregen, leven of dood zijn, acht ik een open vraag, maar dan ben ik in gezelschap van physiogen van den eersten rang, o.m. van *Nägeli*, *De Vries* en *Bayliss*. Dat ik in dezen tot de eerste opvatting overhel, vindt hierin zijn oorzaak, dat deze onderzoekingen mij de belangrijke verschillen in permeabiliteit van het normale levende wortelweefsel van de biet leerden kennen.

Dat bietenweefsel een bijzonder gunstig object is voor deze onderzoekingen bewijst het feit, dat bijna alle onderzoekers van het vraagstuk der permeabiliteit het hebben gebruikt: *Nägeli*, *Sachs*, *De Vries*, *Hansteen Cranner*, *Lepeschkin* en *Collander*. De meesten van hen hebben echter met dit object maar enkele proeven genomen, terwijl ik meende, dat groote reeksen van vergelijkende proeven noodig waren en ik had er gaarne nog veel meer genomen.

De aandacht der onderzoekers is te veel gericht geweest op de maximale en de supra-maximale temperaturen, terwijl ik meende ook van de infra-maximale zooveel mogelijk gegevens te moeten verzamelen; daarbij vond ik, dat tal van die temperaturen eenzelfde invloed konden uitoefenen als de maximale en hoogere, mits ze maar langer op het materiaal konden inwerken.

Door de betrekkelijk kleine proeven-reeksen van andere onderzoekers is hen geheel ontgaan, dat het weefsel van den bietenwortel zeer verschillend op de temperaturen reageert naarmate het uit het bovineinde of de punt van den wortel genomen is; ik heb hier het oog op de door mij gevonden verschillen in resistentie, die van boven naar beneden afneemt, hoewel niet altijd even gelijkmatig.

Doordat ik maanden met hetzelfde object werkte, werd mijn aandacht getrokken door de natuurlijke en geleidelijke overgangen, die er zijn (*in hun gevoeligheid voor de verhooging der permeabiliteit door de temperatuur*) tusschen:

1. de wortels aan het einde van de eerste groeiperiode,
2. die welke in diepe winterrust zijn,
3. die welke langzamerhand uit de winterrust ontwaken,
4. de bietenwortels, die de tweede groeiperiode zijn ingetreden.

Wat hiervoor van resistentie-verschillen in een en denzelfden wortel werd gezegd, kan worden aangevuld door het volgende. Ik verkreeg enkele aanwijzingen omtrent de resistentie in de verschillende deelen van den wortel, die er op wijzen, dat bij wortels, die in het vierde stadium verkeerden, het resistentie-verloop juist omgekeerd kan zijn, dus *toenemend van boven naar beneden*.

Ik werkte met stukjes weefsel, die ik *normaalsneden* noemde, om met dien naam aan te duiden, dat die weefselstukjes *altijd van gelijke oppervlakte en van gelijke dikte waren*. Op deze omstandigheid *berust de methode van onderzoek*.

Invloed van de voorbehandeling met water op deze normaalsneden, en de daarmee te verkrijgen resultaten, kon worden aangetoond.

Invloed van dikte en oppervlakte der normaalsneden op de ontkleuringstijden kon in cijfers worden uitgedrukt.

Invloed van de aciditeit van het celvocht op den weerstand van het protoplasma tegen permeabiliteitsverhooging door de temperatuur werd waargenomen in overeenstemming met Lepeschkin. Daarbij kwam verder aan het licht, dat de aciditeit in een en denzelfden wortel belangrijk uiteen kan loopen.

Dat het voor dergelijke proeven te gebruiken materiaal niet alleen *morphologisch* (de normaalsneden en hun vervaardiging) maar ook *physiologisch* (het gebruiken van twee toestellen en andere methodische voorzorgen) zooveel mogelijk gelijkwaardig

moet zijn, werd door mij uitvoerig betoogd en door verschillende maatregelen werd er ernstig naar gestreefd dit te verwezenlijken, wat bij andere onderzoekingen niet die aandacht heeft gehad, welke dit punt ongetwijfeld verdient; ik heb ten minste in geen der door mij aangehaalde publicatie's iets omtrent deze quaestie gevonden.

Om het verloop van ontkleuringen na te gaan, werd een methode uitgewerkt, waarbij *een natuurlijke kleurenschaal* werd gemaakt; deze methode werd getoetst en bruikbaar bevonden.

Om het verloop van een ontkleuring na te gaan, wat nog nimmer was gedaan, (andere onderzoekers hebben òf alleen gelet op het begin der ontkleuring òf alleen op den ontkleuringstijd) gebruikte ik voor het eerst den colorimeter en ik beschouw het als de meest zekere methode om een exosmotische strooming van gekleurd celvocht in haar verloop te registreeren.

Mijn aandacht viel ook op ander materiaal dan de bietenwortel, en ik dacht goed te doen, methodische aanwijzingen te geven voor een onderzoek met een bladknipper en anthocyaanhoudende bladeren. Enkele in dit geschrift daarvan opgenomen gegevens bewijzen de uitvoerbaarheid van zulk een onderzoek en openen een perspectief op eventueel te verkrijgen meerdere resultaten.

Ik wijdde bijzondere aandacht aan enkele proeven van *Sachs* en de daaruit door hem getrokken conclusies. *S.* legde een aantal normaal sneden *enkele minuten* in water van 51 gr. C. om ze daarna *snel over te brengen* in water van 22 gr. C. Hij ziet nu het uit treden van anthocyaan onafgebroken doorgaan en naar zijn meening bewijst dit, dat *niet alleen het diffusie-proces is versneld, maar dat de cellen inderdaad veranderd zijn*. Ik heb door enkele experimenten dit resultaat van *S.* getoetst en kwam tot de volgende uitkomsten.

De verklaring van *Sachs* doet denken aan een doorgaan van het uittredingsproces tot volkomen ontkleuring toe, maar mijn resultaten wezen in een geheel andere richting. Inderdaad gaat de ontkleuring eenigen tijd verder na het overbrengen naar een lagere temperatuur, maar nergens leidt dit tot volkomen ontkleuring. Ik beschouw dan ook de bij deze proeven optredende verschijnselen, als te zijn veroorzaakt door een toestand van het protoplasma, die door *een plotselinge maar tijdelijke fixatie van een bepaalden permeabiliteitsgraad ontstaat, en waarbij het plasma eenigen tijd niet op de gewone wijze reageert op een snelle daling van de temperatuur (30 gr. C.)*.

Ik zag nl. bij andere proeven, bij een even plotselinge maar minder belangrijke daling der temperatuur (5 gr. C. of 10 gr. C.), dat het vermogen om op de gewone wijze te reageeren niet wordt opgeheven, maar die reactie als het ware onmiddellijk volgt. De eigenaardige verschijnselen, bij het nawerken van de proeven van Sachs, deden mij denken aan het *shock*-verschijnsel, waarvan de beoefenaars der levensleer van het dier zoo vaak spreken.

Een resultaat van mijn onderzoekingen, dat ik in deze samenvatting van de voornaamste uitkomsten in het bijzonder naar voren zou willen brengen is het volgende: *de reversibiliteit van een permeabiliteitsverhooging werd, binnen zekere grenzen, mogelijk bevonden*. Hansteen Cranner en anderen spreken in dit verband ook van reversibele processen, maar blijven in gebreke dit door proeven te bewijzen. Ik meen, door mijn *afgebroken ontkleuringen*, dit bewijs te hebben geleverd.

INHOUD.

	blz.
Voorwoord	7
Inleiding: Historisch Overzicht en Algemeene Beschouwingen	13
Materiaal en Methode	26
Ontkleuringstijden	37
Het Verloop der Ontkleuringen	51
Vergelijkende Ontkleuringen	70
Afgebroken ontcleuringen	86
Samenvatting	97

STELLINGEN

I.

Hansteen Cranner verklaart, op grond van enkele proeven, met weefsel uit den wortel van *Beta vulgaris* L. genomen, het uittreden van het anthocyaan voor een reversibel proces, maar hij blijft in gebreke, daarvoor eenig bewijs bij te brengen.

II.

De ontkieming der sporen en de eerste groei der myceliën van de z.g. humus-Basidiomyceten geschiedt onder invloed van bepaalde houtgewassen.

III.

Zoowel bij de *Pteridophyten* als bij de *Gymnospermen* zijn primitieve vormen aan te wijzen, maar bij de *Angiospermen* is dat nog niet mogelijk.

IV.

Waar het *Herbarium te Buitenzorg* een onmisbare vraagbaak is voor tal van andere diensttakken als: boschwezen, economische botanie, theecultuur enz. daar zullen daarnaast meer werkkrachten noodig zijn om de floristische inventarisatie van Java te beëindigen en die van de andere eilanden *krachtig ter hand te nemen*.

V.

Het is voor het onderzoek naar de oorzaken van bepaalde plantenziekten en hunne bestrijding van bijzonder gewicht, dat de onkruidflora van de door de groote cultures geöccupeerde gronden, nauwkeurig bekend is.

VI.

Van der Lek heeft aangetoond, dat *Verticillium albo-atrum* zoowel op kers als op aardappel parasiteert.

VII.

De theorie van *Wegener* betreffende de verschuiving der continenten is niet in staat om de disjuncte arealen van verschillende plantensoorten uit de flora van het Kulm en uit latere perioden te verklaren.

VIII.

Waar zich in Ned. O.-I. langzamerhand een eigen onderwijsstelsel begint te ontwikkelen, daar zal voor de Middelbare school moeten worden nagegaan, welke leervakken voor Indië van bijzondere beteekenis zullen kunnen zijn en daar zal het aanbeveling verdienen de *geologie* als leervak op te nemen in het programma van den bovenbouw der *Algemeene Middelbare school*.

IX.

Myxosporidiën zijn *Protozoën* en de uitspraak van *Emery*, waarbij hij het tegendeel beweert, is dus onjuist.

X.

Terecht beweert *Sunier*, dat bij *Anamnia* evenmin als bij *Amniota*, een sklerotoom, als een holle handschoen-vingervormige uitstulping, dan wel als een, in den aanvang een kleine uitstulping van het coeloom bevattende, celwoekering

van een bepaald, klein, ventromediaal gedeelte van het gesegmenteerde mesoderm ontstaat, en dat bij *Acrania* de mediale myotoomwand, die bij de drie genoemde groepen grootendeels in sklerotoom-elementen overgaat, eerst intact blijft, terwijl daarin secundair, als een speciale vorming bij deze groep, een sklerocoel tot ontwikkeling komt.

XI.

De docent in de Natuurlijke Historie aan de Middelbare school, die onderwijs moet geven in de leer van den *bouw en de verrichtingen van het menschelijk lichaam*, is daartoe in het algemeen onvoldoende voorbereid.

XII.

Het is voor het onderwijs in de Natuurlijke Historie aan de Middelbare scholen in Insulinde van belang, dat de daarbij gebruikte leerboeken geen *leer-leesboeken* zijn, maar *leerboeken in strikten zin*.

XIII.

Het verdient aanbeveling bij het plantkundig onderwijs in de aanvangsklasse der Middelbare scholen met *de bloem der Angiospermen* te beginnen.

XIV.

Het is van bijzonder belang, dat zij, die zich voorbereiden voor het examen voor *Hoofdonderwijzer(es)* in *Plantkunde* en *Dierkunde* onderwezen worden, terwijl deze beide vakken weer zoo spoedig mogelijk in het examen-programma zouden moeten worden opgenomen.

D
Ut
1