



Over de stoffen die invloed uitoefenen op de aggregatie bij Drosera

<https://hdl.handle.net/1874/292979>

Ag. 192, 1929

OVER STOFFEN DIE
INVLOED UITOEFENEN
OP DE AGGREGATIE
BIJ DROSEREA

W. M. COELINGH

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

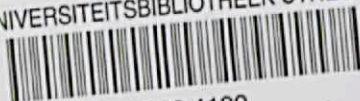
Diss.
Utrecht

1929

OVER STOFFEN DIE INVLOED
UITOEFENEN OP DE AGGREGATIE
BIJ DROSERIA

OVER STOFFEN DIE INVLOED
UITOEFENEN OP DE AGGREGATIE
BY DIOSERA

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK UTRECHT^L



3969 4199

OVER STOFFEN DIE INVLOED UITOEFENEN OP DE AGGREGATIE BIJ DROSEREA

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN
DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE
AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT,
OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS
Dr. A. A. PULLE, HOOGLEERAAR IN DE
FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE,
VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER
UNIVERSITEIT TE VERDEDIGEN TEGEN DE
BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS-
EN NATUURKUNDE, OP MAANDAG 14 OCTO-
BER 1929, DES NAMIDDAGS TE VIER UUR

DOOR

WILLEMINA MARIA COELINGH
GEBOREN TE AMSTERDAM

BAARN — N. V. HOLLANDIA-DRUKKERIJ — 1929

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

Op dezen laatsten dag van mijn studietijd voel ik behoefte velen te danken voor hetgeen zij mij in deze periode hebben gegeven.

Hooggeleerde van Romburgh, Kruyt, Moll en Rutten, voor Uw onderwijs in de voor den bioloog belangrijke verwante takken van wetenschap ben ik U zeer erkentelijk. Uw colleges, excursies en praktika, Hooggeleerde Mejuffrouw Westerdijk, Hooggeleerde Nierstrasz, Pulle, Jordan en de Bussy, hebben mij ingewijd in de onderdeelen der biologie, ik dank U voor wat Gij hebt bijgedragen tot mijn wetenschappelijke vorming.

Hooggeleerde Went, hooggeachte Promotor, dat ik thans bij U zal promoveeren is voor mij wel een buitengewoon aangenaam einde van mijn studietijd. Wat ik van U, niet het minst gedurende mijn assistentschap, heb geleerd is meer dan dat ik er U hier voldoende voor zou kunnen danken. Zeer heb ik het op prijs gesteld dat Gij, ondanks Uw groote belangstelling in hun arbeid, Uw leerlingen zoo vrij laat bij het werken voor hun proefschrift. Voor de ook mij zoo voortdurend betoonde, haast spreekwoordelijke gastvrijheid in Uw familiekring ben ik Mevrouw Went en U buitengewoon dankbaar.

Zeergeleerde Mejuffrouw van Herwerden, met bijzonder genoegen denk ik terug aan de jaren dat ik assisteerde bij het door U geleide praktikum.

Zeer erkentelijk ben ik het bestuur van de Stichting „Fonds Doctor Catharine van Tussenbroek”, dat het mij mogelijk maakte nog ruim een half jaar langer aan mijn dissertatie te werken. Juist deze laatste maanden zijn voor mijn proeven van zooveel belang geweest.

Velen hebben direct of indirect medegeholpen aan het totstandkomen van dit proefschrift. Voor de mij betoonde hulp en belangstelling dank ik hartelijk.

U, waarde A. de Bouter, ben ik erkentelijk voor de verzorging der teekeningen.

Voor hun hulpvaardigheid dank ik de verdere leden van het personeel van laboratorium en hortus.

Een apart woord van dank komt U toe, waarde van Staveren, die met zooveel toewijding en succes mijn planten hebt verzorgd.

INLEIDING

1. *Aggregatie*

Wanneer de ovale eindklier van een tentakel, zooals die in grooten getale voorkomen op de bladen der *Drosera*-soorten, op een of andere wijze wordt geprikkeld, dan treedt in de cellen van de eindklier en van den tentakelsteel na eenigen tijd een verandering op die door C h. D a r w i n (1875) is ontdekt en die hij „aggregation” noemde. Het verloop van dit aggregatieproces is al dikwijls beschreven, hier zal worden volstaan met een korte schets van de veranderingen die men ziet wanneer men de aggregatie in een tentakelsteel van het begin af onder sterke vergrooting volgt. De klier zelf is voor waarneming niet zeer geschikt en daardoor in dit opzicht minder onderzocht.

De inhoud van de langgerekte cellen van den tentakelsteel bestaat in ongeprikkelden toestand uit één groote vacuole, gevuld met gewoonlijk min of meer rood gekleurd celvocht en omgeven door een zeer dun, nauwelijks zichtbaar laagje protoplasma waarin de spoelvormige kern en de weinige kleine en bleke chloroplasten liggen. Naar den voet van de tentakel toe wordt het celvocht bleeker, het aantal en de grootte van de chloroplasten neemt toe, terwijl de kleur donkerder groen wordt. In de onderste steelcellen heb ik meestal de door W. G a r d i n e r (1885) ontdekte en later ook door A. G a r j e a n n e (1918) beschreven z.g. rhabdoïden gezien. De overgang naar het eigenlijke bladweefsel is geleidelijk.

Wanneer de eindklier van een tentakel wordt geprik-

keld beginnen de steelcellen van boven af te aggregceeren. Gewoonlijk ziet men in een cel eerst protoplasmastrooming optreden. De dikte van het wandstandige protoplasma neemt toe, hetgeen het eerst te zien is in de hoeken van de cel. De vacuole deelt zich in verschillende, soms zeer vele deelen en tusschen deze deelen ziet men het protoplasma stroomen in strengen of draden. Tenslotte is de vacuole verdeeld in een zeer groot aantal kleinere van onregelmatigen en voortdurend veranderenden vorm, terwijl de volumenvergrooting van het protoplasma zeer sterk is geworden. De eigenaardige vormen en vormveranderingen van de gedeelde vacuole hangen blijkbaar samen met de sterke protoplasmastrooming; houdt n.l. de strooming op dan ronden de vacuolen zich af tot bollen en komen eveneens tot rust.

De aggregatie is een omkeerbaar proces, het duurt echter vrij lang voordat de oorspronkelijke toestand weer geheel is teruggekeerd.

2. *Beschrijvingen in de literatuur*

De eerste beschrijving van de aggregatie is te vinden bij Charles Darwin in zijn boek „Insectivorous Plants” (1875), zij komt echter niet geheel overeen met het boven geschetste verloop. Dit komt doordat Darwin, misleid door de vaak amoebe-achtige vormveranderingen der gedeelde vacuolen, deze voor protoplasma heeft aanzien. Een tweede reden is dat Darwin geen onderscheid heeft gemaakt tusschen de echte aggregatie en een verschijnsel dat K. Goebel (1893) „granulatie” heeft genoemd en dat bestaat uit het neerslaan van in het celvocht opgeloste stoffen onder den invloed van vele alkalisch reageerende oplossingen en van verschillende alkaloiden. Inderdaad kan de eindtoestand van deze granulatie veel lijken op dien van de aggregatie; de beginstadia zijn echter goed te onderscheiden.

A. F. W. Schimper (1882) ontdekte in de epidermiscellen van *Sarracenia*-bekers na insectenvoeding een verschijnsel dat hij vergelijkt met aggregatie. In beide gevallen deelt de vacuole zich en bovendien schijnt de zwelbaarheid van het protoplasma toe te nemen, zoodat dit water onttrekt aan het celvocht. De „aggregated masses” van Darwin zijn volgens hem vacuolen en geen protoplasma.

Na Darwin's onderzoekingen verschijnt pas weer in 1886 een uitvoerige studie over de aggregatie, n.l. van Hugo de Vries. Aan de hand van vele afbeeldingen wordt in deze publicatie het verloop van het geheele proces uitvoerig geschetst. Hij maakt, evenals W. Gardiner in het zelfde jaar (1886), voor het eerst onderscheid tusschen de echte aggregatie en het verschijnsel dat Goebel later granulatie noemde. Bovendien stellen beiden de protoplasmastrooming verantwoordelijk voor de vormveranderingen der vacuole-deelen ¹⁾; zij beschouwen deze bewegingen dus, in tegenstelling met Darwin, als passief.

De opvatting van de Vries wijkt in een paar punten af van die van Schimper. Hij meent n.l. dat uit de vacuole bij aggregatie een vloeistof treedt die tusschen het protoplasma en den vacuolewand zou komen te liggen. Evenmin als andere onderzoekers heb ik deze vloeistoflaag kunnen ontdekken. De meening van Schimper in deze vraag wordt dan ook door de meeste onderzoekers gedeeld. Door de Vries wordt Schimper's publicatie niet genoemd, blijkbaar kende hij deze niet.

3. *Veranderingen in de osmotische waarde van het celvocht*

Wanneer Schimper gelijk heeft, dat de volumen-

¹⁾ Ten onrechte noemt Francis Darwin (1888) in een noot op blz. 34 van de door hem bewerkte 2^e uitgave van zijn vaders boek Pfeffer als de eerste die dit uitsprak. Pfeffer (1877) zag alleen granulatie.

vergrooting van het protoplasma haar oorzaak vindt in de opname van water uit de vacuole, dan moet de concentratie van het celvocht bij de aggregatie groter worden, en wel omgekeerd evenredig met de volumenverandering van de vacuole. Wanneer daarentegen een oplossing van verschillende stoffen de vacuole verlaat zooals de Vries zich dat voorstelt, dan zal de concentratie van het celvocht niet, of in ieder geval niet volgens deze evenredigheid veranderen. Zelfs zou de concentratie kleiner kunnen worden in het, minder waarschijnlijke, geval dat de oplossing die de vacuole verlaat geconcentreerder is dan het celvocht zelf.

Voor de hand ligt dus om te trachten de osmotische waarde van het celvocht te meten.

Reeds de Vries bepaalde de plasmolytische grensconcentratie doch vond dat deze bij de aggregatie niet noemenswaard veranderde.

Å. Å k e r m a n (1917) was de eerste die door een groot aantal proeven uitmaakte dat de osmotische waarde bij grensplasmolyse inderdaad door de aggregatie stijgt. Uit zijn onderzoek (blz. 174 en 178) krijgt men echter ten onrechte den indruk dat hij het omgekeerde vond van Gardiner. In diens stuk vinden we n.l. de opmerking dat de tentakels bij de aggregatie minder turgescient worden, een opvatting die Å k e r m a n meent te moeten tegenspreken. Dit is weer het gevolg van het verkeerde gebruik van de woorden „Turgor” en „Turgorkraft”. Inderdaad vond Gardiner een *daling* van de *turgor* en Å k e r m a n een *stijging* van de *osmotische waarde van het celvocht* (door hem ten onrechte „Turgor” en „Turgorkraft” genoemd), deze twee verschijnselen plegen echter samen te gaan. Ook vond Å k e r m a n door proeven met gecentrifugeerde tentakels dat in niet geaggregeerde cellen het s.g. van het protoplasma groter is dan dat van het celvocht, terwijl in geaggregeerde cellen het s.g. van het celvocht dat van het protoplasma overtreft.

Het is dus wel uitgemaakt dat de osmotische waarde

van het celvocht stijgt bij de aggregatie. Hiermede staat echter nog niet vast dat Schimper's opvatting de juiste is, dat dus bij de aggregatie alleen water aan de vacuole zou worden onttrokken. De Vries wist wel dat niet alle in het celvocht opgeloste stoffen bij de aggregatie uit de vacuole treden, de roode kleurstof b.v. en de opgeloste looistof blijven in de vacuole. Hij meende echter dat er andere stoffen waren waarvoor de vacuolewand bij de aggregatie doorlaatbaar zou worden, en indien de uittredende vloeistof minder geconcentreerd was dan het celvocht dan zou ook hier een stijging van de osmotische waarde binnen de vacuole te verwachten zijn.

Oorspronkelijk was het doel van dit onderzoek, te trachten deze kwestie op te lossen. Dit doel werd niet bereikt; een korte beschrijving van eenige proeven hieromtrent vindt men in het eerste hoofdstuk.

4. *Polariteit bij de aggregatie*

De volgende feiten en overwegingen hebben geleid tot de proeven, beschreven in het 2e tot 4e hoofdstuk.

De aggregatie begint altijd, onverschillig op welke manier zij werd opgewekt, aan die zijde van den tentakelsteel waar de eindklier zit.

Op het eerste gezicht zou men geneigd zijn dit toe te schrijven aan een vlugger indringen van de prikkelende stof in de klier, vooral wanneer men weet, dat het blad en speciaal de tentakelstelen een zeer dikke en taaie cuticula bezitten, terwijl deze op de eindklieren ontbreekt.

Wanneer men echter een tentakel van het blad afknijpt en in een oplossing van b.v. Liebig's vleeschextract legt, dan zal men toch de aggregatie aan de zijde van de klier zien beginnen en zij bereikt aan den tentakelvoet ook nooit de zelfde sterkte als bovenaan¹⁾.

¹⁾ Ook de granulatie begint bovenin de tentakels, hiervoor moet men echter wel de oorzaak zoeken in het verschil in dikte van de cuticula bij klier en steel. Legt men een losse tentakel in een cafeïne oplossing

Zelfs wanneer men een tentakelsteel, los van blad en eindhier, in zulk een oplossing legt, wordt toch de aggregatie altijd het sterkst aan de zijde waar de klier heeft gezeten.

Men heeft hier dus te maken met een soort polariteit die op het eerste gezicht in eenig verband schijnt te staan met de eindhier, maar die ook na het verwijderen van deze eindhier blijft bestaan.

Het nagaan van de oorzaak van deze polariteit was de tweede opgave van dit onderzoek.

dan ziet men de granulatie van de klier en van de sneevlakte uit voortschrijden.

METHODE

1. Kweekwijze

Voor het onderzoek werd voornamelijk *Drosera capensis* L. gebruikt, een voor een *Drosera* vrij forsche en sterke soort.

Daarnaast werden soms vergelijkende proeven met *Drosera spathulata* Labill., *D. binata* Labill, en met de drie inheemsche soorten *D. rotundifolia* L., *D. intermedia* Hayne en *D. anglica* Huds. genomen.

De drie exotische soorten werden uitgezaaid op goed met water doordrenkte losse turven die geplaatst werden in platte aarden schotels met potscherven en water. Zij ontwikkelden zich krachtig op een warme en zonnige standplaats in een der kassen.

De inlandsche soorten werden buiten verzameld en geplant in poreuze aarden bakken met een mengsel van turf-molm en sphagnum, die zelf weer in schotels met water stonden. Ook deze soorten kweekte ik binnen, in een matig warme kas, om van de weersgesteldheid onafhankelijk te zijn.

In den herfst was in de planten verandering merkbaar. De inlandsche soorten, *D. intermedia* het eerst, hielden op met groeien en maakten winterknoppen. Ook bij de exotische soorten, vooral *D. capensis* en *D. binata*, werd de vorming van nieuwe bladen gestaakt en er ontstonden geen secreetdruppeltjes meer op de tentakelklieren. In dezen toestand waren de bladen voor proefnemingen ongeschikt.

2. Kunstmatige belichting

Daar de proeven ook 's winters moesten worden voortgezet besloot ik den invloed van kunstmatige belichting te beproeven.

Een electrische lamp van 1000 kaarsen werd ruim een halven meter boven de planten gehangen; tusschen lamp en planten werd een groote glazen bak bevestigd waarin water stond tot een hoogte van 1—2 d.M. Deze lamp brandde des nachts gedurende de wintermaanden.

Reeds na twee dagen verschenen de secreetdruppeltjes weer en na een paar weken waren de planten hard aan het groeien.

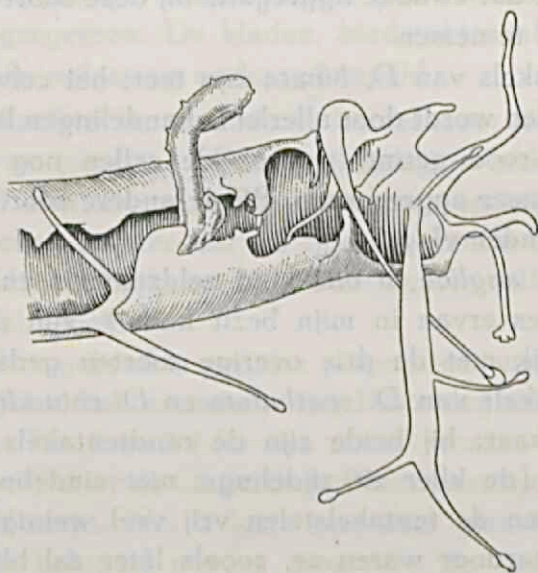
In 1927 werd in December deze behandeling met *D. capensis* en *D. spathulata* begonnen. In 1928 belichtte ik van 1 November af alle zes soorten. *D. rotundifolia* en *D. anglica* die bezig waren winterknoppen te vormen begonnen weer te groeien en waren na een paar weken bezig zeer groote bladen te vormen. Bij *D. intermedia* wilde dit aanvankelijk niet gelukken. Ik heb toen eind November eenige winterknoppen gedurende 60 uur in aetherdamp gezet en daarna weer onder de lamp geplaatst. Werkelijk gingen zij zich ontwikkelen terwijl de niet behandelde volhardden in hun rusttoestand.

Toch bleek na eenigen tijd dat *D. intermedia* en *D. rotundifolia* weer sterk achteruitgingen. Ik schrijf dit toe aan de te hooge temperatuur in deze kas, die door de lamp nog aanzienlijk werd verhoogd. Deze twee soorten werden daarom in een koelere kas geplaatst en gedurende den winter met rust gelaten.

D. anglica daarentegen ontwikkelde zich gedurende de belichting zoo weelderig als men in de natuur slechts zelden ziet. Toen echter eind Februari met kunstmatig belichten werd opgehouden is *D. anglica* in den loop van een week achteruitgegaan: er werden geen nieuwe bladen gevormd en de plantjes maakten winterknoppen die eind

Mei nog niet tot ontwikkeling waren gekomen, hoewel ze er gezond uitzagen en volop zon kregen.

Een schadelijken invloed van de belichting heb ik nooit gezien. Wel vertoonde een *D. anglica*-plant tijdens de wintermaanden abnormaliteiten aan de bladen die misschien in verband staan met de kunstmatige belichting. Hierbij waren de randen van de bladschijf omgekruld, alsof het blad een insect gevangen hield. Bij nadere beschouwing bleek zulk een blad haast alleen randstandige tentakels te bezitten die dikwijls abnormaal waren, b.v. geen eindklier droegen of een 2- of 3-dubbele; soms ook kwamen vertakte tentakels voor. In vele gevallen was er, ook bij jonge bladen, een adventieve knop op de bladschijf ontstaan. Afbeelding I geeft de bovenste helft van zulk een blad bij zwakke vergrooting weer.



Afbeelding I

3. Bloei

Als gevolg van de belichting bloeide *Drosera capensis* in 1929 reeds in Januari en ging daarmee den geheelen

zomer door, terwijl de bloeitijd voor exemplaren die hier in kassen worden gekweekt anders omstreeks Juli valt. Ook *D. rotundifolia*, *D. anglica* en *D. intermedia* bloeiden in de kas volop. *D. spathulata* heeft slechts eens een bloemtros gevormd, terwijl *D. binata* nooit heeft gebloeid.

4. De gebruikte soorten

Van de zes soorten bleken *Drosera binata* en *D. intermedia* het minst geschikt voor mijn proeven.

Bij *D. intermedia* bevatten de tentakels zeer veel chlorophyl terwijl de roode kleur het sterkst is in de subepidermale cellaag. Hierbij komt dat de intercellulaire holten reeds direct onder de eindklier beginnen terwijl deze bij de andere soorten eerst aan den voet der tentakels optreden. Dit alles maakt dat zwakke aggregatie bij deze soort zeer moeilijk is waar te nemen.

De tentakels van *D. binata* zijn teer; het celvocht in de tentakelcellen wordt door allerlei behandelingen licht eenigszins paars-rood getint, waarna de cellen nog wel leven maar niet meer aggregeren. Bij de andere soorten gebeurt dit veel minder vlug.

Daar *D. anglica* in ons land zeldzaam is en ik slechts vier plantjes ervan in mijn bezit had ¹⁾, zijn de proeven voornamelijk met de drie overige soorten gedaan.

De tentakels van *D. spathulata* en *D. rotundifolia* lijken veel op elkaar; bij beide zijn de randtentakels afwijkend van bouw (de klier zit zijdelings, niet eindelings) en bij beide dragen de tentakelstelen vrij veel weinigcellige papillen. Daardoor waren ze, zooals later zal blijken, voor sommige proeven minder geschikt.

Deze papillen komen ook bij andere soorten voor, maar bij *D. capensis* b.v. in klein aantal en alleen aan den voet der tentakels.

¹⁾ Deze dank ik aan de vriendelijkheid van den heer H. R. Hoogenraad te Deventer.

Over het algemeen waren de tentakels van *D. capensis* in den zomer veel sterker rood gekleurd dan des winters. Daar de roode kleur het vaststellen van zwakke aggregatie zeer vergemakkelijkt hoopte ik dat de kunstmatige belichting ook hierop invloed zou hebben, te meer daar vroegere onderzoekers (b.v. H u g o d e V r i e s) reeds hebben gewezen op den samenhang ook bij *Drosera* tusschen belichting en anthocyaanvorming.

Inderdaad bleek de belichting invloed te hebben op de kleur, echter lang niet zooveel als ik had gehoopt; waarschijnlijk was de temperatuur te hoog. Alleen *D. spathulata* was ook 's winters sterk rood gekleurd.

5. Aggregatie veroorzakende stoffen

In den eersten tijd werden steeds oplossingen, al of niet gekookt, van Liebig's vleeschextract gebruikt om tentakels te laten aggregeren. De bladen, bladstukjes of tentakels werden in de oplossing ondergedompeld.

Later gebruikte ik, evenals Å k e r m a n, meestal oplossingen van pepsine. Deze oplossingen bederven iets minder snel dan die van vleesch-extract en men kan ze eveneens koken zonder dat de aggregerende eigenschap verdwijnt. Hieruit blijkt reeds dat het enzym zelf hier geen voorname rol speelt.

Van de drie gebruikte pepsine preparaten was no. 1 afkomstig van het Laboratorium voor Physiologische Chemie te Utrecht. No. 2 en 3 (die het meest werden gebruikt) waren geleverd door de Onderlinge Pharmaceutische Groot-handel te Utrecht. No. 2 loste niet zeer gemakkelijk op, het was een lichtgeel poeder waarvan de oplossing in leidingwater zuur reageerde t.o.v. broomthymolblauw. Door koken werd de oplossing troebel. Preparaat 3 was een zuiver wit poeder dat zeer gemakkelijk oploste. De oplossing in leidingwater bleef na koken helder, die in gedestilleerd water vertoonde bij koken een vlokkig neerslag. Het heldere filtraat hiervan bezat echter toch sterke aggrega-

rende eigenschappen en was dus bruikbaar. De oplossingen reageerden alkalisch t.o.v. broomthymolblauw.

6. *Vergrooting*

Voor het vaststellen van aggregatie werd steeds oculair 2 en objectief 8a van Reichert gebruikt.

Het is mij gebleken dat een tentakel die er b.v. onder obj. 5 volkomen ongeaggregeerd uitziet, toch onder 8a dikwijls vrij sterk geaggregeerd kan blijken te zijn. Vooral kan men zich vergissen met beginstadia, waar de volumenvergrooting van het protoplasma nog niet zeer sterk is.

7. *Vergelijking van de sterkte der aggregatie*

Een groote moeilijkheid is, dat men de sterkte van aggregatie niet kan meten en in cijfers uitdrukken. De termen „sterk” of „zwak” zijn slechts een subjectieve maat.

Wanneer men echter vele maanden lang aggregatie waarneemt onder dezelfde vergrooting dan zijn deze benamingen voor vergelijkende proeven toch zeer bruikbaar.

De door mij in de tabellen gebruikte uitdrukkingen voor de sterkte der aggregatie zijn in volgorde:

zeer zwak; zwak; vrij zwak; vrij duidelijk; duidelijk; vrij sterk; sterk; zeer sterk.

Voor één proef werden steeds stukken van één blad gebruikt; soms werden eenige bladen ieder over de verschillende vloeistoffen verdeeld.

HOOFDSTUK I

1. De osmotische waarde van het celvocht

De proeven van Å k e r m a n met *Drosera rotundifolia*, *D. binata* en *D. spathulata* toonen duidelijk aan dat de osmotische waarde bij grensplasmolyse bij de aggregatie grooter wordt.

Dit blijkt, zooals te verwachten was, ook het geval te zijn bij *D. capensis*. Tabel I en II geven de uitkomsten van eenige van deze proeven.

TABEL I

Concentratie rietsuiker	D. rotundifolia		D. capensis	
	Niet geprikeld	10 u. met pepsine ge- prikeld	Niet geprikeld	10 u. met pepsine ge- prikeld
PLASMOLYSE				
10 ‰	niets	niets	—	—
12 ‰	zwak	niets	—	—
14 ‰	vrij sterk	niets	niets	niets
16 ‰	sterk	zwak	niets	niets
18 ‰	zeer sterk	vrij sterk	zwak	niets

Gebruikt werden van *D. rotundifolia* een geprikeld en een niet-geprikeld blad van dezelfde plant.

Van *D. capensis* een geprikkelde en een niet-geprikkelde helft van een zelfde blad.

Plasmolyse werd na 35—40 minuten vastgesteld.

Voor het beter indringen van de vloeistof werden te voren smalle reepjes met tentakels geknipt en de eindklieren verwijderd.

TABEL II

Concentratie rietsuiker	D. spathulata		D. capensis	
	Niet geprikeld	18 u. met pepsine ge- prikeld	Niet geprikeld	18 u. met pepsine ge- prikeld
Plasmolyse				
14 %	—	—	niets	niets
16 %	niets	niets	zwak	niets
18 %	zeer zwak,	niets	duidelijk	niets
20 %	twijfelachtig duidelijk	zwak	sterk	alleen boven- in niet
24 %	sterk	duidelijk, maar niet overal	—	—

Van *D. spathulata* bladen van één plant, van *D. capensis* helften van één blad.

Na één uur bekeken. Smalle reepjes zonder eindklieren.

Wat hier wordt bepaald is de osmotische waarde van de cel als geheel en het is de vraag of deze ook in dit geval gelijk te stellen is met de osmotische waarde van het celvocht. Indien in een cel die bezig is te aggregereen, het waterevenwicht tusschen celvocht en protoplasma is verbroken dan wordt hier een fout gemaakt, die echter waarschijnlijk te verwaarloozen is.

Als plasmolyticum werd rietsuiker gebruikt. Daar het bleek dat de handelssuiker schadelijk werkte op de tentakelcellen werd deze vooraf gezuiverd door omkristalliseeren uit alcohol. Waar in een van de volgende hoofdstukken over rietsuiker wordt gesproken is steeds deze zuivere suiker bedoeld.

Å k e r m a n gebruikte bij zijn plasmolyse-proeven KNO_3 of glucose. De plasmolytische grensconcentratie van ongeprikkelde tentakels vond hij voor *D. rotundifolia* bij 70%, voor *D. binata* bij 8—90% en voor *D. spathulata* bij

7—8 0/0 glucose. Omgerekend op saccharose geeft dit, daar de moleculaire gewichten zich verhouden als 19 : 11, respectievelijk 12,1 0/0, 14,7 0/0 en 13,0 0/0.

Het is eigenaardig dat in mijn proeven de plasmolytische grensconcentratie van ongeprikkelde tentakels voor *D. spathulata* zooveel hoger ligt dan bij Å k e r m a n, n.l. iets beneden 18 0/0 rietsuiker. Voor *D. rotundifolia* is het verschil maar gering; in eenige proeven met *D. binata* bleek dat hier de grensconcentratie van ongeprikkelde tentakels nog hoger ligt dan bij *D. spathulata*.

Waarschijnlijk zijn deze verschillen voor een deel het gevolg van het feit, dat de niet geprikkelde tentakels gewoonlijk toch bovenin eenigszins geaggregeerd waren, een verschijnsel dat mij ook in andere proeven veel moeite heeft bezorgd en waarvan ik de oorzaak niet te weten heb kunnen komen. Misschien heeft Å k e r m a n hier minder last van gehad. Ook is het bekend, dat de osmotische waarde van plantencellen varieert met de omstandigheden waaronder de plant is gegroeid.

2. Aggregatie door mechanische invloeden en door warmte

Alle pogingen om door mechanisch prikkelen flinke aggregatie te verkrijgen teneinde eenig verschil in de osmotische waarde van het celvocht te kunnen constateeren, zijn mislukt. De oorzaak is 1e dat zelfs ongeprikkelde tentakels al eenigszins geaggregeerd zijn, 2e dat mechanisch prikkelen slechts zwakke aggregatie veroorzaakt.

Geprikkeld werd 1e door het leggen van glassplinters op de eindklieren, 2e door herhaaldelijk bestrijken van de klieren met een zorgvuldig gereinigd penseel, 3e door het vele malen sluiten en weer verbreken van een elektrische stroom door de tentakels heen.

Iets meer succes had ik met bladen die door onderdompelen in warm water werden geprikkeld. Men krijgt hier echter gemakkelijk beschadiging van de cellen door iets te lang prikkelen of door te hooge temperatuur. Tabel III

TABEL III

Plasmolyse *D. capensis*

Concentratie rietsuiker	Niet geprikkeld		Geprikkeld door hoge temperatuur	
	Basis	Top	Basis	Top
16 ‰	vrij sterk	vrij sterk	vrij sterk	vrij duidelijk
18 ‰	sterk	sterk	sterk	vrij sterk

Geprikkeld werd door onderdompelen gedurende 3 sec. in water van 60° C. Daarna evenals het controleblad van hetzelfde plantje 4 uur in 8 ‰ rietsuiker. Plasmolyse werd vastgesteld na 30 minuten. De eindklieren waren niet afgeknipt. Aggregatieverschil vrij sterk.

geeft de uitkomst van zulk een proef weer. Hier werd een zeer jong plantje van *D. capensis* gebruikt dat behalve de cotylen 5 blaadjes had. De tentakels van zulke zaailingen zijn n.l. gewoonlijk heel weinig geaggregeerd in ongeprikkelden toestand.

3. Microdissectie

Het oorspronkelijke doel van deze onderzoeken was, te weten te komen of het protoplasma tijdens de aggregatie uit het celvocht alleen water, of een oplossing opneemt.

In het 1e geval moet het volumen van de vacuole veranderen in omgekeerde evenredigheid met de osmotische waarde van het celvocht. Het is dus noodig, van eenzelfde cel in geprikkelden en in ongeprikkelden toestand te meten: 1e de concentratie van het celvocht, 2e het volumen van de vacuole.

Het eerste punt behoeft geen onoverkomelijke bezwaren op te leveren, hoewel een *Drosera*-cel, vooral een geaggregeerde, nu niet bepaald een ideaal object is voor nauwkeurige plasmolyse proeven.

Het volumen van de vacuolen is echter in een geaggregeerde cel onmogelijk te meten. Het celvocht is hier ver-

deeld over zooveel kleine vacuolen van zeer grilligen en voortdurend veranderenden vorm dat het met eenige nauwkeurigheid teekenen er van tot de onmogelijkheden behoort. Ook microphoto's kunnen hier niet helpen, daar steeds een aantal vacuolen door andere is bedekt en dus niet zichtbaar wordt.

Misschien zal het echter mogelijk blijken om onder het microscoop één cel uit een in isotonische oplossing liggende tentakel voorzichtig aan te snijden, zoodat de vacuolen er uit komen. Zij rondon zich dan n.l. direct af, zoodat hun volumen door een eenvoudige berekening is te vinden.

Reeds de Vries zag, wanneer hij een tentakel stuk sneed in een ongeveer isotonische oplossing, vele vacuolen uit de aangesneden cellen treden.

Het gelukte mij ook herhaaldelijk dit verschijnsel te zien. De vacuolen blijven nog een tijdlang leven, waarschijnlijk lang genoeg om metingen uit te voeren.

Het zal echter noodig zijn om één bepaalde cel onder het microscoop aan te snijden. Dr. S. L. Schouten was zoo vriendelijk zich veel moeite te getroosten om voor mij een micromesje te maken dat te gebruiken zou zijn in den door hem indertijd geconstrueerden micromanipulator (1905, 1911).

Tot nu toe is het echter nog niet gelukt een instrument te verkrijgen, dat volkomen aan het doel beantwoordt. De moeilijkheid zit vooral in de buitengewoon dikke en taaie cuticula, waardoor aan het mesje hooge eischen van stevigheid worden gesteld; deze zijn echter moeilijk te combineren met de fijnheid die aan den anderen kant moet worden geëischt.

HOOFDSTUK II

De oorzaken van het aggregatieverval in de tentakelstelen

Zooals reeds in de inleiding werd beschreven begint de aggregatie steeds aan het bovineind van een tentakel, onverschillig op welke manier de tentakel is geprikkeld, en dit verschijnsel kan niet het gevolg zijn van het verschil in dikte van de cuticula tusschen steel en eindklier. Deze polariteit is zeer opvallend en vroegere onderzoekers hebben haar dan ook meestal genoemd.

1. *Proeven van Å k e r m a n*

Å k e r m a n was de eerste die naar aanleiding hiervan zich bezig hield met de rol van de eindklier bij de aggregatie.

Hij knipte van de tentakels de klier af, of bovendien nog $\frac{1}{3}$ of $\frac{2}{3}$ van den steel, en legde de overgebleven stukken in een aggregierend werkende vloeistof. In het 1e geval was de aggregatie maar weinig zwakker dan in de contrôlebladen met intacte eindklieren, in het tweede geval was de aggregatie zwak, in het derde waren de stompjes in het geheel niet geaggregeerd.

Over dit derde geval schrijft hij op blz. 173: „....Vielleicht ist die Erklärung darin zu suchen dass für das Hervorbringen der Aggregation in den unteren Zellen die oberen Zellen und die Zellen der Enddrüse wirklich notwendig sind, z. B. dadurch, dass nur diese Zellen einen für das Zustandekommen der Aggregation notwendigen Stoff er-

halten oder ausbilden können der zu den unteren Zellen des Stieles geleitet werden muss um das Zustandekommen der Aggregation zu ermöglichen."

2. „Aggregatiestof"

Deze hypothese, n.l. dat het verschillend gedrag bij de aggregatie van bovenende en voet van een tentakelsteel het gevolg zou zijn van de ongelijke verdeeling van een onbekende stof, heeft iets aantrekkelijks. De hypothetische stof zou dan door de eindklier moeten worden afgescheiden, niet naar buiten maar naar de zijde van het blad toe. Als wij nu nog aannemen dat deze stof door de cellen wordt verbruikt, dan moet er een concentratieverval ontstaan in den tentakelsteel.

In een willekeurig stuk tentakelsteel dat men losknijpt zal de concentratie van de „aggregatiestof" bovenaan grooter zijn dan onderaan. Hiervan zal het gevolg zijn dat de aggregatie bovenaan sterker zal zijn dan onderaan als men dit stukje steel in een oplossing van b.v. vleeschextract legt.

Getracht werd nu om na te gaan in hoeverre bovengenoemde hypothese in overeenstemming is met de werkelijkheid.

3. Aggregatie in tentakelstompen

Begonnen werd met het nadoen van de proef van Å k e r m a n die voor hem aanleiding is geweest tot het schrijven van de boven geciteerde zinnen. Hierbij bleek dat het onderste derde deel van den tentakelsteel gewoonlijk wel degelijk in staat is tot aggregeeren wanneer de rest van de tentakel is verwijderd. Gewoonlijk werkte ik met *D. capensis* maar ook met de door Å k e r m a n gebruikte *D. rotundifolia* kreeg ik dezelfde resultaten.

Dat Å k e r m a n dit anders vond wijt ik aan de groote individueele verschillen tusschen de bladen onderling. Ook

is het mogelijk dat hij een zwakkere vergrooting gebruikte dan ik.

Door de stompen nog veel korter te knippen kan bewerkt worden dat er meestal geen aggregatie meer optreedt.

4. *Aggregatie in stukjes tentakelsteel zonder klier*

Een los stukje tentakelsteel aggregeert dus bovenaan sterker dan onderaan. Wanneer dit het gevolg is van de ongelijke verdeeling van een „aggregatiestof” dan ligt het voor de hand, te trachten deze ongelijke verdeeling op te heffen. Dit gelukt als men dergelijke stukjes een paar dagen laat liggen in een 12 0/0 rietsuikeroplossing (deze oplossing is iets hypotonisch t.o.v. het celvocht). Dan voegt men een paar druppels toe van een oplossing van Liebig's vleeschextract. Na 10—15 uur is het volgende te zien: de kleinste stukjes zijn niet geaggregeerd, de grootste vertoonen gewoonlijk in het midden zwakke aggregatie.

Bij een steekproef vond ik b.v. eens:

bovenaan geaggregeerd: 2,

in het midden geaggregeerd: 13,

onderaan geaggregeerd: 0,

niet geaggregeerd: 8.

Deze verdeeling van de aggregatie is te begrijpen wanneer we ons voorstellen dat de hypothetische stof door de sneevlakten in de suikeroplossing was gediffundeerd.

Ook de grootste stukjes blijken niet meer te aggregeeren wanneer ze nog een dag langer in de suikeroplossing worden gelaten. Het is ook te begrijpen dat een lang stukje meer tijd noodig heeft om „leeg” te geraken dan een kort en dat de stof in het midden het langst blijft bewaard; de cuticula zal waarschijnlijk ook de aggregatiestof weinig of niet doorlaten.

De hypothese dat een cel niet kan aggregeeren zonder de door de eindklieren afgescheiden „aggregatiestof” geeft dus ook hier een bevredigende verklaring. Het lag nu ver-

der voor de hand, de proef op de som te nemen en te trachten, aan dergelijke „leege” stukjes de onontbeerlijke stof weer toe te voegen.

Werkelijk bleek het mogelijk, met extract uit de eindhokkieren zoowel de tentakelstompen als de losse stukjes weer te laten aggregereen; dit bewijst meteen dat in de laatste proef het uitblijven van aggregatie niet was te wijten aan beschadiging van de cellen door het liggen in suikeroplossing.

Hieronder volgt een beschrijving van die bereiding van het extract, die goede resultaten gaf. Met fijngewreven en geëxtraheerde eindhokkieren heb ik nooit eenig succes gehad.

5. *Bereiden en conserveeren van het extract*

Van een aantal bladen van *D. capensis* werden de eindhokkieren met een schaartje van roestvrij staal afgeknipt, gespoeld, en verzameld in 1—2 ccm leidingwater waarin zij 1—2 dagen bleven. Ook werd wel aqua dest. of een suikeroplossing gebruikt, voor den uitslag bleef dit vrijwel gelijk. Ik veronderstelde dat de afgescheiden stof nu in de omgevende vloeistof zou diffundeeren, in plaats van in de tentakelstelen. Door affiltreeren of afpipetteeren werd de bijna kleurlooze vloeistof van de eindhokkieren gescheiden. Het bleek niet gunstig, de klieren langer dan een of twee dagen in de vloeistof te laten: het extract werd dan rood, wat er op wijst dat de cellen werden beschadigd zoodat de kleurstof er uit diffundeerde. Dikwijls merkte ik op dat een dergelijke vloeistof beschadigend werkte op levende steelcellen, en bovendien was de invloed op de aggregatie gewoonlijk maar heel zwak, waarschijnlijk doordat de werkzame stof werd vernietigd, misschien door microörganismen.

Hieraan schrijf ik ook toe het feit dat een eerst werkzaam extract na eenige dagen onwerkzaam wordt.

Het was dus noodig, naar een middel te zoeken om het

extract te conserveeren wanneer het niet direct werd gebruikt.

Een eenvoudige en afdoende manier bleek te zijn om de vloeistof te laten indrogen, b.v. op een horlogeglasje. Vóór de proef moet het dan weer worden opgelost in een paar druppels water. Ook drenkte ik wel een stukje filtreerpapier in het extract en liet dit drogen.

6. Voorbehandeling van de tentakels

Om tentakels te verkrijgen die met de gewone middelen (b.v. vleesextract) niet meer aggregceeren, die dus, volgens de genoemde hypothese, vrij zijn van aggregatiestof, heb ik verschillende methodes gevolgd, die hier onder zijn vermeld.

Steeds werden van een blad de buitenste 2 (ten hoogste 3) rijen tentakels gebruikt; daar ze veel langer zijn dan diegenen midden op het blad en veel sterker rood gekleurd zijn ze voor deze proeven het geschiktste.

De eerste twee methodes zijn reeds genoemd, de laatste gebruikte ik v.n. voor de proeven beschreven in het IVe hoofdstuk.

a. De tentakels werden tot op korte stompjes na afgeknipt en een smal reepje blad met deze stompen diende als object.

Een nadeel is dat de cellen van den tentakelvoet niet of nauwelijks gekleurd zijn, veel chlorophyl bevatten en door vrij wijde intercellulaire holten zijn gescheiden, waardoor het waarnemen van aggregatie wordt bemoeilijkt.

b. Losse tentakelstukjes, ook wel reepjes blad met tentakels zonder eindklier, werden een paar dagen in water of suikeroplossing gelegd.

Een nadeel is dat de cellen soms beschadigd worden door het liggen in deze vloeistoffen, voordat de „aggregatiestof” geheel verdwenen is.

c. Van een zeer jong, nog niet ontplooid blad ver-

wijderde ik zooveel mogelijk de nog ongekleurde eindklieren zonder dat het blad van de plant werd afgeknipt. Ook wel, b.v. bij *D. rotundifolia*, liet ik slechts een klein stuk van de bladschijf, grenzende aan den steel, over en knipte hiervan de eindklieren weg.

Wanneer het blad zich, na ongeveer een week, geheel had ontplooid was het gewoonlijk niet mogelijk om de tentakels tot aggregereen te brengen. Soms echter trad onder in de tentakels toch aggregatie op, dit werd een paar maal waargenomen aan *D. capensis*-bladen waarvan niet alle eindklieren verwijderd waren.

Deze methode heeft het nadeel dat men uiterst jonge bladen moet nemen, anders krijgt men toch aggregatie. En deze jonge bladen zijn moeilijk te behandelen zoodat men blad en tentakels gemakkelijk beschadigt.

d. Een jong maar volkomen ontplooid blad werd gedurende 4—8 seconden gedompeld in 96 % alcohol, met water afgespoeld en daarna gedurende 2—4 dagen in een onschadelijke, dikwijls ververschte vloeistof gelaten.

Daar het geheele blad met uitzondering van de eindklieren der tentakels een zeer dikke cuticula bezit die de alcohol niet blijkt door te laten, dringt deze alleen door de klieren naar binnen waardoor deze worden gedood. Wanneer men tijdig met water uitspoelt blijven de tentakelstelen levend en verliezen in den loop van eenige dagen het vermogen om te aggregereen.

Een moeilijkheid is dat de alcohol, indien de huidmondjes geopend zijn, hierdoor in de intercellulaire holten dringt en het bladweefsel doet afsterven. Dit kan men echter op een eenvoudige manier voorkomen door de afgeknipte bladen vóór de behandeling een weinig te laten verwelken. De huidmondjes sluiten zich dan en nu kan de behandeling met alcohol plaats hebben zonder gevaar voor het bladweefsel. Een enkele maal heb ik ook zeer jonge bladen aan de plant vast met alcohol behandeld en na ontplooiing voor proeven gebruikt. Het is echter moeilijk zoo'n blaadje

te laten verwelken zonder dat de plant te veel wordt beschadigd (*cd*).

Het is moeilijk om den tijd gedurende welke men de alcohol laat inwerken niet te lang en niet te kort te nemen. Voor verschillende bladen wisselt dit nogal. Soms blijven in een deel van de eindklieren nog een paar cellen levend en dit is voldoende om de bijbehorende tentakelstelen na eenige dagen nog duidelijk te laten aggregereen. Daarom verwijderde ik later van de buitenste tentakels nog de eindklieren.

Bij *b* en *d* is sprake van een onschadelijke vloeistof; het lijkt aangewezen om hiervoor, evenals dat bij andere objecten gebruikelijk is, een t.o.v. het celvocht iets hypotonische suikeroplossing te nemen. In dit geval heeft suiker echter het nadeel dat schimmels en bacteriën er zich voorspoedig in ontwikkelen. Nog afgezien van het feit dat de stofwisselingsprodukten van deze organismen invloed zouden kunnen hebben op de uitkomst van een proef, bemoeilijken zij ook zeer de waarneming van zwakke aggregatie.

In het eerst gebruikte ik een suikeroplossing, later werd om bovengenoemde reden overgegaan tot leidingwater of gedestilleerd water. Maar ook hierin ontwikkelen zich nog wel bacteriën om de tentakels heen. Daarom werd het water iederen dag ververscht en ook verwijderde ik in geval *b* en *d* vóór een proef de eventueel aanwezige microorganismen door het blad onder voortdurend spoelen met water voorzichtig eenige malen tusschen duim en wijsvinger door te trekken. De tentakels zijn hiertegen heel goed bestand, blijkbaar verhindert de dikke en taaie cuticula beschadiging.

Het gewone gedestilleerde water reageerde zwak zuur, het Utrechtsche leidingwater is zwak alkalisch t.o.v. broomthymolblauw dat zijn omslagpunt heeft bij PH 7. Aan deze afwijking van het neutrale punt schrijf ik toe de lichte beschadigingen die soms optraden. Goede resultaten werden verkregen met een mengsel van leiding- en gedestilleerd water in zoo'n verhouding dat de PH ongeveer 7 bedraagt;

deze verhouding werd voor iedere flesch gedest. water opnieuw bepaald.

7. Proeven met extract

Om de werking van een extract aan te toonen werden de vooraf behandelde tentakels op een voorwerpglasje in een druppel van de te onderzoeken vloeistof gelegd. Op een tweede glaasje kwamen tentakels van hetzelfde blad in een druppel van een 1—2 % oplossing van pepsine of Liebig's vleeschextract. In een met waterdamp verzadigde ruimte werden de voorwerpglasjes zonder dekglas er op bewaard. Alle proeven werden, voor zoover niets anders is vermeld, bij kamertemperatuur genomen.

De tabellen IV, V, VI, VII en VIII geven de uitkomst van extractproeven met *D. capensis*. Voor de voorbehandeling der tentakels zie men § 6 onder a, b, c en d.

De werking van eindaklierenextract blijkt hier duidelijk.

TABEL IV
D. capensis

Vloeistof	Aantal stompen	Niet geaggregeerd	Geaggregeerd
Liebig's vl. extr. 1 %	10	9	1 (zeer zwak)
L.'s vl. extr. + eindaklieren	13	3	10

Vóórbehandeling a: temp. 28° C., aggregatie vastgesteld na 24 uur.
Geen extract, de eindaklieren van één blad werden gelegd in de druppel vleeschextract, waarin de stompen lagen.

TABEL V

D. capensis

Vloeistof	Aantal stompen	Aggregatie
L.'s vl. extr. 1 %	14	11 niet, 3 zeer zwak
L.'s vl. extr. + eind- klierenextract	11	1 zeer zwak, 4 duidelijk, 5 sterk, 1 zeer sterk

Vóórbehandeling a; aggregatie na 18 uur. Extract in filtreerpapier opgedroogd.

TABEL VI

D. capensis

Vloeistof	Aantal stukjes	Aggregatie
L.'s vl. extr. 1 %	10	7 niet, 3 in het midden
L.'s vl. extr. + eind- klierenextr.	8	1 niet, 5 duidelijk, 2 sterk

Vóórbehandeling b, 4 dagen. Aggregatie vastgesteld na 20 uur. Extract in filtreerpapier opgedroogd.

TABEL VII

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
pepsine-oplossing	hier en daar, zeer zwak
peps. opl. + eind- klierenextr.	vrij sterk

Vóórbehandeling cd, 3½ dag.
Aggregatie vastgesteld na 18 uur.
Extract versch.

TABEL VIII

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
L.'s vl. extr.	zwak
L.'s vl. extr. + eind- klierenextr.	vrij sterk

Vóórbehandeling b, 2½ dag.
Aggregatie vastgesteld na 20 uur.
Extract van 35 bladen. 1 dag in
water bij 28° C. Vloeistof bij 28° C
gedroogd.

8. Invloed van het extract op de tentakels van andere soorten

Is de „aggregatiestof” specifiek, of is zij dezelfde bij de verschillende soorten van het geslacht *Drosera*?

Daar alleen van *D. capensis* genoeg materiaal aanwezig was om een extract te kunnen maken heb ik mij moeten beperken tot het nagaan van den invloed van dit extract op de tentakels van eenige andere soorten.

Het resultaat van eenige proeven is weergegeven in onderstaande tabellen.

TABEL IX

	<i>D. capensis</i>	<i>D. spathulata</i>
Vloeistof	Aggregatie	Aggregatie
12 % rietsuiker + L.'s vl. extr.	zeer zwak	zeer zwak
12 % riets. + L.'s vl. extr. + eindkl. extr.	duidelijk tot vrij sterk	duidelijk tot vrij sterk

Vóórbehandeling b, 5½ dag. Aggregatie vastgesteld na 24 uur.
Extract versch.

TABEL X
D. rotundifolia

Vloeistof	Aggregatie
pepsine-oplossing	geen
peps. opl. + eindkl. extract	zeer sterk

Vóórbehandeling c, 5 dagen.
Aggregatie vastgesteld na 24 uur
Extract gedroogd.

TABEL XI

	<i>D. capensis</i>	<i>D. rotundifolia</i>
Vloeistof	Aggregatie	Aggregatie
L.'s vl. extr.	zwak	zwak
L.'s vl. extr. + eindkl. extract	zeer sterk	zeer sterk

Vóórbehandeling c, 6 dagen. Aggregatie vastgesteld na 24 uur.
Extract hetzelfde als in tabel X.

TABEL XII

	<i>D. rotundifolia</i>	<i>D. intermedia</i>	<i>D. spathulata</i>	<i>D. binata</i>
Vloeistof	Aggregatie	Aggregatie	Aggregatie	Aggregatie
pepsine-oplossing	geen	geen	geen	geen
peps. opl. + eindkl. extr.	vrij sterk	vrij zwak	vrij sterk	duidelijk

Vóórbehandeling b, 3 dagen. Aggregatie vastgesteld na 24 uur.
Extract hetzelfde als in tabel X en XI.

TABEL XIII

D. anglica

Vloeistof	Aggregatie
1 % pepsine extract + 1 % pepsine	nergens duidelijke aggregatie, v.n. vacuoledeeling

Vóórbehandeling b, 6 dagen.
Extract van 20 bladen, 2 dagen
in water, bij kamertemperatuur
onder verminderden druk gedroogd.

Voor deze proeven bleken de tentakels van *D. intermedia* al heel ongeschikt te zijn.

Ook van *D. binata* is het in tabel XII opgeteekende geval het eenige waarin ik succes heb gehad, bij alle andere proeven bleken de tentakels niet bestand tegen de verschillende voorbehandelingen; ze werden paarsrood, in welken toestand ze niet meer kunnen aggregereen. De resultaten met *D. rotundifolia* en *D. spathulata*, die ik nog meermalen in staat was te bevestigen maken het echter wel zeer waarschijnlijk dat de „aggregatiestof” niet specifiek is. Of ze generiek is, is moeilijk uit te maken. Hiervoor zou men eerst moeten weten of b.v. bij *Drosophyllum* en *Dionaea*, evenals bij *Drosera* een „aggregatiestof” door de klieren wordt gevormd en bovendien zou men een manier moeten vinden om ook hier de organen die de „aggregatiestof” produceeren, uit te schakelen. De twee genoemde geslachten leenen zich echter slecht voor dergelijke proeven; de aggregatie is zeer slecht te zien, in vergelijking met *Drosera* en de klieren zijn bij *Dionaea* veel kleiner en bij beide niet of kort gesteeld. Eenige oriënteerende proefjes gaven geen duidelijke uitkomsten; voor een uitvoerig onderzoek van deze kwestie ontbrak de tijd.

9. *Extracten van bladweefsel zonder tentakelklieren*

De beschreven proeven met eindklierenextract schijnen de theorie van een voor de aggregatie onontbeerlijke en door de eindklieren gevormde stof wel te bevestigen. Toch is juist de rol van de eindklier door deze proeven nog geenszins bewezen. De werkzame stof die het extract bevat kan immers heel goed een produkt zijn van de bij het afknippen der eindklieren verwonde en afstervende cellen in plaats van een stof die ook bij het intakte blad door iedere eindklier wordt geproduceerd. Dat dit zelfs niet onwaarschijnlijk is leeren b.v. de proeven van H. Fitting (1925) met *Vallisneria*. Het bleek hem dat bij ver-

wonding ontstane stoffen in staat zijn om nog in groote verdunning sterke protoplasmastrooming te veroorzaken in intacte Vallisneriacellen.

Nu is protoplasmastrooming een verschijnsel dat ook bij de aggregatie optreedt en dat de eigenlijke aggregatie inleidt. Het leek mij dus noodzakelijk, dit punt op te helderen.

Dadelijk bleek echter al dat een extract van fijn gewreven eindklieren onwerkzaam is. De brei werd met een paar druppels water geëxtraheerd, gefiltreerd en het filtraat ingedroogd.

Nu bleef de mogelijkheid dat niet de doode maar de levende, iets beschadigde cellen die aan de wond grenzen de werkzame stof zouden produceeren, die in dit geval toch een abnormaal produkt zou zijn.

Om dit uit te schakelen werd de werking vergeleken van een extract uit eindklieren en een dat op dezelfde wijze werd bereid uit stukjes bladsteel van 1—2 m.m. lengte. Reeds voorloopige, niet quantitative proeven lieten

TABEL XIV

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
1 % pepsine	zeer zwak tot zwak
eindklieren-extr. 1 %	zwak tot vrij sterk
bladsteel-extract 1 %	zeer zwak tot zwak

Voorbehandeling d, 4 dagen.

Aggreg. vastgesteld na 13 uur.

Extract van 27 bladen en van 27 stelen geheel gedroogd bij 100° C.

De concentratie van de extracten is, door de geringe hoeveelheid, niet nauwkeurig.

zien dat bladsteelextract geen aggregeerende uitwerking heeft. De in tabel XIV opgeteekende quantitatieve proef geeft hetzelfde resultaat.

Hier werden eindaklierenextract en bladsteelextract beide bij 100° gedroogd in vooraf en achterna zeer zorgvuldig gewogen glazen bakjes. Het eindaklierenextract woog gedroogd 3,0 m.g., het bladsteelextract 2,5 m.g. Daarna werden de droge resten opgelost in resp. 6 en 5 druppels gedestilleerd water. 100 druppels hadden een volumen van ruim 5 ccm., de concentratie van de oplossingen was dus omstreeks 1 0/0.

Het is dus niet waarschijnlijk dat de werking van eindaklierenextract berust op bij de verwonding ontstane stoffen. Trouwens, bij proeven met op manier c of d voorbehandelde tentakels werden steeds direct vóór de proef van het blad smalle reepjes met tentakels afgeknipt. Op deze wijze werden natuurlijk veel cellen verwond en toch was de contrôleproef steeds negatief, wanneer de eindaklieren tenminste lang genoeg van te voren waren verwijderd of gedood.

10. *Eigenschappen van het extract*

Uit een vorige § bleek al dat het werkzame agens in de extracten bestand is tegen uitdrogen. Later werd gevonden dat het ook gedurende eenigen tijd een temperatuur van 100° C. verdraagt. Zoo heeft Tab. XIV betrekking op bij 100° tot droog ingedampt extract.

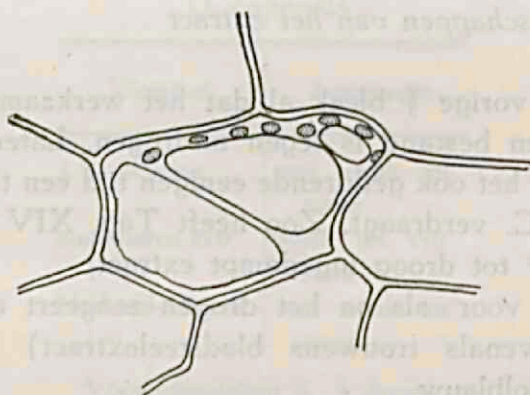
Zoowel voor als na het drogen reageert eindaklierenextract (evenals trouwens bladsteelextract) zuur t.o.v. broomthymolblauw.

HOOFDSTUK III

Aggregatie buiten de tentakels

1. *Aggregatie in de bladen*

Uit de in het vorige hoofdstuk beschreven proeven blijkt de waarschijnlijkheid van het voorkomen van een „aggregatiestof” in de tentakels van *Drosera*. In de tentakelstelen neemt de concentratie van deze stof naar het blad toe af en schijnt aan de basis van de tentakels dikwijls nog maar gering te zijn. Echter niet altijd, en daarom leek het mij niet onmogelijk dat in de bladcellen zelf aggregatie zou kunnen voorkomen.

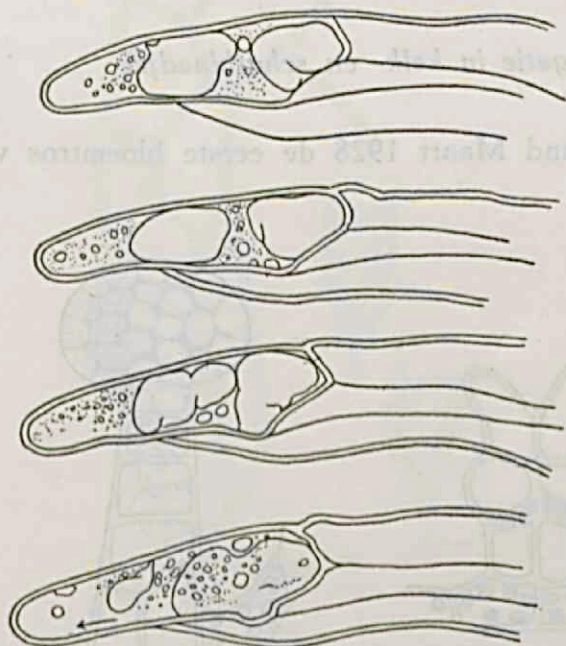


Afbeelding II

Werkelijk gelukt het vrij dikwijls om na sterk prikkelen van een geheel blad, b.v. door onderdompelen gedurende 24 uur in een oplossing van Liebig's vleeschextract zelfs

in epidermiscellen van de onderzijde van het blad eenige aggregatie te zien. De met lucht gevulde intercellulaire holten maken echter het waarnemen vrijwel onmogelijk. Daarom werd het blad vooraf in een reageerbuisje met water ondergedompeld en de lucht zooveel mogelijk verwijderd met behulp van een waterstraalluchtpomp. Nadat op deze wijze de intercellulaire holten met water waren gevuld was het mogelijk de epidermiscellen aan het intacte blad te bekijken.

Op afbeelding II is een geaggregeerde cel te zien uit de epidermis van den onderkant van een blad van *D. capensis*. Dergelijke cellen kwamen in groepjes bij elkaar voor tusschen de niet geaggregeerde cellen en dikwijls



Afbeelding III

lagen deze groepjes juist tegenover de aanhechting van een tentakel aan de andere zijde van het blad.

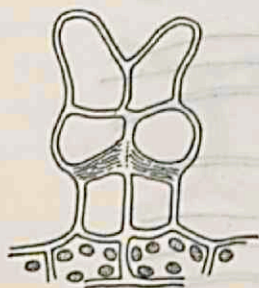
Ook in de meercellige haren die voorkomen bij *D. ca-*

pensis, *D. spathulata* en in minder aantal bij de inlandsche soorten kan men, voor zoover ze levend zijn, soms aggregatie opwekken door sterk prikkelen van een blad. Deze haren zijn gewoonlijk tot dicht bij den top 2 cellen breed en de aanhechting is zoo, dat de verbindingslijn van deze 2 cellen loodrecht staat op de lengterichting van het blad. Op dezelfde wijze zijn de later te bespreken groote en kleine papillen aangehecht. Het aantal cellen in de lengte is zeer verschillend. Het celvocht in deze haren is bij *D. spathulata* soms rose, bij de rest kleurloos en de cuticula is nog dikker dan die van de tentakels.

Op afbeelding III ziet men de geaggregeerde eindcel van een haar van *D. capensis* geteekend in vier opeenvolgende stadia.

2. Aggregatie in kelk- en schutblaadjes

Toen eind Maart 1928 de eerste bloemtros verscheen



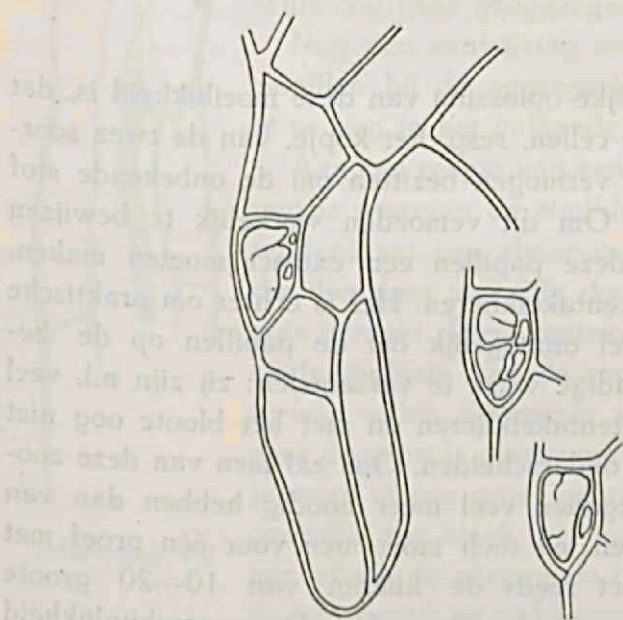
Afbeelding IV



Afbeelding V

aan een van de planten van *D. capensis* bekeek ik ook de aanhangsels van een kelkblad. Deze zijn er in 3 soorten, n.l. 1e de boven voor het blad beschreven haren maar korter en steeds levend, 2e kleine, uit weinig cellen bestaande papillen waarvan de steel 2 cellen breed is (afbeelding IV), 3e grootere papillen met alweer een steel, die 2 cellen breed is en een kopje bestaande uit veel kleine cellen met gelen inhoud. De geheele vorm lijkt veel op een paddestoel (afbeelding V). De smalle schutblaadjes hebben dezelfde aanhangsels.

Trouwens, de papillen komen ook, met kleine wijzigingen



Afbeelding VI

voor op de gewone bladen. Wat de overige soorten betreft komt de grootste soort papillen alleen bij *D. spathulata* voor, de kleine papillen zijn in iets gewijzigden vorm ook bij de vijf andere soorten te vinden

Daar de kelkbladen geen tentakels dragen was te verwachten dat de daarop voorkomende haren, in tegenstel-

ling met die op de bladen, niet zouden kunnen aggregeren. Tot mijn verwondering zijn ze echter gemakkelijk tot aggregatie te brengen (afbeelding VI), en wel is de aggregatie hier altijd verreweg het sterkste aan den voet van de haren. Ook de bladcellen zelf zijn dikwijls geaggregeerd.

Hoe is dit te rijmen met de opvatting van een door de tentakelklieren afgescheiden „aggregatiestof”? Het is immers wel uitgesloten dat deze stof van de tentakels tot in de kelkbladen zou worden getransporteerd.

3. *De rol van de papillen op de kelkbladen en andere groene deelen*

De vermoedelijke oplossing van deze moeilijkheid is, dat ook de bovenste cellen, resp. het kopje, van de twee soorten papillen het vermogen bezitten om de onbekende stof af te scheiden. Om dit vermoeden werkelijk te bewijzen zou men van deze papillen een extract moeten maken, evenals van de tentakelklieren. Het is echter om praktische redenen geheel onmogelijk om de papillen op de beschreven eenvoudige wijze te verzamelen; zij zijn n.l. veel kleiner dan de tentakelklieren en met het bloote oog niet goed genoeg te onderscheiden. Ook zal men van deze zoo veel kleinere organen veel meer nodig hebben dan van de tentakelklieren, en toch moet men voor één proef met eindklierenextract reeds de klieren van 10—20 groote bladen van *D. capensis* verzamelen. De waarschijnlijkheid van de boven geuite veronderstelling valt echter m.i. niet te ontkennen. De steelcellen van de papillen vertoonen n.l. wanneer ze geprikkeld zijn aggregatie. Zonder opzettelijk te zijn geprikkeld zijn trouwens bij een deel van de papillen de steeltjes, zij het ook zwakker, geaggregeerd. De oorzaak hiervan weet ik niet maar iets dergelijks vinden wij bij de tentakels van het *Drosera* blad; vele hiervan vertoonen ook in niet (opzettelijk) geprikkelden toestand

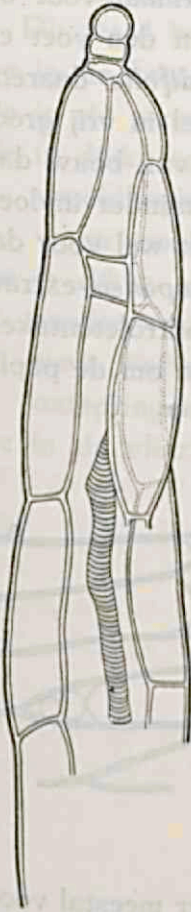
aggregatie in de bovenste steelcellen, waarop reeds door Darwin wordt gewezen ¹⁾).

De verschillende papillen op het loofblad blijken ook niet geheel zonder invloed op de aggregatie te zijn, hoewel dit hier minder duidelijk is door de zooveel sterkere werking van de eindaklieren.

Bij het bekijken van de aggregatie in de epidermis van een blad zag ik b.v. behalve de reeds genoemde groepjes van geaggregeerde cellen in verband met de tentakelbases, ook om de papillen heen dikwijls een paar geaggregeerde cellen.

Nog een aanwijzing over de rol die de papillen bij de aggregatie kunnen spelen is te zien in het volgende geval:

Aan een reepje van een blad van *D. capensis* waarvan de eindaklieren waren verwijderd zat een abnormaal korte tentakel die daardoor toevallig door de schaar niet was geraakt. Deze tentakel droeg aan het einde inplaats van de gewone klier een uit weinig cellen bestaande papil, zooals die over de geheele plant voorkomen. Dit stukje werd in een proef gebruikt als pepsinecontrole; het bleek niet meer te aggregeren, alleen de abnormale tentakel vertoonde aggregatie en wel bovenaan het sterkst.



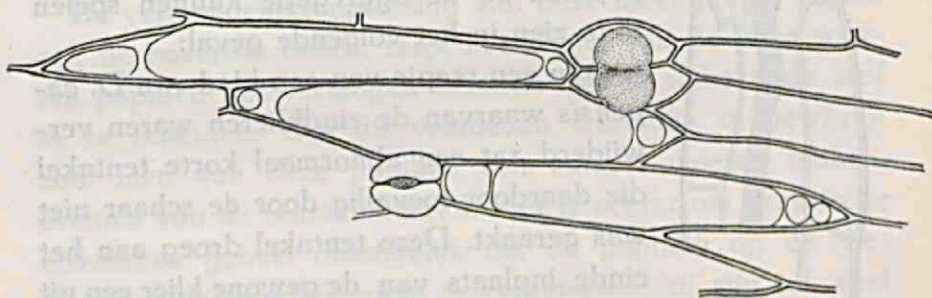
Afbeelding VII

¹⁾ Hij schrijft op blz. 46: „In old leaves, however, especially in those which have been several times in action, the protoplasm in the uppermost cells of the pedicels remains in a permanent more or less aggregated condition”.

Ik zag het verschijnsel echter zoowel in oude als jonge bladen, in de laatste zeker niet minder sterk, en zelfs als ze nog nauwelijks ontplooid waren en volkomen ongeprikkeld. Ik kreeg den indruk alsof het verschijnsel vooral in voorjaar en zomer sterk was, hoewel er ook in andere jaargetijden soms geen enkel ongeaggregeerd blad was te vinden.

In de afbeelding van deze abnormale tentakel (VII) is de inhoud van de cellen niet weergegeven.

De weinigcellige papillen komen ook normaal voor op de tentakelstelen. Bij *D. capensis* alleen aan den voet en spaarzaam, bij *D. spathulata* en *D. rotundifolia* daarentegen over de geheele lengte van de tentakel in vrij groot aantal. Ze zijn hier kleiner en eenvoudiger van bouw dan op het blad of op de kelk en schijnen ook minder invloed op de aggregatie te hebben. Toch kwam het wel voor dat bij mijn proeven over den invloed van *D. capensis*-extract op *D. rotundifolia* of *D. spathulata* de contrôletentakels alleen aggregatie vertoonden in enkele cellen om de papillen heen. Dit is te zien op afbeelding VIII.



Afbeelding VIII

Het is een van de redenen waarom ik later meestal voorbehandeling *d* toepaste, de kleine papillen hebben ook een vrij dunne cuticula en worden door den alcohol dikwijls gedood.

4. Aggregatie in deelen van de plant zonder tentakels of papillen

In deelen van de plant die geen papillen of tentakels dragen heb ik nooit door middel van pepsine of vleesch-extract aggregatie kunnen opwekken. De resultaten met eendklierenextract waren niet duidelijk, zoodat in het mid-

den moet worden gelaten of deze deelen van de plant niet aggregceeren kunnen door gebrek aan „aggregatiestof” of door een andere oorzaak.

Dit werd beproefd bij *D. capensis*:

- 1e in de kroonbladen,
- 2e in de stempels,
- 3e in dikke oppervlakkige sneden van den wand van het vruchtbeginsel (hier zijn de z.g. rhabdoïden buitengewoon mooi te zien),
- 4e in dikke overlansche doorsneden en oppervlakkige sneden van wortels. Gebruikt werden de roode adventieve wortels, die in het voorjaar veel uit den stengel ontspringen, voordat zij in de turf waren gedrongen,
- 5e in de vliezige steunbladen van zeer jonge bladen.

HOOFDSTUK IV

Stoffen met de zelfde werking als het extract uit de eindklieren

Het is natuurlijk van belang, te weten te komen aan welke stof (of welke stoffen) het eindklierenextract zijn eigenaardige werking heeft te danken.

Een analyse van het extract leek mij echter voorloopig vrijwel onmogelijk daar enkele milligrammen droge stof wel het meeste is wat men uit 20—30 groote bladen van *D. capensis* krijgt. Ik heb deze analyse dan ook niet beproefd en kan dus niets naders mededeelen omtrent het werkzame agens.

Wel bleek het dat er nog andere vloeistoffen zijn die dezelfde werking hebben als eindklierenextract, in de eerste plaats speeksel.

1. *Proeven met speeksel*

Wanneer men *Drosera*-tentakels op een van de in het 2e hoofdstuk § 6 genoemde manieren heeft behandeld kan men ze, als de bewerking tenminste lang genoeg heeft geduurd, met pepsineoplossing niet meer tot aggregereen brengen. Wel gelukt dit met speeksel, tabel XV geeft hiervan een voorbeeld.

(Zie ook § 5 tab. XVIII en § 7 tab. XXI, XXII).

Het speeksel werd steeds rauw gefiltreerd.

Hieruit blijkt dat speeksel een stof bevat die in staat is om in de tentakelstelen de door de eindklier afgescheiden

stof te vervangen. Daar speeksel echter een gecompliceerd mengsel is van organische en anorganische stoffen, is het ook hier moeilijk te zeggen, aan welke verbinding de aggregerende werking moet worden toegeschreven.

TABEL XV

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
1 % pepsine + extract = 1 : 1	duidelijk in de meeste tentakels
1 % pepsine + speeksel = 1 : 1	duidelijk tot vrij sterk
1 % pepsine	zeer zwak

Vóórbehandeling b, 2 dagen.

Aggreg. vastgesteld na 20 uur.

Extract van 14 bladen, 2 dagen in
water, daarna filtraat bij kamer-
temp. onder verminderden druk ge-
droogd.

In speeksel komen, behalve een aantal anorganische zouten, waarover later, aan organische bestanddeelen o.a. voor: eiwit, mucine, ptyaline, oxydase, KCNS.

Uit het feit dat ook gekookt speeksel werkzaam is, en niet veel minder dan rauw (zie § 5 tab. XVIII en 7 tab. XXI) blijkt wel dat men hier met geen enzymwerking heeft te doen. Evenals mej. Seubert kookte ik het speeksel minstens 15 minuten en filtreerde het daarna af om zeker te zijn dat het enzym was vernietigd.

Verschillende proeven werden gedaan met oplossingen van KCNS, echter alle met negatief resultaat.

Om het eiwit uit te schakelen werd speeksel op de volgende manier behandeld:

Eenige ccM. werden rauw gefiltreerd, gekookt en op een waterbad tot droog ingedampt.

De droge rest werd eenige malen uitgetrokken met 96% alcohol, waarbij voor het oog niets in oplossing ging. Tot droog ingedampt gaf de heldere vloeistof toch een kleine rest (alcohol alleen gaf dit niet) die onder het microscoop kristallijn bleek te zijn.

Wanneer ik het in alcohol oplosbare en het hierin onoplosbare deel van het speeksel in een paar druppels water opnam en in deze oplossingen stukjes *Droserablade* legde die vooraf op de bekende wijze waren behandeld, vond ik dat ook in het alcoholische extract de aggregatie toename (zie tabel XVI). Het alcoholische extract was natuurlijk vrij van eiwit, het is dus onwaarschijnlijk dat het eiwit uit het speeksel de gezochte stof is.

TABEL XVI

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
pepsine-oplossing 1½ %	vrij duidelijk
alc. extract van gedroogd speeksel	vrij sterk
in alc. onoplosb. gedeelte van ge- droogd speeksel	sterk

Vóórbehandeling d, 3 dagen.

Aggreg. vastgesteld na 18 uur.

Op de vraag waaraan de aggregeerende eigenschap van speeksel dan wel is toe te schrijven kom ik later terug.

3. *Diastase, trypsine, groeistof*

Hoewel de proeven met gekookt en met bij 100° gedroogd speeksel wel doen zien dat ook na vernietiging van de enzymen de aggregeerende werking blijft, werden

toch een paar proeven gedaan met enzympreparaten en wel met diastase en trypsine.

Er zijn n.l. in dit geheele aggregatieproces feiten, die wijzen op eenige analogie met de v.n. bij haverkiemplantjes in de laatste jaren zooveel bestudeerde „groeistof” (F. W. Went, 1927). Hier zoowel als daar vormt het uiteinde van een bepaald orgaan een stof die basipetaal diffundeert en hier veranderingen te weeg brengt. Beide stoffen zijn te verkrijgen uit de levende uiteinden der organen en niet door fijnwrijven en extraheeren van deze weefselstukken. Zij zijn bestand tegen verwarming op 100° C. en verdwijnen na een paar dagen uit een oplossing, waarschijnlijk door de werking van microörganismen.

Hier komt nu bij dat speeksel zoowel de groeistof als de „aggregatiestof” tot op zekere hoogte kan vervangen.

TABEL XVII

D. capensis 2 bladen

Vloeistof	Aggregatie
1 % pepsine	geen
pepsine + groeistof	zeer zwak tot duidelijk

Vóórbehandeling d, 4 dagen.

Aggreg. vastgesteld na 10 uur.

De groeistof was verkregen door 15 topjes van mais-coleoptilen gedurende 2½ uur op agar-agar te zetten. Op het plakje agar werden een paar druppels van de peps.-opl. gedaan.

Het bleek nu dat trypsine werkelijk aggregerende werking bezit. Gebruikt werd de z.g. pankreatine Rhenania, in water opgelost en daarna gefiltreerd. De gebruikte diastase (Takadiastase) had ook eenigen invloed, hoewel niet altijd. (Zie § 10 tabel XXVII, XXVIII, XXIX).

Dat de diastase in de proef van tab. XXVIII geen aggregatie veroorzaakte en in die van tab. XXVII wel, kan misschien komen door het verschil in concentratie. Zeker is dit echter niet, de proeven zijn niet vergelijkbaar daar ze niet met hetzelfde blad werden uitgevoerd.

Ook met groeistof uit maistopjes had ik eenig resultaat (tab. XVII). De toppen van de kiemplantjes werden op de gewone wijze (F. W. W e n t, 1927) op een plakje agar-agar gezet. Na 2 uur werden zij er af gehaald en een druppel water op de agar gedaan, waarin de tentakels kwamen.

4. *Pepsine, vleeschextract*

Pepsine geeft altijd indien de bladen vooraf lang genoeg zijn behandeld ¹⁾ negatieve resultaten.

Van no. 1 en 2 van de drie gebruikte preparaten was reeds vroeger gebleken bij proeven in dit laboratorium verricht, dat ze een sterke groeiversnellende werking uitoefenden op gedecapiteerde *Avena-coleoptielen*. Op voorbehandelde *Drosera*-tentakels had echter geen van de drie eenigen invloed.

Ook Liebig's vleeschextract veroorzaakt in de gebruikte concentraties ($2\frac{1}{2}\%$) geen aggregatie in „leege” tentakels.

Voor contrôleproeven en ook om normale tentakels te laten aggregeren werden altijd oplossingen van deze twee stoffen gebezigd. Beide hebben het voordeel dat ze uiterst snel aggregatie veroorzaken; Å k e r m a n werkte om deze reden eveneens met pepsine.

Een nadeel van beide is echter dat de oplossingen zeer snel bederven waarbij, waarschijnlijk door de ontwikkeling van ammoniak, de cellen beschadigd worden. Een ander

¹⁾ Dit „lang genoeg” is voor alle bladen niet gelijk. Door vergelijking van de diverse in dit hoofdstuk afgedrukte tabellen is te zien dat een negatieve contrôle niet altijd samengaat met lange voorbehandeling, evenmin als geaggregeerde contrôletentakels met een korte.

bezwaar is dat men werkt met onzuivere stoffen of stoffmengsels van onbekende samenstelling. Daarom leek het mij gewenscht een stof te zoeken die 1e snel aggregatie veroorzaakt, 2e in oplossing niet snel aan bederf onderhevig is, 3e die in zuiveren toestand is te verkrijgen.

Å k e r m a n heeft den invloed van zeer veel verbindingen nagegaan op aggregatie en granulatie. Hij noemt in dit verband ook phosphorzuur en verschillende orthophosphaten. Alle veroorzaken matig sterke aggregatie en de secundaire, in oplossing alkalisch reageerende phosphaten bovendien eenig neerslag. K- (of Na-) monophosphaat scheen nu de aangewezen stof om pepsine en vleeschextract in mijn proeven te vervangen, daar het door omkristalliseeren gemakkelijk is te zuiveren.

5. Orthophosphaten

Werkelijk veroorzaakt een oplossing van $\frac{1}{2}\%$ KH_2PO_4

TABEL XVIII

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
1 % pepsine + speeksel = 1 : 1	vrij zwak
1 % peps. + ge- kookt speeksel = 1 : 1	vrij zwak
1 % KH_2PO_4	duidelijk, vooral volumentoename
1 % KH_2PO_4 + speeksel = 1 : 1	duidelijk, vooral volumentoename
1 % pepsine	geen

Vóórbehandeling b, 4 dagen.

Aggregatie vastgesteld na 11 uur.

vrij sterke aggregatie in een normale, niet geaggregeerde

tentakel. Wanneer de oplossing echter werd gebruikt voor de contrôletentakels in proeven met extract of speeksel dan viel deze contrôleproef nooit negatief uit. Hoe lang de tentakels ook vooraf werden behandeld, steeds aggregaerden ze nog vrij sterk met een fosphaatoplossing, ook wanneer andere tentakels van hetzelfde blad in een pepsine-oplossing ongeaggregeerd bleven, dit is b.v. in tab. XVIII te zien.

Hieruit moet men concluderen dat het gebruikte zout een verbinding is, of een verbinding bevat, die op dezelfde wijze werkt als eindaklierenextract en speeksel.

Om het laatste geval, n.l. dat het zout verontreinigd zou zijn, uit te schakelen werd het van de Onderl. Pharmac. Groothandel te Utrecht betrokken fosfaat herhaalde malen door omkristalliseeren uit gedestilleerd water of uit 96 0/0 alcohol gezuiverd. Zelfs na $2 \times$ uit water en $2 \times$ uit alcohol omkristalliseeren was de aggregerende werking echter nog even sterk.

Blijkbaar is dus de aggregerende werking wel degelijk te wijten aan het zout zelf. (Zie ook § 7, tabel XXI en XXII).

K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 en Na_2HPO_4 bezitten dezelfde aggregerende eigenschap. Van neerslag (granulatie) had ik met de secundaire phosphaten niet veel last als ik oplossingen van 1/2 0/0 of minder gebruikte.

6. *Meta- en pyrophosphaten*

In aansluiting aan de proeven met orthophosphaten werd den invloed nagegaan van kaliummetaphosphaat (KPO_3) en kaliumpyrophosphaat ($K_4P_2O_7$).

Zooals uit de tabellen is te zien veroorzaakt alleen het laatste een geringe aggregatie.

Het is de vraag of de geringe werking van het pyrophosphaat misschien is toe te schrijven aan verontreiniging met sporen orthophosphaat. Helaas ontbrak de tijd om

het uit den handel afkomstige zout aan een verdere zuivering te onderwerpen.

TABEL XIX

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
0,5 % pepsine	zeer zwak tot zwak
0,25 % KH_2PO_4	sterk tot zeer sterk
0,25 % $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$	vrij zwak tot duidelijk
verz. opl. KPO_3	zeer zwak

Vóórbehandeling d, 3 dagen.

Aggr. vastgesteld na 10 uur.

TABEL XX

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
0,5 % pepsine	zeer zwak, hier en daar
0,25 % KH_2PO_4	vrij sterk tot zeer sterk
0,25 % $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$	verspreid, zwak
verz. opl. KPO_3	zeer zwak of geen

Vóórbehandeling d, 5 dagen.

Aggr. vastgesteld na 9 uur.

In ieder geval is het duidelijk dat de aggregeerende werking van de orthophosphaten is toe te schrijven aan de anionen. Dit blijkt bovendien wel uit de sterk aggregeerende eigenschappen van NaH_2PO_4 en Na_2HPO_4 .

7. De waterstofionenconcentratie

In de inleiding werd de volgende voorstelling van het aggregatieproces als de heerschende opvatting gegeven:

Het protoplasma vergroot zich door het opnemen van vloeistof uit de vacuole. Bovendien verdeelt de sterke protoplasmastrooming de eene vacuole in vele kleinere.

Å k e r m a n legt er den nadruk op dat alleen het eerste verschijnsel karakteristiek is voor het aggregatieproces; verdeeling van de vacuole komt ook bij andere objecten onder verschillende omstandigheden voor.

Deze vergrooing van het protoplasma werd reeds door Schimper zoo opgevat, dat „das Protoplasma grössere Imbibitionsfähigkeit erlangt und dem Zellsafte Wasser entzieht.“

Het ligt nu voor de hand, te meenen dat de invloed van allerlei stoffen op de aggregatie berust op een verandering van het zwellingsvermogen van het protoplasma. Daar bekend is dat H-ionen de zwelling van colloïden bevorderen zou het zeer wel mogelijk kunnen zijn dat de aggregeerende werking van het zure fosphaat op voorbehandelde tentakels berustte op een verandering van de H-ionenconcentratie in het protoplasma. Hiermede is in overeenstemming dat ook het eindaklierenextract zuur reageert. Speeksel echter is, tenminste nadat het korten tijd aan de lucht is blootgesteld geweest, zwak alkalisch, en ook K_2HPO_4 dat alkalisch reageert, veroorzaakt aggregatie. Doch dit behoeft nog geen beletsel te zijn voor de boven ontwikkelde voorstelling, daar ook van de OH-ionen bekend is dat ze de zwelling van gelen bevorderen. Erger is dat ook oplossingen van het pepsinepreparaat no. 1 en 2 zuur reageerden (het derde reageerde alkalisch), de PH wisselde, al naar de sterkte van de gebruikte oplossing tusschen 4,6 en 6,5. Ook bij het staan veranderde de PH eenigszins, lang voordat de pepsine bedorven was en schadelijk voor de cellen. Daar over het algemeen de zwelling een minimum vertoont bij PH 7 komt dit dus niet uit.

Toch is het nog altijd best mogelijk dat het protoplasma een zwellingsminimum vertoont bij een PH van de *buiten-vloeistof* die niet precies 7 is. De PH van de vloeistof buiten de cellen zegt ons immers niets omtrent de PH in het protoplasma zelf. Ik deed daarom eenige proeven met mengsels van speeksel en fosphaatoplossingen van de zelfde PH als de pepsine-oplossing die als *contrôlevloeistof* werd gebezigd. Voor het meten van de PH werd gebruik gemaakt van een z.g. Doppelkeil-Kolorimeter volgens Bjerrum-Arrhenius.

Van eenige c.c.m. speeksel werd de PH bepaald. Daarna liet ik er zooveel van een KH_2PO_4 oplossing bijvloeien tot de PH dezelfde was geworden als van de pepsine-oplossing die voor de *contrôleproef* zou worden gebruikt.

Dan werd het zelfde mengsel, maar zonder indicator, voor de proef gereed gemaakt.

In onderstaande tabellen is de sterkte van de pepsine-oplossing niet opgegeven; ze wisselde tusschen $1\frac{1}{2}\%$ en $\frac{1}{2}\%$. Het maken van nauwkeurige 1 of 2% oplossingen heeft geen zin daar de samenstelling toch onbekend is en

TABEL XXI

D. spathulata

Vloeistof	p. H.	Aggregatie
gekookte pepsine-oplossing	6.9	geen
gek. speeksel + 2% $\text{KH}_2\text{PO}_4 =$ 12 : 5	6.9	sterk
gekookt speeksel		vrij sterk
2% KH_2PO_4		sterk

Vóórbehandeling d, 4 dagen.

Aggregatie vastgesteld na 13 uur.

TABEL XXII

D. spathulata

Vloeistof	p. H.	Aggregatie blad 1	Aggregatie blad 2
pepsine	5.1	geen	geen
KH_2PO_4 2%	3.4	duidelijk, vooral vacuoledeeling	vrij sterk
gekookt en gefiltreerd speeksel		vrij zwak	sterk
speeksel + KH_2PO_4 = 5 : 4	5.1	duidelijk	zeer sterk

Vóórbehandeling d, 3 dagen.

Aggreg. na 17 uur vastgesteld.

het percentage ook door eventueel koken en affiltreren wordt veranderd. Van belang is hier alleen de PH.

Een mengsel van fosphaat en speeksel doet de ten-

takels dus wel aggregeren, een pepsine-oplossing die dezelfde PH heeft niet. Hiermede is aangetoond dat de negatieve resultaten met pepsine-oplossingen niet kunnen berusten op de PH van deze vloeistoffen.

Dit blijkt trouwens nog wel uit andere feiten.

8. *De PH van leiding- en van gedestilleerd water*

Zooals reeds werd gezegd reageert het Utrechtsche leidingwater alkalisch, de PH is na 10 min. doorstroomen gewoonlijk omstreeks 8,4.

Later werd voor het bewaren der bladen of tentakels meestal gedestilleerd water gebruikt, waarvan de PH iederen keer dat er werd gedestilleerd weer iets anders was, maar altijd aan den zuren kant. O.a. werd gevonden een PH van 4,7.

Alkalisch was daarentegen het 2 $\times$ gedestilleerde water (den 2^{en} keer van glas in glas), de PH was omstreeks 8,7. Of dit werd veroorzaakt doordat het glas sporen alkali afgaf, of door het feit dat het water door een er voor geschakeld waschfleschje met loog zooveel mogelijk CO₂-vrij werd afgeheveld, laat ik in het midden.

Geen van deze drie soorten water was echter in staat aggregatie te veroorzaken. Wanneer ik de tentakels die een paar dagen in water hadden gelegen voor het begin van een proef bekeek, waren zij nooit geaggregeerd, ook niet wanneer later bleek dat de controleproef met pepsine alleen wel was geaggregeerd.

9. *De P_H der extracten*

Extract uit bladsteelweefsel reageert zwak zuur, evenals het eindaklierenextract; toch werkt het eerste niet, het tweede wel aggregerend.

Uit al deze feiten blijkt m.i. voldoende dat de werking van eindaklierenextract en van de andere genoemde vloeistoffen

stoffen niet berust op een verandering van de PH van het protoplasma, waardoor de zwelling hiervan zou worden bevorderd.

10. Amino-zuren en andere organische N-verbindingen

De proeven die in deze en in de volgende §§ zullen worden beschreven dragen voor een deel een voorloopig en oriënteerend karakter. Daar zij werden genomen op een tijdstip waarop het praktische deel van dit onderzoek eigenlijk reeds afgesloten had moeten zijn, ontbrak de tijd om een deel van de voorloopige proeven nauwkeuriger quantitatief over te doen. Waar dit wel meermalen gebeurde werden steeds weer dezelfde resultaten verkregen; dit is de reden waarom zij toch voor een deel zullen worden beschreven. Glycocol, alanine, leucine, asparagine-zuur, asparagine en tyrosine werden beproefd op hun aggregerende eigenschappen. Van andere organische N-verbindingen werden beproefd ureum, guanine, hippuursuur, kreatine en aethylurethaan. Hieronder volgen eenige tabellen.

TABEL XXIII

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
pepsine-oplossing	geen
asparagine, verzadigd	sterk
leucine 1 %	zwak
aethylurethaan 1 %	geen
ureum, slappe opl. (onbekende concentratie)	geen

Vóórbehandeling d, 3 dagen.
Aggreg. vastgesteld na 23 uur.

TABEL XXIV

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
pepsine 1 %	vrij duidelijk
leucine $\frac{1}{25}$ n.	sterk
glycocol $\frac{1}{25}$ n.	sterk

Vóórbehandeling d, 5 dagen.
Aggreg. vastgesteld na 17 uur.

TABEL XXV

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
pepsine 1 %	vrij duidelijk
leucine $\frac{1}{125}$ n.	sterk
tyrosine $\frac{1}{125}$ n.	ongelijkmatig, zwak tot duidelijk
Vóórbehandeling d, 3 dagen. Aggreg. vastgesteld na 21 uur.	

TABEL XXVI

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
pepsine 1 %	geen
asparagine $\frac{1}{4}$ n =	
$\frac{1}{3}$ %	vrij sterk
hippuurzuur verza- digd	dood
tyrosine, verzadigd	geen
ureum, slappe opl. (onbekende con- centratie)	hier en daar, zwak
asparaginezuur, slap- pe opl. (onbekende concentratie)	sterk
Vóórbehandeling d, $3\frac{1}{2}$ dag. Aggreg. vastgesteld na 17 uur.	

TABEL XXVII

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
pepsine-oplossing	geen
Takadiastase 1 %	duidelijk
hippuurzuur, verza- digd	dood
kreatine, verzadigd	geen
guanine, verzadigd	geen

Vóórbehandeling d, 4 dagen.
Aggreg. vastgesteld na 13 uur.

TABEL XXVIII

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
pepsine 1 %	geen
asparagine, verza- digd	vrij sterk
tyrosine, verzadigd	geen
kreatine, verzadigd	geen
ureum $\frac{1}{2}$ %	geen
Takadiastase $\frac{1}{2}$ %	geen

Vóórbehandeling c. Aggregatie
vastgesteld na 23 uur. Dezelfde
proef met dezelfde uitkomst her-
haald met 2 andere bladen.

Hierbij vóórbehandeling b, ag-
gregatie bekeken na 6 uur en tem-
peratuur 35° C.

TABEL XXIX

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
pepsine $\frac{1}{3} \%$	zwak, vooral vacuoledeeling
trypsine (Rhenania) $\frac{1}{4} \%$	vrij sterk
asparagine, verzadigd	zeer sterk

Vóórbehandeling d, 4 dagen.

Aggreg. vastgesteld na 20 uur.

Van de onderzochte verbindingen werken asparagine en asparaginezuur wel het sterkst. Met asparagine-oplossingen van verschillende sterkte werden een paar proeven gedaan met het doel om de kleinste concentratie, die nog juist aggregeerend werkt, te weten te komen. De volgende tabel geeft de uitkomst van zulk een proef weer (XXX).

De drempel ligt dus voor asparagine tusschen $\frac{1}{8 \times 11^2}$ N en $\frac{1}{8 \times 11^3}$ N en waarschijnlijk dichterbij de eerste concentratie. Globaal kan men rekenen dat de grens ligt bij 0,08 ‰.

Voor leucine ligt de drempel bij ongeveer $\frac{4}{27} \%$ = 0,15 ‰.

Hoewel dit niet veel hoger is dan voor asparagine, is de aggregatie die men met leucine verkrijgt toch steeds duidelijk zwakker dan met asparagine.

Ook glyocol, alanine en asparaginezuur hebben aggregerenden invloed; verdere quantitative proeven werden hiermede niet genomen.

Kreatine, tyrosine en ureum gaven nooit andere dan twijfelachtige of geheel negatieve resultaten.

Guanine en aethylurethaan hebben geen invloed.

Hippuurzuur is de eenige organische N-verbinding, be-

halve de echte aminozuren, waarmede ik aggregatie heb verkregen. De tentakels sterven er echter vrij snel in af; dit is misschien te wijten aan de tamelijk zure reactie (een verzadigde oplossing in leidingwater had een PH van omstreeks 4). Een reepje van hetzelfde blad waarvan tentakels gebruikt waren voor de proef van tabel XXVII

TABEL XXX

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
asparagine $\frac{1}{8}$ n.	sterk tot aan de basis
asparagine $\frac{1}{8 \times 11}$ n.	duidelijk tot vrij sterk
asparagine $\frac{1}{8 \times 11^2}$ n.	zwak, ook direct onder de sneevlakte
asparagine $\frac{1}{8 \times 11^3}$ n.	geen
asparagine $\frac{1}{8 \times 11^4}$ n.	geen
pepsine-oplossing	zwak in het midden der tentakels, niet direct bij de sneevlakte

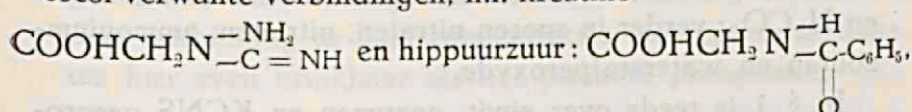
Voorbehandeling d. $2\frac{1}{2}$ dag.

Aggreg. vastgesteld na 15 uur.

vertoonde $3\frac{1}{2}$ uur nadat het in een verzadigde oplossing van hippuurzuur was gelegd reeds veel cellen of zelfs geheele tentakels die waren afgestorven; de levende cellen waren echter reeds vrij duidelijk geaggregeerd. Hieruit blijkt dat deze verbinding toch aggregerende werking bezit en, gezien den korten tijd, niet eens zeer weinig.

Het is eigenaardig, dat van de beide gebruikte met gly-

cocol verwante verbindingen, n.l. kreatine:



de eerste geen aggregatie veroorzaakt en de tweede, evenals glycol zelf, wel. Dat de aggregatie niet afhangt van

TABEL XXXI

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
pepsine-oplossing	zeer zwak
leucine $\frac{4}{243} \text{ } 0/00$	geen
leucine $\frac{4}{81} \text{ } 0/00$	geen
leucine $\frac{4}{27} \text{ } 0/00$	zeer zwak
leucine $\frac{4}{9} \text{ } 0/00$	zeer zwak tot zwak
leucine $\frac{4}{3} \text{ } 0/00$	vrij duidelijk tot duidelijk

Vóórbehandeling d, 3 dagen.

Aggreg. vastgesteld na 18 uur.

het aanwezig zijn van een NH_2 -groep blijkt hieruit, immers kreatine bevat een NH_2 -groep, hippuurzuur niet. Misschien komt het verschillend gedrag der beide verbindingen daaruit voort dat in hippuurzuur slechts één H-atoom van de NH_2 -groep is gesubstitueerd door een andere groep, bij kreatine daarentegen beide H-atomen.

11. De werkzame verbinding in speeksel

In het „Handbuch der norm. und pathol. Physiologie“ van Bethe, v. Bergmann, Emden en Ellinger worden, behalve eiwitten, enzymen en KCNS de volgende stoffen genoemd die in speeksel zijn aangetoond:

K-, Na-, Ca- en Mg-zouten van H_2SO_4 , H_3PO_4 , HCl en H_2CO_3 ; verder in sporen nitraten, nitrieten, ammoniumzouten en waterstofperoxyde.

In § 1 is reeds over eiwit, enzymen en KCNS gesproken. Het is nu de vraag of de anorganische zouten misschien verantwoordelijk zijn voor de aggregerende werking.

Een proef met Mg SO_4 , Na Cl en Na HCO_3 viel negatief uit.

TABEL XXXII

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
$\frac{1}{2} \text{‰ Mg SO}_4 +$ 1‰ pepsine	plaatselijk zeer zwak
$\frac{1}{2} \text{‰ Na Cl} + 1 \text{‰}$ pepsine	plaatselijk zeer zwak
$\frac{1}{2} \text{‰ Na HCO}_3 +$ 1‰ pepsine	plaatselijk zeer zwak
1‰ pepsine	plaatselijk zeer zwak

Vóórbehandeling d, 6 dagen.

Aggreg. vastgesteld na $12\frac{1}{2}$ uur.

Ook Ca Cl_2 bleek geen aggregatie te veroorzaken.

Bij plasmolyseproeven met KNO_3 was van aggregerende werking nooit iets gebleken. Er blijven dus over de phosphorzuren zouten waarvan de invloed op de aggregatie in § 5 is besproken.

Dat de werking van speeksel geheel berust op de aanwezigheid van fosphaten is moeilijk te bewijzen. Toch werden eenige proeven gedaan met het doel om de concentratiegrens voor de werking van fosphaten en van speeksel te weten te komen.

De grens voor Na_2HPO_4 ligt tusschen $\frac{5}{81}$ en $\frac{5}{27} \text{‰}$.

gemiddeld dus bij ongeveer 0,1 0/00; neerslag treedt met deze verbinding in lage concentraties niet op, ze is daarom hier even bruikbaar als het primaire fosphaat..

TABEL XXXIII

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
pepsine 1 0/0	geen
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \frac{5}{243} \text{ 0/00}$	geen
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \frac{5}{81} \text{ 0/00}$	geen
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \frac{5}{27} \text{ 0/00}$	zeer zwak tot duidelijk
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \frac{5}{9} \text{ 0/00}$	zeer zwak tot duidelijk
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \frac{5}{3} \text{ 0/00}$	duidelijk tot sterk
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ 5 0/00}$	sterk; hier en daar neerslag en paarse verkleuring v. h. celvocht

Vóórbehandeling d, 4 dagen.

Aggreg. vastgesteld na 18 uur.

TABEL XXXIV

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
pepsine 1 0/0	plaatselijk zwak of zeer zwak
speeksel, verdund tot $\frac{1}{243}$	plaatselijk zeer zwak
speeksel, verdund tot $\frac{1}{81}$	plaatselijk zeer zwak
speeksel, verdund tot $\frac{1}{27}$	plaatselijk zeer zwak
speeksel, verdund tot $\frac{1}{9}$	plaatselijk zeer zwak
speeksel, verdund tot $\frac{1}{3}$	zeer zwak tot vrij duidelijk
speeksel, onverdund	vrij duidelijk tot vrij sterk

Vóórbehandeling d, 5 dagen.

Aggreg. vastgesteld na 2 uur.

Rauw, gefiltreerd speeksel.

Voor speeksel ligt de grens tusschen een verdunning van 1 op 3 en van 1 op 9 in, gemiddeld bij $\frac{2}{9}$.

In het handboek van B e t h e vindt men de volgende getallen:

vaste stoffen in speeksel 0,58 0/0, hiervan anorganische zouten 38 0/0, daaronder bijna de helft phosphaten. De concentratie van de phosphaten in speeksel bedraagt dus omstreeks 1 0/00. In $4\frac{1}{2} \times$ verdund speeksel, het grensgeval, is dit gehalte ongeveer 0,2 0/00.

De grootheidsorde komt dus wel overeen. Meer was ook niet te verwachten, wanneer we in aanmerking nemen, dat 1e de samenstelling van speeksel, en speciaal het gehalte aan zouten van speeksel sterk wisselt en de getallen van B e t h e daarom nog niet op het gebruikte speeksel van toepassing behoeven te zijn; dat 2e de grenswaarden voor speeksel en fosphaat slechts binnen wijde grenzen werden bepaald en dat 3e deze bepalingen met verschillende bladen werden verricht, waardoor ook individueele verschillen in gevoeligheid van deze bladen een rol kunnen hebben gespeeld.

In ieder geval is het waarschijnlijk dat de aggregeerende werking van speeksel tenminste voor het grootste gedeelte berust op de aanwezige orthophosphaten.

12. Analogie met „chemodinese” en met groeiversnelling

De eigenaardige werking van aminozuren op de aggregatie voert onwillekeurig tot vergelijking met de door F i t t i n g aan *Vallisneria* verrichte onderzoeken.

Fitting (1925, 1927) kon in *Vallisneria*-cellen protoplasmastrooming opwekken door ze te leggen in oplossingen van allerlei verbindingen waaronder in de eerste plaats aminozuren.

Ook in dit geval staan asparagine en asparaginezuur bovenaan wat betreft hun invloed op de protoplasmastrooming, en ook hier zijn tyrosine, kreatine en ureum niet werkzaam.

Een groot verschil bestaat tusschen de gevoeligheid van de cellen van *Vallisneria* aan den eenen en die van *Drosera* aan den anderen kant. Zoo werd voor *Drosera* de concentratiegrens van asparagine gevonden bij ongeveer 0,08 ‰; Fitting vond deze voor *Vallisneria* bij omstreeks 0,00004 ‰, dus 2000 $\times$ minder.

Behalve quantitative verschillen zijn er ook kwalitatieve. Zoo zijn *Vallisneria*-cellen geheel ongevoelig voor

leucine, terwijl dit in *Drosera*-cellen tamelijk sterke aggregatie opwekt. De lage drempel maakt het onwaarschijnlijk dat de aggregerende werking van leucine aan een verontreiniging zou zijn te wijten.

Onder de stoffen waarmee Fitting werkte bevinden zich geen orthophosphaten; het zou interessant zijn te weten of deze eenigen invloed hebben op de protoplasma-strooming bij *Vallisneria*.

Eenige analogie bestaat ook tusschen de in dit hoofdstuk beschreven proeven en die met groeiversnellende stoffen (E. Seubert, 1925, C. J. Gorter, 1927). Zoo b.v. de invloed van speeksel, diastase en trypsine. Toch zijn ook hier groote verschillen: aminozuren en phosphaten beïnvloeden den groei niet, terwijl pepsine, dat een sterke groeiversnellende werking uitoefent, op de aggregatie geen invloed heeft.

13. *Saponine, amylalcohol*

Eenige proeven met oplossingen van saponine en van amylalcohol (die beide de oppervlaktetension verlagen) vielen volkomen negatief uit. Amylalcohol bleek nogal schadelijk te zijn; in een $5\times$ verdunde, koud verzadigde oplossing bleven de cellen echter lang genoeg leven om eventuele aggregatie te kunnen vertoonen.

14. *Aggregatie bij afwezigheid van zuurstof*

Reeds Darwin vond dat voor aggregatie de aanwezigheid van O_2 noodzakelijk is.

De in de tabellen opgeteekende uitkomsten van twee proeven bevestigen dit volkomen. In het 1e geval werd een verzadigde asparagine-oplossing $3\frac{1}{2}$ uur gekookt, daarna werd er een ongeveer $1\frac{1}{2}$ c.M. dikke laag paraffineolie (Nujol) op gegoten en weer $\frac{1}{2}$ uur gekookt. Het bladstukje, dat vooraf eenigen tijd in gekookt en afge-

koeld gedestilleerd water had gestaan werd in de afgekoelde asparagine-oplossing gebracht die, evenals de contrôlevloeistoffen, in het donker werd geplaatst.

Eenige uren nadat de niet geaggregeerde tentakel uit de zuurstofvrije oplossing aan de lucht waren blootgesteld geweest, waren de cellen reeds duidelijk geaggregeerd, zoodat beschadiging niet de oorzaak was van het uitblijven der aggregatie.

TABEL XXXV

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
pepsine-oplossing	geen
verz. asparagine-opl.	duidelijk tot sterk
verz. asparagine-opl., uitgekookt	geen
Vóórbehandeling d, 6 dagen.	
Aggr. vastgesteld na 19 uur.	

TABEL XXXVI

D. capensis

Vloeistof	Aggregatie
pepsine 1 %	zwak tot duidelijk
verz. asparagine-opl.	zeer sterk
verz. asparagine-opl. N ₂ atm.	zwak tot vrij duidelijk
Vóórbehandeling d, 3½ dag.	
Aggreg. vastgesteld na 18 uur.	

In de proef van tabel XXXVI werd door de asparagine-oplossing N₂ uit een bom geleid. Achter de N₂ bom waren geschakeld waschfleschjes met 1e kaliumpermanganaat, 2e pyrogallol (10 gr. in 100 c.c.m. van een verzadigde KOH-oplossing), 3e leidingwater, 4e verzadigde asparagine-oplossing. Aan het eind kwam weer een flesch met leidingwater. Nadat op zijn minst een uur N₂ was doorgeleid werden reepjes blad, die vooraf in uitgekookt gedestilleerd water in het donker hadden gestaan, in de asparagine-oplossing gebracht. Alles werd wederom geparaffineerd, het waschfleschje met asparagine met zwart papier omwikkeld en voortdurend N₂ doorgeleid. Ook de contrôlevloeistoffen werden in het donker gezet.

Zonder O₂ heeft dus vrijwel geen aggregatie plaats.

BESPREKING VAN DE RESULTATEN

Wanneer men aggregatie opwekt in een tentakelsteel door een blad of bladstuk bezet met tentakels b.v. in een oplossing van 1 % pepsine te leggen, dan ziet men deze aggregatie in de eindklier beginnen en van daaruit in den tentakelsteel voortschrijden. De vraag is welke rol de eindklier speelt in dit proces.

Bij de oudere onderzoekers (Darwin, Schimper, de Vries, Gardiner) werd deze vraag niet gesteld en dus ook niet beantwoord. Åkerman echter trachtte zich een oordeel te vormen door de eindklier te verwijderen. De uitkomst van zijn proeven voerde hem o.a. tot de in de inleiding aangehaalde zinnen waarin hij het vermoeden uitspreekt dat een voor de aggregatie noodzakelijke stof zich normaal tenminste in de bovenste steelcellen zou bevinden.

Dit vermoeden van Åkerman werd door de in de vorige hoofdstukken medegedeelde proeven volkomen bevestigd. Deze wijzen alle op het bestaan van een z.g. aggregatiestof die ook in normale, niet geaggregeerde cellen aanwezig is. Eerst behandeling van deze tentakels met bepaalde stoffen maakt dat ze werkelijk aggregeren.

Deze zelfde stoffen veroorzaken voor een deel geen aggregatie in cellen waaruit men door een speciale voorbehandeling de „aggregatiestof” heeft laten wegdiffundeeren.

1. *Tweeërlei beïnvloeding van de aggregatie*

Volgens deze opvatting zijn dus voor het totstandkomen

van aggregatie steeds twee stoffen noodig: 1e een stof met een eigenschap die voortaan eigenschap A zal worden genoemd; deze brengt, zonder zelf aggregatie te veroorzaken de cellen in een aggregeerbaren toestand; 2e een stof met de eigenschap B die den stoot geeft tot de aggregatie.

Dat er zeer vele stoffen bestaan die de eigenschap B bezitten, weten wij o.a. uit de publicaties van Å k e r m a n. Ook waarnemingen van D a r w i n duiden hier reeds op; deze hebben echter niet veel waarde door de verwarring van aggregatie met granulatie.

Dat ook de eigenschap A niet beperkt is tot het produkt van de eindaklieren blijkt uit hoofdstuk IV van deze publicatie.

2. *A-stoffen, B-stoffen en AB-stoffen*

Onder de onderzochte stoffen zijn er die zeer zeker alleen eigenschap B bezitten, ik noem b.v. Liebig's vleesch-extract, pepton Witte en pepsine. „B-stoffen”.

Stoffen die alleen eigenschap A vertoonen heb ik niet kunnen vinden. Orthophosphaten, aminozuren, speeksel, eindaklierenextract, alle veroorzaken ook aggregatie in verse tentakels en alle doen vooraf behandelde cellen aggregeeren zonder dat men bovendien pepsine of vleesch-extract behoeft toe te voegen.

Voor speeksel en eindaklierenextract zou men dit desnoods zoo kunnen verklaren, dat deze stofmengsels en een of meer verbindingen met eigenschap A, en een of meer met eigenschap B bevatten.

Op dergelijke stoffen als asparagine en primair kaliumphosphaat, die men gemakkelijk door omkristalliseeren kan zuiveren is deze verklaring moeilijk toe te passen. Hier kan men m.i. het beste aannemen dat deze stoffen beide eigenschappen in zich vereenigen. „A B-stoffen”.

Of er bovendien nog zuivere „A-stoffen” bestaan is moeilijk te zeggen. Het eenige geval dat nog op het voor-

komen van een dergelijke stof wijst is dat van het eindklierprodukt zelf; dit zal daarom iets uitvoeriger worden besproken.

3. De „aggregatiestof”

Volgens de hier ontwikkelde opvatting bevatten de cellen van een verschen, niet geaggregeerden tentakelsteel de z.g. aggregatiestof. Legt men zulk een tentakel in een pepsine-oplossing dan dringt deze door de sneevlakte en door de met een zeer dunne cuticula bedekte eindklier binnen, waarbij de klier de vloeistof waarschijnlijk onveranderd doorlaat ¹⁾. In de steelcellen bevindt zich reeds een stof met de eigenschap A; daarbinnen dringt nu de pepsine-oplossing die de eigenschap B bezit, waardoor in de cellen de voorwaarden voor aggregatie zijn gegeven. Bezat de aggregatiestof echter ook eigenschap B dan zouden de cellen van iedere tentakel ook zonder prikkelen steeds geaggregeerd moeten zijn.

Tegen deze voorstelling bestaan eenige bezwaren:

1e bestaat de mogelijkheid dat de aggregatiestof toch een „AB-stof” is, welke echter alleen door een *geprikkelde* eindklier wordt afgescheiden. Door diffusie in de steelcellen zou deze stof daar aggregatie moeten veroorzaken, bij welke aggregatie de stof meteen zou worden opgebruikt. Of de pepsine ook in den steel zou diffundeeren zou hier onverschillig blijven; de rol van de pepsine-oplossing zou

¹⁾ Eenmaal werd een waarneming gedaan die op het tegendeel schijnt te wijzen. Het betreft hier een blaadje van *D. intermedia* dat in $\frac{1}{2}\%$ Na_2HPO_4 was gelegd. Aan één zijde van het blad waren de eindklieren weggeknipt. Na 9 uur was in de intacte tentakels sterke aggregatie weggeknipt. Na 9 uur was in de intacte tentakels sterke aggregatie maar geen neerslag, in de gedecapiteerde hier en daar aggregatie en veel neerslag. Na 28 uur waren de gedecapiteerde geheel met neerslagbollen gevuld terwijl in de intacte tentakels eenig neerslag alleen aan de bases was te vinden. Bovenin was hier zeer sterke aggregatie maar geen neerslag.

alleen bestaan in het prikkelen van de eindklier. Dat losse eindklieren in gedest. water gelegd hieraan toch de aggregatiestof afgeven behoeft geen verwondering te wekken, daar de bij het afknippen der eindklieren verwonde cellen waarschijnlijk wel stoffen in de vloeistof brengen die in staat zijn de eindklieren te prikkelen.

Door deze veronderstelling zou worden verklaard dat er bladen met niet geaggregeerde tentakels bestaan; hier zijn de klieren niet geprikkeld en er is dus geen AB-stof in de cellen aanwezig. Een voordeel is bovendien dat we de aggregatie door mechanische ¹⁾ en chemische invloeden op deze manier onder één gezichtspunt kunnen brengen: in beide gevallen is het primaire dat de eindklier wordt geprikkeld en op haar beurt een stof, de aggregatiestof, vormt.

Toch kan deze voorstelling niet juist zijn, immers, versche tentakels zonder eindklier aggregeeren met pepsine. Het gewoonlijk slechts kleine verschil in aggregatiesterkte van normale en gedecapiteerde tentakels kan worden toegeschreven aan een geringen schadelijken invloed van de verwonding. Bovendien zou men geen verklaring hebben voor het feit dat de tentakels van jonge, pas ontplooiden bladen nog vóór zij ooit geprikkeld zijn geweest, toch zoowel met als zonder klier tot aggregeeren in staat zijn. Tenzij men vermoedt dat de eerste prikkeling van mechanischen aard is en plaats vindt bij de ontplooiing van het blad. Men zou echter in ieder geval de voorwaarde moeten handhaven dat de aggregatiestof in één maal weer wordt verbruikt. Dit nu is geenszins het geval: in bladen met gedecapiteerde tentakels kon ik nog verscheidene malen sterke aggregatie opwekken en weer laten teruggaan.

2e zou men kunnen vermoeden dat de onbekende stof werkelijk de twee eigenschappen A en B bezit, dat de

¹⁾ Het is mij, evenals Åkerman, slecht gelukt om door mechanischen invloed aggregatie op te wekken; daardoor was het mij niet mogelijk proeven te doen over dit punt, waar nog vele vragen open blijven.

eigenschap B echter door een onbekende oorzaak wordt verhinderd zich te uiten.

Bij alle vaagheid heeft deze hypothese toch het groote voordeel, dat ze de mogelijkheid opent om door analyse van het extract en door bepaling van de drempelwaarden voor het extract en voor andere werkzame stoffen het chemische karakter van de aggregatiestof te weten te komen, op de wijze waarop dit voor speeksel werd gedaan.

Bovendien zou op deze wijze misschien een oorzaak zijn te vinden voor een feit, dat reeds door verschillende onderzoekers is opgemerkt, n.l. dat ook ongeprikkelde tentakels dikwijls en vooral bovenin geaggregeerd zijn. Natuurlijk is het moeilijk om uit te maken of een tentakel geprikkeld is of niet. Wanneer men echter de planten ver van laboratoriumgassen in een kas kweekt, wanneer ze bovendien nooit besproeid worden en insectenvrij onder dicht gaas zijn opgesteld en ze vertoonen dan nóg aggregatie, dan mag men toch wel aannemen, dat er een andere nog onbekende reden is voor deze aggregatie. Men zou dan b.v. kunnen aannemen, dat in dit geval de verhindering van het tot uiting komen der eigenschap B van de aggregatiestof niet volkomen is geweest.

4. *Andere mogelijkheid*

In de vorige §§ is steeds gesproken van twee eigenschappen A en B. Het is echter de vraag of er voldoende redenen bestaan om deze twee functies te onderscheiden.

Men kan n.l. ook aannemen dat het eenige onderscheid tusschen de besproken stoffen daarin bestaat, dat ze in zeer verschillende mate aggregatie opwekken; asparagine b.v. sterk, pepsine slechts zwak. We zouden de voornaamste besproken stoffen kunnen rangschikken naar hun aggregerende eigenschappen in ongeveer de volgende reeks:

pepton < pepsine, Liebig's vleesextract < diastase
< trypsine, eindklierenextract, speeksel, orthophosphaten,
eenige aminozuren.

Het is nu noodig, na te gaan in hoeverre de waargenomen verschijnselen door deze opvatting worden verklaard.

Het feit dat tentakelstukken na een bepaalde voorbehandeling niet meer aggregereen met pepsine maar wel met b.v. kaliumphosphaat zou dan zoo kunnen worden opgevat, dat de cellen eenigszins zijn beschadigd waardoor ze alleen nog gevoelig zijn voor stoffen met sterk aggregerende werking, zooals phosphaten.

Vreemd is echter in dit verband dat Å k e r m a n met pepsine en met Liebig's vleeschextract in normale tentakels sterkere aggregatie verkrijgt (aangeduid als ++++) dan met asparagine (+) of KH_2PO_4 (++) in dezelfde concentratie.

Ook in den loop van dit onderzoek bleken de beste en snelst werkende aggregatiemiddelen voor normale tentakels steeds pepsine en vleeschextract te zijn. Deze ontdekking wordt bevestigd door bepalingen die werden uitgevoerd om de grensconcentratie (d.w.z. de concentratie die nog juist aggregatie veroorzaakt) van eenige verbindingen te weten te komen. Deze proeven zijn in het IVe hoofdstuk beschreven; het resultaat is dat voor gespoelde tentakels de grens voor Na_2HPO_4 ligt bij omstreeks 0,1 ‰, voor asparagine bij ongeveer 0,08 ‰. Pepsine daarentegen werkt op verse tentakels zonder eindklieren nog aggregierend in een concentratie tusschen 0,016—0,05 ‰.

Dit geldt voor *D. capensis*.

Bij *D. anglica* vond ik de grens voor verse tentakels met eindklier voor pepsine bij ongeveer 0,04 ‰, voor asparagine bij ongeveer 0,06 ‰.

Deze uitkomsten wijzen in geen geval op een mindere gevoeligheid van de cellen voor pepsine dan voor stoffen als phosphaten en asparagine. Integendeel komt, afgezien van de kleine verschillen de grootheidsorde van de grensconcentraties voor deze drie stoffen vrijwel overeen.

Dat in voorbehandelde tentakelstelen $\frac{1}{60} \text{‰} \text{Na}_2\text{HPO}_4$

aggregatie kan veroorzaken terwijl zelfs 2 0/0 pepsine hiertoe niet in staat is, blijft m.i. door deze cijfers onverklaarbaar, tenzij we aannemen dat de verschillen tusschen pepsine en stoffen als asparagine en phosphaten in dit geval niet van quantitatieven maar van kwalitatieven aard zijn.

Een paar feiten en waarnemingen die in dezelfde richting wijzen zijn b.v.:

1e normale tentakels die men in 1 0/0 pepsine-oplossing legt vertoonen van boven naar beneden een sterk aggregatieverval. Gebruikt men daarentegen een verzadigde oplossing van asparagine dan is de aggregatie veel gelijkmatiger, de cellen aan den voet zijn sterk geaggregeerd terwijl onder de klier de aggregatie gewoonlijk zwakker is dan met 1 0/0 pepsine.

2e de verschillende proeven met eindaklierenextract, speeksel, fosphaat, enz. kan men met hetzelfde resultaat uitvoeren met korte tentakelstompen die men versch gebruikt, in plaats van met grootere tentakelstukken die men vooraf een paar dagen in water legt. Dat vooraf behandelde tentakelstukjes met pepsine niet vermogen te aggregeeren, kan dus moeilijk een gevolg zijn van beschadiging van de cellen, daar ook versche cellen uit den tentakelvoet hiertoe niet in staat zijn. De verwonding speelt hier blijkbaar geen groote rol daar na afknippen van de eindaklier de bovenste cellen van een steel met pepsine sterk kunnen aggregeeren.

5. *De werkzame stof in het eindaklierenextract*

Wanneer we de onderscheiding van de functies A en B handhaven, dan blijven voor de aggregatiestof twee mogelijkheden bestaan: of het is een A-stof, of een AB-stof, maar de eigenschap B wordt verhinderd zich te uiten. In het eerste geval is het wel zeker dat de gezochte stof zich niet bevindt onder de verbindingen waarover het IVe hoofdstuk handelt; in het tweede geval is dit niet uitgesloten.

Wanneer we bedenken dat de aggregatiestof bestand is tegen koken en tegen droog verwarmen op 100° C. dan

komen phosphaten en aminozuren zeker in aanmerking.

Het zou in de eerste plaats een fosphaat kunnen zijn. Erg waarschijnlijk is dit echter niet; zoo rijst b.v. de vraag waar deze phosphorverbinding vandaan zou moeten komen. Nooit heb ik verschil in aggregatiesterkte kunnen vinden tusschen bladen die niet en die wel insecten hadden gevangen. Ook bladen die onder gaas groeien en nooit zijn gevoerd kunnen sterk aggregeren. Het is dus onwaarschijnlijk dat het verlies aan phosphorverbindingen van de eindklier uit het dierlijke voedsel zou worden aangevuld.

De mogelijkheid blijft alleen dat ze via den tentakelsteel worden aangevoerd, maar dan natuurlijk in een anderen vorm, d.w.z. als een verbinding die de aggregatie niet beïnvloedt. Daar organische P-verbindingen zooals lecithine, phosphatiden niet oplosbaar zijn blijft hier niet veel anders over dan zouten van phosphorzuur, en dit is om begrijpelijke redenen onmogelijk.

Waarschijnlijker is daarentegen dat de aggregatiestof een aminozuur, of een mengsel van aminozuren is. Als deze in de eindklier door afbreken van eiwitten ontstaan (dit is niet onmogelijk, daar immers de kliercellen een proteolytisch enzym vormen) dan kan men zich voorstellen dat door aanvoer van anorganische N-verbindingen, die geen aggregatie veroorzaken, en eiwitsynthese het verlies aan eiwit in de klier regelmatig weer wordt aangevuld.

Ik wil er echter nog eens op wijzen dat deze verklaring geenszins bevredigend is, daar altijd moet worden aangenomen, dat de aggregerende eigenschap B van deze aminozuren om een of andere reden niet tot uiting komt.

6. *Zwelling. Oppervlaktespanning*

Welke nu eigenlijk de rol is die de genoemde verbindingen spelen in het aggregatieproces, is moeilijk te zeggen. Zooals reeds eerder werd opgemerkt zou men geneigd zijn te denken aan een invloed op de zwelbaarheid van het protoplasma. De besproken stoffen munten echter in het

geheel niet uit wat betreft hun bevordering van de zwelling van gelen. Dat de meeste werkzame oplossingen in zuurgraad van het neutrale punt afwijken heeft in dit verband geen beteekenis; er zijn immers andere vloeistoffen die dit ook doen en toch geen aggregatie veroorzaken (b.v. leidingwater, NaHCO_3 , pepsine). Ook allerlei zouten (uitgezonderd de phosphaten), waaronder b.v. KCNS hebben geen invloed op de aggregatie maar wel op het zwellingsproces.

Behalve de vergrooting van het protoplasmavolumen treedt bij de aggregatie het verschijnsel op dat de vacuole zich deelt in vele kleinere. Dit wijst op een verlaging van de oppervlaktespanning tusschen protoplasma en celvocht. Echter hebben sterk oppervlakte-actieve stoffen zooals saponine en amylalcohol geen aggregerende eigenschappen. Ook het feit dat in O_2 -vrij milieu geen aggregatie plaats heeft, spreekt tegen de opvatting van de aggregatie als een eenvoudig fysisch-chemisch proces.

Deze heele kwestie moet dus onbeslist worden gelaten, daar het zonder verdere proeven m.i. geen zin heeft hier hypothesen op te stellen.

OVERZICHT VAN DE RESULTATEN

Het z.g. aggregatieproces in de tentakels van *Drosera* is het eerst gezien en beschreven door Darwin en daarna vooral door Hugo de Vries en Åkerman bestudeerd. Ook Schimper, Gardiner en anderen hielden zich bezig met dit verschijnsel dat in de cellen van den tentakelsteel (waar het het best is te zien) in het kort beschreven a.v. verloopt:

Sterke protoplasmastrooming treedt op en verdeelt de eene vacuole in vele kleinere, die voortdurend van vorm veranderen. Bovendien neemt het volumen van het protoplasma toe ten koste van het celvocht.

Beschreven wordt hoe de planten in een kas werden gekweekt. Meestal werd *Drosera capensis* gebruikt.

In het eerste hoofdstuk worden eenige proeven beschreven die Åkerman's waarnemingen omtrent het toenemen van de concentratie van het celvocht gedurende de aggregatie, bevestigen. Het is echter nog niet gelukt de volumenverandering van de vacuolen quantitatief te bepalen.

De aggregatie begint en is steeds het sterkst in het vlak onder de eindklier gelegen gedeelte van den tentakelsteel en neemt naar het blad toe af. Ook losse tentakelstukken zonder eindklier vertoonen wanneer men ze in oplossingen van Liebig's vleeschextract of van pepsine legt een sterk verschil in aggregatie aan boven- en onder-eind. In het tweede hoofdstuk wordt getracht deze „polariteit” te verklaren door de ongelijke verdeling in den steel van een „aggregatiestof” die door de eindklier zou worden af-

gescheiden en, zonder zelf aggregatie te veroorzaken, de cellen in een aggregeerbaren toestand zou brengen.

Legt men losse tentakelstukken zonder eindklier een paar dagen in een onschadelijke vloeistof dan aggregeeren de cellen daarna niet meer in vleeshextract of pepsine. Het vermogen tot aggregeeren blijft het langst bewaard in de middelste cellen. Wel aggregeeren dergelijke stukken wanneer men er een extract van de eindklieren aan toevoegt. Dit extract wordt op een speciale manier bereid; drogen of koken doet de aggregeerende werking niet verdwijnen. Na een paar dagen wordt de oplossing echter onwerkzaam (microörganismen?); gedroogd kan men het extract daarentegen goed bewaren. Extract uit eindklieren van *D. capensis* doet ook tentakels van *D. spathulata*, *D. binata*, *D. rotundifolia*, *D. intermedia* en *D. anglica* aggregeeren.

In het derde hoofdstuk wordt vermeld dat ook in de haren en papillen van de kelk- en schutblaadjes aggregatie mogelijk is. We moeten aannemen dat hier de twee soorten papillen „aggregatiestof” produceeren.

Het vierde hoofdstuk handelt over stoffen, die dezelfde eigenschap bezitten als het extract uit de eindklieren. Dit werd gevonden voor speeksel, orthophosphaten en een aantal aliphatische aminozuren.

Men kan speeksel langen tijd koken zonder dat de besproken eigenschap verdwijnt. Door quantitative proeven wordt waarschijnlijk gemaakt dat de werking er van berust op de aanwezige orthophosphaten.

Van de gebruikte aminozuren en andere organische N-verbindingen zijn asparagine, asparaginezuur en alanine het werkzaamst. Minder leucine, glyocol en hippuurzuur; praktisch niet tyrosine, kreatine en ureum.

Taka-diastrase en pankreatine *Rhenania* hadden weinig invloed.

De aggregeerende werking van de besproken stoffen berust niet op hun PH.

Geen resultaten werden verkregen met eenige verbin-

dingen, die de oppervlaktespanning verlagen (saponine, amylalcohol) en sommige, die de zwelling van colloïden bevorderen (o.a. KCNS).

LITERATUUR

- Å. ÅKERMAN, Untersuchungen über die Aggregation in den Tentakeln von *Drosera rotundifolia*.
1917, Botaniska Notizer, blz. 145.
- A. BETHE, G. v. BERGMANN, G. EMDEN, A. ELLINGER, Handbuch der normalen u. pathol. Physiologie. IIIer Teil, 1927.
- CH. DARWIN, 1875. Insectivorous Plants.
1888, Revised by Francis Darwin.
- FR. DARWIN, The process of aggregation in the tentacles of *Drosera rotundifolia*.
1876, Quaterly Journ. of Microsc. Science. Vol. XVI n. s. blz. 309.
- H. FITTING, Untersuchungen über die Auslösung von Protoplasmaströmung.
1925, Jahrb. wiss. Botanik LXIV blz. 281.
——— Untersuchungen über Chemodinese bei *Valisneria*.
1927, Jahrb. wiss. Botanik LXVII blz. 427.
- W. GARDINER, 1885. On the Phenomena accompanying Stimulation of the Gland-cells in the Tentacles of *Drosera dichotoma*.
1886, Proc. Royal Soc. of London. Vol. XXXIX, blz. 229.
- A. J. M. GARJEANNE, Die Rhabdoïde von *Drosera rotundifolia* L.
1918, Rec. des Trav. Bot. Néerl. Vol. XV blz. 237.
- K. GOEBEL, Pflanzenbiologische Schilderungen.
1893, IIer Teil, Hoofdstuk V: Insectivoren.
- CHRISTINE J. GORTER, On the occurrence of growth-accelerating and growth-retarding substances.
1927, Proc. Kon. Akad. v. Wetensch. Amsterdam. Vol. XXX no. 7.
- W. PFEFFER, Osmotische Untersuchungen.
1877, Leipzig, Engelmann, blz. 196 e.v.

- Pflanzenphysiologie.
1904, IIer Bd. 2e Aufl. § 94.
- A. F. W. SCHIMPER, Notizen über insectenfressende Pflanzen.
1882, Bot. Ztg. XL blz. 225.
- S. L. SCHOUTEN, Reinculturen aus einer unter dem Mikroskop isolierten Zelle.
1905, Zeitschr. f. wissensch. Mikroskopie und f. mikrosk. Technik. Bd. XXII blz. 10.
- Reinculturen uit één onder het mikroskoop geïsoleerde cel.
1911, Versl. Kon. Akad. van Wetensch. Amsterdam.
- E. SEUBERT, Ueber Wachstumsregulatoren in der Koeleoptile von Avena.
1925, Zeitschr. f. Bot. 17. 1925 blz. 49.
- H. DE VRIES, Ueber die Aggregation im Protoplasma von *Drosera rotundifolia*.
1886, Bot. Ztg. XLIV blz. 1.
- F. W. WENT, Wuchsstoff und Wachstum.
1927, Rec. d. Trav. Bot. Néerl. Vol. XXV blz. 1.

STELLINGEN

I.

Het voorkomen van afwijkende randtentakels bij eenige *Drosera*-soorten kan niet als een secundaire verandering (Goebel, *Pflanzenbiol.* Schild. II) worden opgevat.

II.

Het onderzoek van F. Lange maakt Noack's opvatting van de witrandige *Pelargonium*'s zeer onwaarschijnlijk.

III.

Bij het zoeken naar de oorzaak der mozaiekziekten moet rekening worden gehouden met het feit dat bacteriën in een filtreerbaren vorm kunnen voorkomen.

IV.

De proeven van Lieske maken het waarschijnlijk dat vele plantaardige tumoren en dierlijke kankers door het zelfde sterk variabele organisme worden veroorzaakt.

V.

De *Podostemonaceae* moeten worden gesplitst in twee families, de *Podostemonaceae* en de *Tristichaceae*, die samen de orde de *Podostemonales* vormen.

VI.

De door Diels aangevoerde argumenten weerleggen de theorie van Wegener niet.

VII.

De opvatting dat de enzymen van de groep der carbohydrazen de eigenschap van specificiteit in bijzonder hooge mate zouden bezitten is niet langer houdbaar.

VIII.

De meening van Willstätter en Bamann (Hoppe-Seyler Bd. 180) dat alle erepsine afkomstig zou zijn van leukocyten is onjuist.

IX.

Het leerplan der Gymnasia dient zóo te worden ingericht dat het onderwijs in de plant- en dierkunde niet meer gedurende twee jaar wordt onderbroken.

