

## 21. Arthur Meyer: Ueber die Methoden zur Nachweisung der Plasmaverbindungen.

Eingegangen am 20. März 1897.

Man sollte meinen, dass nach den guten Resultaten der Arbeiten von TANGL, RUSSOW, GARDINER und MOORE über die Plasmaverbindungen die Methoden zur Nachweisung der Plasmaverbindungen völlig durchgearbeitet, klargelegt und leicht benutzbar seien. Dem ist aber nicht so. Arbeitet man nach den Vorschriften der Autoren, so ist man selbst bei den besten Objecten eines Erfolges durchaus nicht sicher. Es rührt das einmal daher, dass in den Arbeiten die Farbstoffe, welche benutzt werden, unzulänglich bezeichnet sind, und ferner daher, dass eine Begründung der Methoden nicht oder nicht in genügender Weise gegeben wird. Diesem Mangel will ich durch das Folgende etwas abzuhelpen versuchen.

Ehe ich die Methoden zur Nachweisung der Plasmaverbindungen bespreche, mögen einige Worte über Fixirung und Quellung hier Platz finden.

### Die Fixirung der Plasmaverbindungen.

Die Plasmaverbindungen sind, wie ich mich nicht nur für *Volvox*, sondern auch für das Parenchym der Aussenrinde von *Viscum album* und für die Endosperme überzeugt habe, ganz homogene Fäden, welche feine Kanäle der Membranen durchsetzen. Will man die Plasmaverbindungen in ihrer normalen Gestalt sehen, so muss man sie entweder in lebendem Zustande oder in gut gehärtetem untersuchen. Wie ich (MEYER 1896, Bot. Zeit.) gezeigt habe, ist *Volvox* ein vortreffliches Object zum Studium der lebenden Plasmaverbindungen, und ich verweise deshalb auch auf das, was ich in der Arbeit über *Volvox* über die Fixirung dieser Plasmafäden mitgetheilt habe. Im Allgemeinen verhalten sich die Plasmaverbindungen der Phanerogamen gegen Fixirungsmittel so wie die von *Volvox*. Die Plasmaverbindungen des Parenchyms der Aussenrinde von *Viscum* werden durch einprocentige Osmiumsäure völlig homogen fixirt; etwas weniger gut fixirt concentrirte Jodjodkaliumlösung (3 Jod, 3 Jodkalium, 20 Wasser), ebenso Kaliumwismuthjodidlösung (MEYER 1896, Bot. Zeit., S. 196), während in schwächerer Jodjodkaliumlösung (1 Jod, 1 Jodjodkalium, 200 Wasser; filtrirt) die Plasmaverbindungen körnig, in Alkohol oder siedendem Wasser tropfig werden. Chromsäure, FLEMMING's Lösung, Pikrinsäure, Formaldehyd sind relativ schlechte Fixirungsmittel für die Plasmafäden.

Lässt man Schnitte von *Viscum* längere Zeit in Wasser liegen, so zerfallen die Plasmaverbindungen auch; es bleiben jedoch Reste der Fäden in den Kanälen stecken. Dreiprocentige Essigsäure und Eau de Javelle zerstören die Fäden nach einigen Tagen meist völlig.

Die Angaben, welche GARDINER (1888, S. 54) über das Verhalten der bei Plasmolyse oft entstehenden Cytoplasmafäden gegen fixirende Reagentien macht, stimmen nicht ganz mit meinen an Plasmaverbindungen gemachten Erfahrungen überein, denn GARDINER bezeichnet Pikrinsäure und Chromsäure als gute Fixirungsmittel, doch stellt er in der Anmerkung, wie ich, die einprocentige Osmiumsäure in den Vordergrund.

Je nach der Methode, welche man zur Färbung und Nachweisung der Plasmaverbindungen benutzt, werden die letzteren entweder im intacten oder in mehr oder weniger zerfallenem Zustande zur Anschauung gebracht, es können sogar selbst mehr oder weniger leere Kanäle der Membran unter Umständen durch die Färbungen scharf hervortreten. Diese Thatsachen sind bei Anwendung der nachher zu besprechenden Methoden des Nachweises der Plasmaverbindungen zu berücksichtigen.

Zu beachten ist dabei ferner, dass sich die mit den verschiedenen Fixirungsmitteln behandelten Plasmafäden nicht gleich gut mit den verschiedenen Farbstoffen tingiren, und dass das Cytoplasma, also auch die Plasmaverbindungen der verschiedenen Zellen, an sich nicht gleichartig gegen die verschiedenen Farbstoffe reagirt.

Besonders bemerken möchte ich noch, dass sich mit Osmiumsäure gehärtete Plasmaverbindungen, nach sorgfältigem Auswaschen des Fixirungsmittels, gut mit Jod färben lassen.

### Die Quellungsmittel.

Die Quellungsmittel haben meiner Erfahrung nach für den Nachweis der Plasmaverbindungen nicht die Bedeutung, welche ihnen im Allgemeinen beigelegt zu werden scheint. Es lassen sich die Plasmaverbindungen in allen dickeren Membranen der Zellen der Phanerogamen besser ohne als mit Quellungsmitteln nachweisen; nur bei sehr dünnen Membranen erleichtern Quellungsmittel den Nachweis der Plasmafäden. Als bestes Quellungsmittel für unsere Zwecke betrachte ich Schwefelsäure, die man in verschiedenen Concentrationen, mit der schwächsten beginnend, verwendet, bis die genügende Quellung der Membran erreicht ist. Ich benutze Mischungen von 1 Vol. Schwefelsäure +  $\frac{1}{2}$  Vol. Wasser (1 +  $\frac{1}{2}$ ), 1 Vol. Schwefelsäure + 1 Vol. Wasser (1 + 1), ferner solche 1 + 2 und 1 + 3. Bei *Viscum* wirkt Schwefelsäure 1 + 3 schon stark quellend. Man controllire den Quellungs Vorgang genau, damit man nicht in die Fehler früherer Autoren (siehe MEYER, Bot. Ges. 1896) ver falle. Chlorzinkjod ist ein unzweckmässigeres Quellungsmittel als Schwefelsäure, da es schwieriger in bestimmter

Qualität herzustellen ist als die verdünnten Schwefelsäuren und das Plasma glasig verquillt und undeutlich macht.

Zu starke Verquellung der Membranen ist zu vermeiden, da durch sie die Plasmaverbindungen so verzerrt und gedehnt werden, dass ihr Nachweis erschwert wird. Schon Schwefelsäure 1 + 1 verquillt die Schliesshaut der Endospermzellen von *Latania borbonica* so stark, dass die Plasmafäden an den Enden sehr dünn, in der Mitte relativ dick und meist körnig, zerrissen, erscheinen, dabei oft in der Mitte einen dicken Knopf zeigen. Schon GARDINER (1888, S. 75) führte die grössere Dicke der Plasmaverbindungen in der Nähe der Mittellamelle der gequollenen Präparate auf die stärkere Quellung der dem Zelllumen angrenzenden Wand- und Schliesshautpartie zurück. KIENITZ (1891, S. 44) erklärt die Knöpfchen, welche ja auch nur besonders dicke Stellen der Fäden sind, aus der geringeren Verquellung der Mittellamelle der Schliesshäute. Freilich betrachtete KIENITZ manchmal, wie z. B. aus Fig. 22 hervorgeht, die ganze Schliesshaut und das sie umgebende Plasma als Knopf, da nämlich, wo er die Tüpfelfüllungen für Plasmaverbindungen hielt.

Ich halte die Erklärung von GARDINER und KIENITZ im Allgemeinen für richtig, will jedoch darauf aufmerksam machen, dass solche Knöpfchen in der Mitte der sonst völlig gleichmässig fadenförmigen Plasmaverbindungen des Endosperms von *Latania*, in einzelnen Fällen schon beobachtet werden können, wenn man entfettetes Material direct, ohne Quellung durch Säure, in Bayrischblau färbt und in Wasser oder Glycerin betrachtet. Wahrscheinlich wirkt hier die stärkere Quellbarkeit der äusseren Membranpartien in Wasser mit.

### Methoden der Jodfärbung.

Zum Sichtbarmachen gehärteter oder auch vor der Jodbehandlung nicht gehärteter Plasmaverbindungen leistet Jod, welches schon von TANGL zur Nachweisung der Fäden benutzt wurde, oft vorzügliche Dienste. Die Jodfärbung ist besonders deshalb werthvoll, weil sie der Schwefelsäure widersteht, und kommt es für ihre Ausnutzung nur darauf an, ob die gleichzeitige Färbung der Membran die Färbung der Plasmaverbindungen nicht verdeckt.

Schon reine Jodjodkaliumlösung, welche mit Jod gesättigt ist, färbt unter Umständen die Fäden deutlich. Ich verwende eine Lösung folgender Zusammensetzung: 1 Jod, 1 Jodkalium mit wenigen Tropfen Wasser gelöst, mit 200 *ccm* Wasser verdünnt, filtrirt.

Als günstiges Versuchsobject benutzen wir Tangentialschnitte des Endosperms von *Latania borbonica* Lam., welche wir zuerst mit Xylol, dann mit absolutem Alkohol ausgezogen haben, um alles Fett zu entfernen.

Legt man solche Schnitte von *Latania* in die Jodjodkaliumlösung, so treten die Fäden schwach, aber deutlich gelb gefärbt hervor.

Viel stärker werden die Fäden gefärbt, wenn man die Präparate in eine Jodlösung legt und aus dieser einen Theil des Jodes zur Ausscheidung bringt. Unter solchen Umständen löst das Protoplasma mehr Jod. Legt man einen Schnitt von *Latania* in 5 Tropfen concentrirter alkoholischer Jodlösung in ein Uhrgläschen, lässt 3 Minuten einwirken und setzt dann 2 *ccm* Wasser hinzu, so scheiden sich Kryställchen von Jod aus, und bringt man nun den Schnitt auf einen Objectträger in Wasser oder Glycerin, so sieht man, wenn man sofort beobachtet, die Plasmaverbindungen dunkelbraun, die Membranen hellbraun gefärbt. Diese Methode hat wohl schon MOORE 1886 für *Strychnos Ignatii* angewandt, da er „alkoholische Jodlösung, zu der eine kleine Menge Wasser zugesetzt war“, benutzte.

Wichtig für die Methode der Jodfärbung ist auch die Thatsache, dass sowohl concentrirte Schwefelsäure als auch Chlorzinkjodlösung in Jodjodkaliumlösung Ausfällung von Jod bewirken können. Setzt man zu 1 Tropfen der stärkeren Jodjodkaliumlösung (3 + 3 + 20) 1 Tropfen Schwefelsäure, so scheidet sich das Jod in Form von dunklen Tropfen aus, die langsam zur Bildung von Krystallen aufgebraucht werden. Chlorzinkjodlösung scheidet bei der gleichen Reaction das Jod sofort in Form von Krystallen ab. Eiweisstückchen färben sich in der schwächeren Jodjodkaliumlösung (1 + 1 + 200) langsam und weniger intensiv als in einer Mischung dieses Reagens mit gleich viel Schwefelsäure 1 + 1. So wird es verständlich, dass man bei gleichzeitiger Anwendung von Schwefelsäure und Jodjodkalium unter Umständen relativ intensive Färbungen der Plasmafäden erhalten kann.

Legt man Tangentialschnitte des Endosperms von *Chamaerops excelsa* in Jodjodkalium, bringt sie mit einem Tröpfchen der Lösung unter das Deckglas und lässt man dann seitlich Schwefelsäure 1 + 1 hinzutreten, so quillt die Mittellamelle der Schliesshäute nicht und färbt sich ganz schwach bräunlich, während zugleich alle anderen Lamellen der Schliesshäute quellen und fast farblos bleiben, die Plasmaverbindungen aber als relativ dunkel braun gefärbte, durch die Quellung der Schliesshaut gestreckte Fäden hervortreten.

Nun wird man auch die 1885 von TANGL für die Aleuronzellen von *Secale* benutzte Methode auf ihren Werth schätzen können. TANGL durchtränkte die Schnitte mit alkoholischer Jodtinctur, dann mit wässriger Jodjodkaliumlösung und setzte zuletzt Schwefelsäure hinzu. Sind die Concentrationen und Sättigungsverhältnisse der 3 Reagentien günstig gewählt, so kann diese Methode sehr günstige Resultate geben.

HANSTEIN hatte zur Nachweisung der Perforation der Siebplatten schon Jodtinctur und darauf Chlorzinkjod angewandt. RUSSOW benutzte 1882 Gemische von Jodjodkalium und Chlorzinkjod. Beide

Methoden können unter Umständen brauchbare Resultate geben, immerhin ist dabei das zu berücksichtigen, was früher über die Wirkung des Chlorzinkjods gesagt wurde.

Legt man einen entfetteten Schnitt von *Latania* in Jodtinctur, setzt dann Wasser hinzu und überträgt den Schnitt hierauf in ein Gemisch von 1 Vol. Jodjodkalium + 1 Vol. Chlorzinkjod, so werden die Plasmaverbindungen sichtbar, erscheinen jedoch überall relativ unscharf und unklar.

In manchen Fällen ist Kaliumwismuthjodid ein zweckmässiges Jodreagens zur Nachweisung der Plasmaverbindungen.

### Methoden der directen Färbung durch Farbstoffe.

#### Die Bayrischblaumethode.

GARDINER (1888, S. 55—60) hat eine Methode des Plasmanachweises beschrieben, mit welcher er gute Resultate erreichte. Er verwandte Schwefelsäure oder Chlorzinkjod als Quellungsmittel, als Farbstoff hauptsächlich „Hoffmannsblau“. Beim Arbeiten mit Schwefelsäure legte er die frischen Schnitte in Wasser, nahm sie mit einem Platinspatel heraus, entfernte das überflüssige Wasser vom Spatel, setzte dafür einen Tropfen Schwefelsäure auf und liess diese einige Minuten wirken. Der Schnitt wurde dann in Wasser geworfen, schnell ausgewaschen und mit einer Lösung von Hoffmannsblau in 50procentigem Alkohol, welche mit einigen Tropfen Essigsäure versetzt war, gefärbt.

Als ich an die Nachprüfung dieser Methode herantrat, suchte ich zuerst herauszubekommen, welchen Farbstoff GARDINER als „Hoffmannsblau“ in den Händen gehabt hatte. GARDINER setzt hinter Hoffmannsblau den Namen „Anilinblau“ in Klammern; ich liess mir, weil ich den Namen Hoffmannsblau in keiner Liste der Fabriken und in keinem chemischen Verzeichnisse auffinden konnte, zuerst von der Badischen Anilin- und Sodafabrik eine Probe Anilinblau senden. Der in kaltem Wasser unlösliche Farbstoff, welcher auch als Gentianablau 6 B, Opalblau, Hessischblau geht, stimmte in seinen Eigenschaften durchaus nicht mit dem von GARDINER benutzten Farbstoffe. Ich wandte mich nun an GRÜBLER & CO. in Leipzig und erhielt von dieser Firma unter dem Namen Hoffmannsblau ein Methylviolett, welches sich selbstverständlich in der von GARDINER angegebenen Weise nicht mit Erfolg verwenden liess. Erst aus der Drogenhandlung MORELLI in Würzburg, der Handlung, von welcher GARDINER ursprünglich sein Präparat bezogen hatte, erhielt ich anscheinend das gleiche Präparat, welches GARDINER benutzt hatte. Dieser Farbstoff, über dessen Abstammung ich nicht unterrichtet bin, zeigte folgende Reactionen: Dunkel mattblaues Pulver; in Wasser mit blauvioletter Farbe löslich;

in absolutem Alkohol schwerlöslich; Salzsäure verändert die Farbe der wässerigen Lösung kaum ein wenig nach blau hin; Jodjodkalium färbt die Lösung rothviolett; Kalilauge färbt die Lösung rothbraun und trübt sie ein klein wenig; concentrirte Schwefelsäure löst den Farbstoff rothbraun, beim Verdünnen wird diese Lösung blau; in 1 *ccm* einer Lösung 1 + 150 50procentigem Alkohol giebt 1 Tropfen Schwefelsäure 1 + 1 eine blaue Fällung. Der Farbstoff verhält sich danach ähnlich wie die Bayrischblaue der Actiengesellschaft für Anilinfabrikation in Berlin, welche Natronsalze der Diphenylaminblautrisulfosäure sind. Das Bayrischblau kam in der Wirkung dem Hoffmansblau gleich. Von anderen Farbstoffen erwies sich das Säureviolett 6 *B* der Farbenfabrik von FR. BAYER & Co. in Elberfeld als sehr brauchbar. Brauchbar ist auch das Alkaliblau *D* der Actiengesellschaft für Anilinfabrikation in Berlin und das Säureviolett 4 *BN* der Badischen Anilin- und Soda-fabrik (Natronsalz der Benzylpentamethyltriamidotriphenylcarbinol-sulfosäure).

Ich halte das Vorgehen der Firma GRÜBLER, Methylviolett statt Hoffmansblau zu senden, für sehr unzweckmässig. Durch eine solche Willkürlichkeit wird das wissenschaftliche Arbeiten entschieden erschwert. Es würde für die Wissenschaft zweckmässig sein, wenn die Firma zu ihren Listennamen eines jeden Präparates zugleich die Fabrikbezeichnung hinzufügte und das Jahr des Bezuges. Ich glaube, dass ihr ein derartiges Vorgehen nicht schaden würde, da die Firma ein genügendes Vertrauen bei den Forschern genießt und die Concurrrenz aus der Angabe der Bezugsquelle deshalb wenig Vortheil ziehen könnte.

Nachdem ich so über den von GARDINER benutzten Farbstoff in's Klare gekommen war, machte ich einige Versuche, welche entscheiden sollten, ob die Schwefelsäure für die Färbung der Protoplasmaverbindungen von Bedeutung sei. Bei GARDINER's Methode wird ja der Schnitt zuerst mit Schwefelsäure behandelt, und da diese selbst nach halbstündigem Waschen mit Wasser nicht völlig aus den Schnitten zu entfernen ist, so war es immerhin möglich, dass sie als Beize wirken konnte. Wir wissen ja, dass Schwefelsäure unter Umständen das Hoffmansblau fällt.

Ich legte zuerst entfettete *Latania*-Schnitte einige Minuten in eine Lösung von 1 *g* Hoffmansblau in 150 *g* 50procentigen Alkohols, andere in eine gleiche Lösung von Bayrischblau und untersuchte die Schnitte dann in Glycerin. In beiden Fällen erschienen die Plasmaverbindungen deutlich, die Mittellamelle der Schliesshaut schwach, die Membran sonst kaum gefärbt.

Beim Arbeiten mit Schwefelsäure zeigte es sich, dass schon Schwefelsäure 1 + 1 $\frac{1}{2}$ , so stark quellend wirkte, dass die Fäden verzerrt wurden, dass dagegen Schwefelsäure 1 + 3 günstig wirkte. Die Schnitte wurden nun einige Minuten in ein Uhrglas mit Schwefelsäure

1 + 3 gebracht, in eine Schale mit Wasser geworfen, gut gewaschen, 2—5 Minuten in der Hoffmannsblaulösung gefärbt und in Glycerin untersucht. Die Fäden waren nicht stärker gefärbt als ohne Säure, die Mittellamelle war dunkler, die Membran sehr schwach hellblau gefärbt.

Zu Gunsten der Vorbehandlung mit Schwefelsäure fielen dagegen die Versuche mit den Schnitten durch das lebende Parenchym der Aussenrinde von *Viscum* aus. Auch hier wurde Schwefelsäure 1 + 3 und sowohl Hoffmannsblau als Bayrischblau verwandt. Die Plasmaverbindungen des mit Schwefelsäure vorbehandelten Materiales waren etwas schärfer conturirt und etwas dunkler gefärbt als die der direct mit den Farbstoffen behandelten Schnitte. Behandlung der Schnitte mit Jodjodkalium, Auswaschen des Jodpräparates und Färbung mit Hoffmannsblau gaben kein besseres Resultat als directes Färben der Schnitte mit Hoffmannsblau.

Die Färbungen, welche Hoffmannsblau bei diesen Verfahren liefert, sind im Allgemeinen wenig intensiv. In der Hoffnung, dass eine mit Pikrinsäure gesättigte Lösung des Hoffmannsblaus in 50procentigem Alkohol, welche GARDINER unter dem Namen „Picric-Hoffmanns-blue“ empfiehlt, intensiver färbe, machte ich auch Versuche mit diesem Reagens, doch ohne besseren Erfolg.

Um zu versuchen, wie sich die Bayrischblaumethode gegen plasmafreie Poren der Tüpfelschliesshäute und Membranen verhält, wurden entfettete Schnitte von *Latania* einen Tag mit officineller Essigsäure und 5 Tage mit täglich gewechselter Eau de Javelle behandelt. Nach dieser Zeit waren nur in den dünnsten Stellen des Schnittes die Poren plasmafrei. Legte man die Schnitte in Glycerin ein, so traten die Poren viel schärfer hervor als im frischen Materiale. Durch Schwefelsäure und Hoffmannsblau trat eine deutliche Färbung nur in den Stellen auf, deren Poren sicher noch Plasma enthielten. Schnitte von *Viscum* verhielten sich ähnlich. Sie vertragen nur eine fünftägige Behandlung mit Eau de Javelle; bei längerer Behandlung wird die Membran zu stark zerstört.

### Die Methoden der Ueberfärbungen mit Farbstoffen und Differenzirung mit Entfärbungsmitteln.

Die Hämatoxylin-Methode. Mit Osmiumsäure oder mit Alkohol gehärtete Fäden lassen sich auch in folgender Weise färben. Man legt die Schnitte (z. B. *Latania*) 24 Stunden in DELAFIELD'sche Hämatoxylinlösung, wäscht sie dann einige Minuten in 60procentigem Alkohol, dem man 0,5 pCt. Salzsäure zugesetzt hat, dann in gleichem Alkohol, dem man auf 100 cc 10 Tropfen Ammoniak zusetzte, und überträgt sie in absoluten Alkohol, Xylol, Canadabalsam. Die Fäden sind meist nicht

stärker gefärbt als bei der vorigen Methode und weniger gleichmässig. Der Vortheil der Methode liegt darin, dass die Präparate haltbar sind, und dass das Verfahren in manchen Fällen die Membran ungefärbt lässt, wo die Jodfärbungen sie intensiv mitfärben.

Eine wohl hierher gehörige Methode wandte KOHL bei Algen an. Er sagt (KOHL, S. 12): „Ich wandte Tannin-Anilin-Beizen mit Säure, resp. Alkalibehandlung und darauffolgender Tinction an und habe meist vorzügliche Resultate erzielt. Bei manchen Algen tritt die leicht und intensiv von Statzen gehende Tinction der Zellenscheide, mitunter auch der eigentlichen Zellmembran, hindernd in den Weg. Da die Membranfärbung durch Methylenblau, Bismarckbraun etc. wahrscheinlich auf der Gegenwart von Pectinsäure und verwandten Stoffen in der Membran beruht und durch Alkohol, Glycerin und Säuren beseitigt werden kann, während die stickstoffhaltigen Substanzen (Plasma) durch dieselben Farbstoffe eine gegen die letztgenannten Reagentien resistente Tinction erfahren, so hat man besonders in der Behandlung mit Glycerin ein vorzügliches Mittel, die störende Membranfärbung zu eliminiren. Recht lebhaftere Färbungen erzielte ich durch eine je nach Object verschieden lange Säurebehandlung und darauf folgendes Einbringen in möglichst dünnes Farbbad, nach vorhergegangener Tanninbeizung.“

Ich habe nach diesen nur allgemeinen Angaben keine Versuche angestellt, möchte auch sonst glauben, dass die in Fig. 17 von KOHL abgebildeten Plasmaverbindungen von *Hookeria* nur Tüpfelfüllungen sind, so dass ich mir über den Werth der Methoden kein Urtheil bilden kann.

### Methoden der Färbung mit Farbstoffen, nach vorhergehender Beizung mit Jod.

Methylviolettmethode. RUSSOW hat 1883 folgende Methode angegeben: „Die von frischem Material hergestellten Schnitte wurden mit einem Tropfen Jodlösung (0,2 Jod, 1,65 Jodkalium, 100 Wasser) durchtränkt und mit Deckglas belegt. Auf den Objectträger wurde ein Tropfen concentrirter Schwefelsäure gebracht und mit 3 Tropfen Dreiviertelschwefelsäure gemischt, dann mit dem Glasstabe an den Rand des Deckglases bewegt und von der entgegengesetzten Seite des Deckglases mittelst Anlegen von Fliesspapier rasch durchgesogen. Nachdem die Schnitte sich gleichmässig tiefblau gefärbt, wurde, nach Abnehmen des Deckgläschens, mit Wasser mehrfach ausgewaschen und schliesslich mit Anilinblau gefärbt.“

RUSSOW hat mit dieser Methode gute Resultate erreicht. Welchen Effect sie hatte, kann ich nicht sagen, da der Erfolg ganz davon abgehängt hat, was sein „Anilinblau“ für ein Farbstoff war, und wie das Auswaschen der Schwefelsäure und des Jodes durchgeführt wurde.



Wahrscheinlich ist die Art der Färbung eine ähnliche gewesen, wie sie bei der vorher beschriebenen Bayrischblau-Färbung resultirt.

Lässt man genügend Jod in der Flüssigkeit, wäscht man die Schwefelsäure nicht stark aus und wendet man nicht ein Anilinblau, sondern ein Methylviolett zur Färbung an, so kann man, wie ich zeigen werde, eine viel intensivere Färbung des Cytoplasmas und der Fäden erhalten, als bei der Bayrischblau-Methode, und es ist wahrscheinlich, dass TERLETZKI und KIENITZ schon manchmal zufällig derartige Färbungen erhalten haben. TERLETZKI (1884) arbeitete in Uhrgläsern, ohne mikroskopische Controlle der Quellung, brachte die Schnitte erst in Jodjodkalium, goss dieses ab, dafür Schwefelsäure  $1 + \frac{1}{3}$  auf, wusch sie dann in einem Uhrglas voll Wasser und übertrug sie in ein Uhrglas mit starker wässriger Lösung von „Anilinblau“.

KIENITZ (1891) arbeitete in gleicher Weise, verwendete aber concentrirte Schwefelsäure und „Hoffmannsblau in concentrirter Lösung in 50procentigem Alkohol, welchem einige Tropfen Essigsäure zugesetzt waren“, oder eine Lösung von „Methylviolett“ in Wasser. Das Hoffmannsblau nennt KIENITZ auch „Anilinblau“.

Bei den Bemühungen den Werth der RUSSOW'schen Methode zu prüfen, und bei vielfach gewechselten Versuchsbedingungen und Farbstoffen fand ich, dass unter besonderen Umständen ganz eigenthümliche, intensive Färbungen der Plasmaverbindungen entstanden, welche selbst nach Entfernung der Plasmafäden noch erschienen.

Es gelingen diese Färbungen nur bei Anwendung einiger Farbstoffe und unter Verhältnissen, in denen Jod in den Schnitten vorhanden ist.

Ich will nun zuerst diese Methode, die ich als Methylviolettmethode bezeichnen will, mittheilen und ihre Anwendung an dem Beispiel von *Latania* erläutern.

Als Reagentien benutzen wir:

1. Jodjodkaliumlösung: Jod 1, Jodkalium 1, Wasser 200;
2. Schwefelsäure  $1 + 3$ , welche durch Stehen über etwas Jod, mit Jod gesättigt wurde;
3. Eine Lösung von 1 g Pyoktanin coeruleum von E. MERCK in Darmstadt, in 30 cc Wasser.

In einem Uhrgläschen von Jodjodkalium lassen wir die Schnitte von *Latania* einige Minuten lang liegen, bringen sie schnell mit einem halben Tropfen Jodjodkaliumlösung unter ein Deckglas auf den Objectträger. Wir beobachten und sehen die Membran kaum gefärbt, die Mittellamelle der Zelle als zarte Linie, an einzelnen günstigen Stellen auch die Plasmaverbindungen als kaum gelblich gefärbte Striche, die Schliesshäute durchsetzend.

Wir fügen jetzt seitlich Schwefelsäure zu und beobachten. Es tritt eine geringe Dunklerfärbung des Präparates, vorzüglich der Protoplasten ein, keine oder sehr geringe Quellung.

Wir setzen nun weiter an den Rand des Deckglases einen halben Tropfen der Pyoktaninlösung und beobachten dessen Vordringen unter das Deckglas. Wo der Tropfen die Schwefelsäure berührt, färbt er sich bräunlich gelb, und bald scheidet sich ein tröpfchenförmiger Niederschlag aus. Dringt der Farbstoff langsam vor, so färbt sich der Schnitt am Rande grünlich, und es tritt zugleich eine fast schwarze Färbung des Protoplasmas und der Plasmaverbindungen an einzelnen Stellen ein. Wir lassen den Farbstoff so noch 3 Minuten einwirken, ohne dass der ganze Schnitt vom blauen Farbstoff bedeckt wird, und tauchen dann den Objectträger mit Schnitt und Deckglas senkrecht in eine Schale mit ungefähr 400 *cem* Wasser so ein, dass die nicht vom Farbstoff erreichte Partie des Schnittes nach oben gekehrt ist und auch so vom concentrirten Farbstoff nicht erreicht wird. Wir spülen den Schnitt schnell ab und legen ihn in Glycerin auf einen reinen Objectträger. Vorher können wir ihn, wenn es nöthig ist, durch Abpinseln von dem körnigen Niederschlag, der sich oft auf dem Schnitte bildet, möglichst befreien.

Ist die Färbung gut gelungen, so erscheint die Membran hellblau, das Protoplasma schwarzblau, ebenso die Plasmaverbindungen. Die Plasmaverbindungen haben ihre Form nicht geändert.

Wir wollen nun sehen, wie die Reaction zu verstehen ist.

Im Allgemeinen hat man wohl angenommen, dass das Jodjodkalium bei allen diesen Anilinfarbstoffmethoden nur die Rolle eines Fixierungsmittels spiele. Es geht dieses z. B. aus ZIMMERMANN's Bemerkungen (ZIMMERMANN, S. 240) hervor: „Auch bei Anwendung von Schwefelsäure wurden die Schnitte meist zuvor mit einer Jodjodkaliumlösung fixirt.“ Ebenso sprechen Bemerkungen von KIENITZ (S. 8) dafür. In der That aber wirken Jod und Schwefelsäure bei einer Reaction als Beize, und die intensive Färbung ist die Folge eines auf und in der Plasmaverbindung und in den Kanälen entstehenden Niederschlages einer Jodverbindung.

Es lassen sich bei dieser Methode deshalb auch nur ganz bestimmte Farbstoffe verwenden. Das Pyoktanin MERCK's ist bekanntermassen ein sehr reines Methylviolett (ein Chlorhydrat des Pentamethylpararosanilins und des Hexamethylpararosanilins). Seine für uns wichtigsten Reactionen sind die folgenden:

Metallisch grün glänzendes Pulver; in Wasser und Alkohol mit violetter Farbe löslich. Auf Zusatz von Salzsäure wird die wässerige Lösung erst grün, dann gelbbraun; Kalilauge giebt rothe Färbung und rothen Niederschlag in der wässerigen Lösung. In concentrirter Schwefelsäure löst sich der Farbstoff mit braungelber bis gelber

Farbe, und ändert sich die Färbung bei Zusatz von mehr und mehr Wasser durch grün, blau, bis violett. In den durch Schwefelsäure in der Farbe veränderten Lösungen entsteht durch Jodjodkalium eventuell ein brauner, sehr feinkörniger, oder ein blauer, körniger, sehr intensiver Niederschlag. In der neutralen Lösung entsteht ein violetter, grobkörniger, mehr flockiger Niederschlag. (Für unsere Reaction ist die Entstehung des blauen Niederschlags am günstigsten).

Entsprechend seiner Natur lässt sich das Pyoktanin MERCK's sehr gut ersetzen durch das Methylviolett 5 B der Badischen Anilin- und Soda-Fabrik, durch das „Hoffmannsblau“ der Handlung GRÜBLER und das Methylviolett B und 5 B von BAYER & CO. in Elberfeld.

Unbrauchbar sind für diese Reaction Reginaviolett der Berliner Actien-Gesellschaft und Methylviolett 3 R der Badischen Anilinfabrik.

Alle die mit diesen Farbstoffen erhaltenen Präparate lassen sich weder in Glycerin gut conserviren, noch ertragen sie Alkoholbehandlung. Wie mein Assistent, Herr Dr. MICHAELIS, fand, lassen sich die Präparate von *Latania* jedoch sehr gut conserviren, wenn man sie aus dem Wasser herausnimmt, langsam und völlig austrocknen lässt und direct in Canadabalsam einschliesst.

Bei der eben beschriebenen Methode wird nur Schwefelsäure 1 + 3 verwandt. In der That ist es schon aus den früher erwähnten Gründen am vortheilhaftesten, wenn man so lange mit dieser schwachen Säure arbeitet, als die Düntheit der Membran eine stärkere Quellung nicht fordert oder als die Färbung der gequollenen Zellmembran nicht schwächer wird als die der ungequollenen. Stärkere Säuren wirken auch ungünstig, weil sie die Bildung eines zweckmässig dunklen Niederschlages verhindern, doch ist mit Rücksicht auf diesen Punkt Schwefelsäure 1 + 2 noch ohne Weiteres verwendbar. Muss man mit stärkeren Säuren arbeiten, so verfährt man wie früher angegeben, verwendet nur statt der Säure 1 + 3 eine stärkere Säure, zieht sie, nachdem die Quellung genügend vorgeschritten, durch Fliesspapier ab und wäscht den Schnitt, vor der Färbung mit Schwefelsäure 1 + 3, gut aus.

Da bei dieser Methode ein Niederschlag entsteht, welcher feinkörnig sein und sich leicht an der Membranoberfläche festsetzen kann, so ist es mit dieser Methode möglich, auch leere oder fast leere Kanäle der Plasmaverbindungen gut zu färben. Wenn man Schnitte von *Latania*, welche so lange mit Eau de Javelle behandelt wurden, bis das Plasma entfernt war, nach der Methode färbt, so wird man die Aussenfläche der Schnitte und die Innenflächen der Zellwände meist mit feinen Körnchen bedeckt und die Kanäle so stark mit Farbstoff gefüllt finden, dass die Kanäle deutlich und scharf blau gefärbt, wie von Fäden durchzogen erscheinen. Meist schlagen sich auch blaue Körnchen in der durch das Reagens stark gelockerten Mittellamelle nieder.

Zur Beobachtung der gefärbten Schnitte benutzt man selbstverständlich den ABBE'schen Beleuchtungsapparat mit voller Blendenöffnung und den Planspiegel. Ausgezeichnete Resultate kann man in manchen Fällen erhalten, wenn man im directen Sonnenlichte arbeitet, den Beleuchtungsapparat so einstellt, dass das Sonnenbildchen in das Object fällt und dann durch sehr dicke Rauchgläser beobachtet. Es schwindet dann das Structurbild ganz.

Botanisches Institut der Universität Marburg, Januar 1897.

### Litteratur.

- GARDINER, WALTER, On the continuity of the protoplasm through the walls of vegetable cells; Arbeiten des botanischen Instituts in Würzburg, Leipzig **1888**, S. 52.
- KIENITZ-GERLOFF, Die Protoplasmaverbindungen zwischen benachbarten Gewebeelementen in der Pflanze; Botan. Zeitung **1891**, S. 1.
- KOHL, Protoplasmaverbindungen bei den Algen; Berichte der Deutsch. Botan. Gesellsch. **1891**, S. 9.
- MEYER, ARTHUR, Das Irrthümliche der Angaben über das Vorkommen dicker Plasmaverbindungen zwischen den Parenchymzellen einiger Filicinen und Angiospermen; Berichte der Deutsch. Botan. Gesellsch. **1896**, S. 154.
- MEYER, ARTHUR, Die Plasmaverbindungen und die Membranen von *Volvox globator*, *aureus* und *tertius*, mit Rücksicht auf die thierischen Zellen; Botan. Zeitung **1896**, S. 187.
- MOORE, Studies of vegetable Biology I. Observations on the Continuity of Protoplasm; Journ. of the Linnean Society, Botany, Vol. 21, p. 595, **1886**.
- RUSSOW, Ueber die Perforation der Zellwand und den Zusammenhang der Protoplasmakörper benachbarter Zellen; Sitzungsbericht der Dorpater Naturforscher-Gesellsch., September **1883**, Bd. VI, S. 562.
- TANGL, Ueber offene Communication zwischen den Zellen des Endosperms einiger Samen; Pringsh. Jahrbücher, Bd. 12, S. 170, **1879—1881**.
- TANGL, Studien über das Endosperm einiger Gramineen; Sitzungsber. der Akademie der Wissensch. zu Wien, Bd. 92 I., S. 72, **1885**.
- TERLETZKI, Anatomie der Vegetationsorgane von *Struthiopteris germanica* Willd. und *Pteris aquilina* L.; Jahrbücher für wissenschaft. Botanik, 15. Bd., **1884**, S. 452.
- ZIMMERMANN, Die botanische Mikrotechnik, **1892**.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft](#)

Jahr/Year: 1897

Band/Volume: [15](#)

Autor(en)/Author(s): Meyer Arthur

Artikel/Article: [Ueber die Methoden zur Nachweisung der Plasmaverbindungen. 166-177](#)