

Färberische Studien an Gefäßbündeln.

Ein Beitrag zur Chemie der Elektivfärbungen.

Von

A. C. Hof.

Seit die Histologie sich der Teerfarbstoffe zur färberischen Analyse der Gewebe bedient, um morphologisch differenzierte Gewebe oder Elemente auch tinktoriell verschieden hervorzuheben, ist die Frage nach dem Zustandekommen solcher Färbungen immer noch nicht endgültig gelöst.

Während die einen den Färbeprozess auf Grund bestimmter Tatsachen als rein physikalischen Vorgang betrachten, sind andere, wie Ehrlich, Benda, Mayer, Unna, unbedingte Anhänger der chemischen Färbetheorie. O. N. Witt sucht durch seine Theorie der Färbvorgänge die schroffen Gegensätze auszugleichen.¹

Vor allem ist es Paul Ehrlich gewesen, der durch seine im Jahre 1885 erschienene klassische Arbeit „Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus“ zum erstenmal geeignete Teerfarbstoffe zum Nachweis der Reduktions- und Oxydationsorte im lebenden Organismus verwendet hat.

Er ist dadurch zum Begründer der farbenanalytischen Methodik geworden.

Die nachstehend angeführten Arbeiten von Unna und Golodetz stellen Untersuchungen dar, die auf der Ehrlichschen farbenanalytischen Methode aufbauen.

1886 hat Paul Ehrlich² gezeigt, daß es möglich ist, am Tier intra vitam Achsenzylinder und Ganglienzelle durch Methylenblau zu färben, ein Verfahren, das für die Ergründung des feineren Baues der nervösen Zentralorgane von allergrößter Bedeutung geworden ist. Die Einführung des Neutralrots zur vitalen Färbung verdanken wir farbenanalytischen Studien dieses Forschers, und ein reiches farbenanalytisches Material hat Paul Ehrlich im Verein mit Lazarus in dem Buche „Die Anaemie“ niedergelegt.

Vor kurzem ist durch die anregende Arbeit von Unna und Golodetz³ die Frage nach der Natur der histologischen Färbungen aufs neue in Fluß gekommen: beide Forscher kommen auf Grund ihrer eingehenden Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß an dem chemischen Charakter solcher Elektivfärbungen nicht zu zweifeln sei, und sie stellen weiterhin die Forderung auf, daß in Zukunft mehr als bisher bei histologischen Färbungen auf neue tinktorielle Affinitäten zwischen Farben,

¹ Diesbezügliche Literaturangabe s. Lee und Meyer, Grundzüge der mikroskopischen Technik, 1910, S. 135.

² P. Ehrlich, „Über die Methylenblaureaktion der lebenden Nervensubstanz“. Deutsche medizinische Wochenschrift, 1886, Nr. 4.

³ P. G. Unna und L. Golodetz, Die Bedeutung des Sauerstoffs in der Färberei, in: Dermatologische Studien, Bd. 22, Leipzig und Hamburg, Leopold Vof, 1912.

Gewebe und Beizen Rücksicht zu nehmen sei, da die sog. Säure-Basen-Affinität allein zur Erklärung des Zustandekommens vieler Färbungen nicht ausreiche.¹

Unna schreibt treffend über dieselbe Frage:²

„Man kann diese ganze etwa 30 Jahre währende erste Periode der färberischen Mikroskopie die morphologische nennen. Es wurden immerfort durch Färbungsdifferenzen im Gewebe neue Elemente entdeckt und genauer studiert; man hatte alle Hände voll zu tun, um nur den mühelos zuströmenden Reichtum an neuen Gebilden des tierischen Organismus einzuheimsen, zu registrieren und zu ordnen, und nahm in der Freude darüber den gelegentlichen Spott der alten Schattenmikroskopiker ruhig hin: ‚Färbungen seien keine chemischen Reaktionen‘ und ‚man wüßte ja gar nicht, was sich da eigentlich färbte‘.

Je fester aber mit der Zeit die Färbung sich als Forschungsmittel einbürgerte, und je mehr die Kenntnis der Gewebe dadurch erweitert und ausgebaut wurde, — um so spärlicher flossen im Vergleich mit früher die neuen Entdeckungen. Dafür regte sich naturgemäß immer mehr das Bedürfnis, die vielen neugefundenen, ihrer Gestalt und Lage nach bekannten Objekte nun auch ihrem Wesen und Zusammenhang nach verstehen zu lernen, und immer lebhafter wurde der Wunsch, nun auch den chemischen Charakter derselben zu ergründen.

In dieser Periode stehen wir jetzt, in der Periode der chemisch-färberischen Analyse der Gewebe. Es gilt die Färbung der Gewebe so zu verbessern und umzugestalten, daß sie zu einer Mikrochemie der Gewebe wird.“

Meine auf Anregung von Exzellenz Ehrlich im Georg Speyer-Haus zu Frankfurt a. M. ausgeführten Untersuchungen sind ein Versuch, dem von Unna angedeuteten Ziel näher zu kommen.

Fertigt man — es genügen dünne, mit dem Rasiermesser hergestellte Handschnitte — einen Querschnitt eines frischen Zweiges (Durchmesser 3—4 mm) von *Acer*, *Aesculus* oder dergl. an und bringt ihn etwa 10 Minuten in eine 1proz. wässrige Fuchsinlösung — Säurefuchsin ist hierzu nicht geeignet — so färbt sich zunächst dieser Schnitt in toto rot. Der Farbstoff Fuchsin gehört nun zu denjenigen Farbstoffen, die, wie später ausgeführt werden wird, durch geeignete Reduktionsmittel leicht in ihre Leukobasen übergehen. Als solche sind sie meist farblos oder schwach gefärbt. Bringt man also einen mit 1proz. Fuchsin in toto gefärbten Schnitt in etwa 5proz. Adurol (photographischer Entwickler), so wäre a priori zu erwarten, daß sich der ganze Schnitt entfärbt, so wie sich ja auch eine 1proz. Fuchsinlösung im Reagenzglas bei entsprechendem Zusatz von 5proz. Adurol augenblicklich unter Bildung der Leukobase entfärbt. Dies geschieht aber nicht, sondern es tritt eine prächtige Elektivfärbung bestimmter Gewebe auf, und diese Färbung ist bleibend; sie kann selbst durch die stärksten Reduktionsmittel, wie Hydrosulfit, Hyraldit usw. nicht zum Verschwinden gebracht werden, wenn der Schnitt längere Zeit in Fuchsin gelegen hatte. Ein derartiger Schnitt zeigt stets dasselbe charakteristische Bild: Rot gefärbt sind ausschließlich die sklerenchymatischen Bastbündel sowie die Vasalteile (Wassergefäße) und bei *Acer* das Mark. Die Anfärbbarkeit des letzteren variiert übrigens nach dem verwendeten Objekt; so fehlt sie völlig bei *Aesculus*. Bei manchen Pflanzen, wie

¹ P. G. Unna und L. Golodetz, Die Bedeutung des Sauerstoffs in der Färberei, in: Dermatologische Studien, Bd. 22, Leipzig und Hamburg, Leopold Voß, 1912.

² P. G. Unna, Die Sauerstofforte im tierischen Gewebe, in: Die Umschau, herausg. von Prof. Dr. F. H. Bechhold, 10. Februar 1912, Frankfurt a. M., S. 129.

Farnen, färbt auch die Rinde an; vollkommen ungefärbt bleiben hingegen die Siebteile der Gefäßbündel und das der Rinde nach innen zu anliegende Parenchym.

Die in der Mitte des Stengelquerschnitts verlaufenden Blattspurstränge zeigen ebenfalls scharf rot differenziert den Vasalteil, die Baststränge, farblos den Kibralteil ihrer Gefäßbündel. Die Differenzierung ist ideal zu nennen; die Schnitte zeigen schon bei Lupenvergrößerung gut differenzierte Bilder, deren Wirkung durch die symmetrische Anordnung der gefärbten Elemente noch wesentlich erhöht wird.

Fuchsin ist also ein Farbstoff, der vermöge seiner Reduzibilität und seiner Farbbeständigkeit gegen Reduktionsmittel, die eintritt, sobald er bestimmte Gewebe durchdrungen hat, gestattet, frische Gewebe ideal-elektiv zu färben. Wir können also hier nach dem Vorbild der vitalen Färbung zum erstenmal von einer rezenten Färbung sprechen. Es sei bemerkt, daß es mir mit geringfügigen technischen Abänderungen gelungen ist, diese Elektivfärbungen auch an fixiertem Material in derselben Brauchbarkeit zu erhalten. Auch hier beruhen diese Färbungen auf den gleichen chemischen Vorgängen wie bei frischen Schnitten.

Welches sind nun diese chemischen Prozesse, die zu einer so auffälligen Verschiedenheit im Verhalten des Farbstoffs führen?

Färbt man längere Zeit einen frischen Schnitt mit Fuchsin in toto, reduziert ihn mit 5proz. Adurol oder einem beliebigen anderen photographischen Entwickler, so tritt die geschilderte Differenzierung ein. Beläßt man nun den Schnitt im Entwicklungsbad, selbst stundenlang, so läßt sich das Fuchsin an den Stellen des Schnitts, wo es als rote Farbe erhalten blieb, nicht mehr reduzieren. Es hat also ganz offensichtlich mit dem Gewebe, das es elektiv gefärbt hat, eine feste Verbindung gebildet, die mit Reduktionsmitteln nicht mehr in die Leukobase zurückgeführt werden, also als reduktionsfest bezeichnet werden kann. An der chemischen Natur dieses Färbevorgangs ist daher nicht mehr zu zweifeln.

Daraufhin wurden eine Anzahl Farbstoffe auf ihre Reduzibilität durch geeignete Reduktionsmittel untersucht, zunächst die dem Fuchsin verwandten Farbstoffe der Triphenylmethan-Gruppe, ferner Vertreter der Nitroso-, Nitro-, Azo-, Benzidin-, Pyronin-, Oxyketon-, Oxazin-, Thiazin-, Azin-, Chinolin- und der Schwefelfarbstoffe.

Aus diesen einzelnen Gruppen wurden geprüft:

1. von Nitrosifarbstoffen: Naphtholgrün B (Bezugsquelle Grüber) ist reduzierbar.
2. von Nitrofarbstoffen:
 - a) Aurantia (Grüber): reduzierbar,
 - b) Martiusgelb (Grüber): reduzierbar,
 - c) Pikrinsäure (Grüber): ungeeignet.
3. von Azofarbstoffen:
 - a) Bismarckbraun (Grüber): reduzierbar,
 - b) Janusgrün (Grüber): leicht reduzierbar,
 - c) Methylorange (Grüber): reduzierbar,
 - d) Metanilgelb (Grüber): schwer reduzierbar,
 - e) Chromotrop (Grüber): leicht reduzierbar.
4. von Benzidinfarbstoffen:
 - a) Kongorot (Grüber): durch Reduktionsmittel tiefgehender zersetzt,
 - b) Diaminechtorange G: desgl.
 - c) Diaminrosa B extra: desgl.

5. von Triphenylmethanfarbstoffen (Grübler):

- a) Fuchsin,
- b) Malachitgrün,
- c) Methylviolett 5B,
- d) Methylblau,
- e) Äthylgrün,
- f) Äthylviolett,
- g) Methylgrün,
- h) Corallin (Aurin),
- i) Säuregrün,
- k) Gentianaviolett: alle reduzierbar.

6. von Pyroninfarbstoffen:

- a) Pyronin (Grübler) und
 - b) Bernsteinsäurerhodamin (Gesellschaft für chemische Industrie, Basel) } leicht
reduzierbar.
- Nicht reduzierbar:
- c) Eosin (Grübler),
 - d) Violamin (Echtsäureblau 3B) (Grübler),
 - e) Uranin (Grübler),
 - f) Rose bengale (Grübler).

7. von Oxyketonfarbstoffen: Alizarinblau S (Grübler): Reduzibilität fraglich.

8. von Oxazinfarbstoffen: Brillantkresylblau (Farbwerk Mühlheim, Leonhardt & Co.):
sehr leicht reduzierbar.

9. von Thiazinfarbstoffen:

- a) Methylenblau (Grübler) } beide leicht reduzierbar.
- b) Methylengrün (Grübler) }

10. von Azinfarbstoffen:

- a) Neutralrot (Grübler) }
- b) Safranin (Grübler) } leicht reduzierbar.
- c) Methylviolett (Grübler) }

11. von Chinolinfarbstoffen: Chinolinblau: nicht reduzierbar.

12. von Schwefelfarbstoffen: Echtschwarz B (Badische Anilin- und Sodafabrik, Ludwigshafen): reduzierbar.

Als Reduktionsmittel wurden hierbei verwendet:

1. Adurol in 5 proz. wässriger Lösung,
2. Glycin in 5 proz. wässriger Lösung,
3. Methol in 5 proz. wässriger Lösung,
4. Natriumsulfit in 5 proz. wässriger Lösung,
5. Hydrosulfit, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, in 2 proz. wässriger Lösung.

Mit allen diesen Reduktionsmitteln gelingt bei den meisten dieser Farbstoffe die Reduktion; freilich arbeiten hierbei die photographischen Entwickler nur bei solchen Farbstoffen prompt, die relativ leicht in ihre Leukoverbindungen übergehen, wie Methylgrün, Fuchsin, Bernsteinsäurerhodamin und ähnliche. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ hingegen reduziert alle reduzierbaren Farbstoffe äußerst schnell und sicher.

Hydrosulfit als Reduktionsmittel.

Das benutzte Hydrosulfit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ist das Natriumsalz der hydroschwefligen Säure. Es wird technisch dargestellt durch Reduktion von schwefliger Säure oder von Bisulfiten durch geeignete Metalle, z. B. Zink, oder durch Reduktion von Bisulfiten (namentlich NaHSO_3) durch den elektrischen Strom. Das durch P. Schützenberger 1869 zum erstenmal in fester Form dargestellte Salz gelangt heute hauptsächlich durch die Badische Anilin- und Sodafabrik zu Ludwigshafen und die Höchstler Farbwerke in den Handel. Die technische Verwendung des Hydrosulfits ist heute eine so weitgehende, daß hier nur auf die einschlägige Literatur hingewiesen sei: Dr. Karl Jellinek, Das Hydrosulfit, Teil I: Grundzüge der physikalischen Chemie des Hydrosulfits; Teil II: Anorganische, organische und technische Chemie des Hydrosulfits, Stuttgart, 1911 und 1912.

Es war ein glückliches Zusammentreffen, daß gerade im hiesigen Institut Hydrosulfit in frischem Zustand jederzeit zur Verfügung stand, da dasselbe bei der Reduktion der fünfwertigen Arsenverbindungen zu den allein therapeutisch wirksamen dreiwertigen Arsenverbindungen, die dem Ehrlichschen Syphilisheilmittel Salvarsan zugrunde liegen, Verwendung findet.

Die Reduktion organischer Farbstoffe durch Hydrosulfit ist lange bekannt. So läßt sich Indigo in alkalischer Lösung leicht reduzieren, eine Reaktion, die jedoch für mikrotinktorielle Zwecke wenig brauchbar ist. Ebenso ist bekannt, daß Farbstoffe der Azogruppe in neutraler oder alkalischer — in saurer Lösung zersetzt sich das Hydrosulfit vor der Reduktion — wässriger oder alkoholischer Lösung meist schon in der Kälte durch trocknes Hydrosulfit zu Leukoverbindungen reduziert werden. Diese Beobachtungen, die schon ausführlich von E. Grandmougin¹ angestellt worden sind, konnte ich bestätigen. Reduzierbar durch Natriumhydrosulfit sind ferner die Farbstoffe der Nitro- und der Chinongruppe und vor allem sämtliche Triphenylmethanfarbstoffe, die in neutraler oder alkalischer wässriger oder alkoholischer Lösung schon in der Kälte meist sofort oder nach kurzer Zeit zu farblosen oder zu in einzelnen Fällen matt gefärbten Leukokörpern reduziert werden, die durch Oxydationsmittel wie Chromsäure, Ammoniumpersulfat und andere in die Farbverbindung zurückgeführt werden können. Unna nennt dabei in seinen Studien² die Triphenylmethanfarbstoffe reversibel; da jedoch meine Untersuchungen hauptsächlich auf die Reduzibilität dieser und anderer Farbstoffe sich gründen, ihre Reoxydationsfähigkeit hierbei ohne Belang ist, sind für unsere Zwecke diese Farbstoffe nur als reduzibel zu bezeichnen. Ferner können, wovon die Färberei schon seit Jahren Gebrauch macht, die Schwefelfarben durch Hydrosulfit in ihre Leukoverbindungen übergeführt werden. Keine Angaben betreffs Reduzierbarkeit fand ich hinsichtlich der Nitrosogruppe. Grandmougin³ gibt an, daß Nitroso- β -Naphthol in alkalischer Lösung durch Hydrosulfit zur 1-Amido-2-Naphthol-4-Sulfosäure reduziert wird. Reduzibel ist auch nach meinen Beobachtungen das Eisenoxydulnatriumsalz der Nitroso- β -Naphtholmonosulfosäure, das Vert-Naphthol B, Naphtholgrün B; der Farbstoff ist im Sinne Unnas auch reversibel.

Die hier benutzten Farbstoffe der Nitrogruppe, Aurantia, Martiusgelb und Pikrinsäure zeigen verschiedenes Verhalten. Aurantia ist leicht, Martiusgelb ist schwerer reduzibel; Pikrinsäurelösung

¹ I. Berichte der Deutschen chem. Gesellschaft Berlin 39, 2494 (1906); II. Ber. 39, 3561—64 (1906); III. Ber. 39, 3929—32 (1906); IV. Ber. 40, 422—23 (1907); V. Ber. 40, 858f (1907); VI. Ber. 40, 4205—08 (1907). — (Journ. f. prakt. Chemie II).

² Unna-Golodetz, Die Bedeutung des Sauerstoffs in der Färberei: Dermatologische Studien Bd. 22, Leipzig und Hamburg, 1912.

³ Jellinek, Das Hydrosulfit II, 93.

geht bei der Reduktion zunächst in eine orangefarbene Verbindung über. Letztere entfärbt sich nach eins bis zwei Stunden zu einer blaßgelben Lösung. Farbstoffe der Benzidindergruppe wie Kongorot, Diaminechtorange G werden durch Hydrosulfit ebenfalls entfärbt, erleiden aber meines Erachtens tiefer eingreifende Umwandlungen als einfache Reduktionen. Interessant ist das Verhalten der Pyroninfarbstoffe. Während Pyronin und Bernsteinsäurerhodamin leicht reduzierbar und auch reversibel sind, werden die Lösungen von Eosin, Violamin, Uranin und Rose bengale bei Zusatz des Reduktionsmittels nur heller. Literaturangaben bezüglich der Reduzierbarkeit gerade dieser Gruppe fehlen. Leicht reduziert werden die Farbstoffe der Oxazin-, Thiazin- und Azingruppe.

Wenn auch die vorstehenden Angaben über Reduzibilität der organischen Farbstoffe keinen Anspruch auf Vollständigkeit machen können, so geht doch aus meinen Beobachtungen hervor, daß die Zahl der durch Hydrosulfit in ihre Leukoverbindungen übergehenden Teerfarbstoffe eine weit größere ist, als zurzeit bekannt ist. Es würde ein besonderes Studium sämtlicher im Handel befindlichen Marken auf Reduzierbarkeit hin erfordern, um ein abschließendes Urteil abgeben zu können; denn, wie aus dem Vorstehenden ersichtlich ist, verhalten sich ja selbst Farbstoffe derselben Gruppe — ich erinnere an die Pyroninfarbstoffe — ganz verschieden.

A. Rezent-Elektivfärbungen.

(Elektiv-Färbungen an frischem Gewebe.)

Die Färbungen wurden vornehmlich ausgeführt an Querschnitten frischer dünner Zweige von *Acer pseudoplatanus*, *Acer negundo*, *Aesculus hippocastanum* und *Pteris aquilina*. Schnitte mit dem Rasiermesser genügen; doch ließen sich auch krautige Stengel gut mit dem Kohlensäuregefrieremikrotom, 10 μ dick, schneiden. Die Schnitte gelangen am besten sogleich in die 1proz. wässrige Lösung des betreffenden reduzierbaren Farbstoffs. Als sehr günstige Farbstofflösungen dieser Art seien empfohlen 1proz. wässrige Lösungen von Fuchsin (Rosanilin), Methylgrün, Malachitgrün, Äthylgrün, Äthylviolett, Methylblau, Janusgrün, Brillantkresylblau, Methylviolett.¹

Man färbe die Schnitte in einer der angeführten Lösungen etwa zehn Minuten, bei Anwendung von Methylviolett jedoch nur eine Minute. Sollten bei Anwendung von 1proz. Methylviolettlösung bei manchen Objekten störende Überfärbungen eintreten, die der nachfolgenden Reduktion nicht weichen — es spielen bei Methylviolett offenbar Oxydationen durch den Luftsauerstoff herein — so setzen wir, um die Wirkung des Luftsauerstoffs auszuschalten, die 2proz. Hydrosulfitlösung vorher der 1proz. Methylviolettlösung bis zur Entfärbung zu und bringen die Schnitte in die so entstandene Lösung der Leukobase, ähnlich wie bei dem von U n n a inaugurierten Rongalitweißverfahren.² Solche Schnitte werden nur noch sehr gründlich in Wasser ausgewaschen und zeigen dann ohne weiteres Rezent-Elektivfärbung; über Aufbewahrung der Schnitte vgl. weiter unten.

Bei den übrigen reduzierbaren Farbstoffen hingegen bringen wir die Schnitte unmittelbar in die 1proz. wässrigen Lösungen und färben in toto. Die Schnitte müssen nunmehr differenziert werden. Dies geschieht mit frischer 1—2proz. Hydrosulfitlösung.³ Man belasse den Schnitt hinreichend lange in dieser Lösung, bis derselbe bei Lupenbetrachtung das gefärbte Gewebe deutlich von dem

¹ Man stelle durch Reagenzglasversuch fest, daß alle diese Farblösungen durch frische 1—2proz. Hydrosulfitlösungen entfärbt werden.

² U n n a, Die Reduktionsorte und Sauerstofforte des tierischen Gewebes. (Sonderabdruck aus dem Archiv für mikroskopische Anatomie, Bd. 78, 1911 [aus der Waldeyer-Festschrift].)

³ Man setze diese in kleiner Menge, am besten stets frisch an, da sie sich im Laufe weniger Stunden zersetzt.

ungefärbten Gewebe unterscheiden läßt. Alsdann wasche man gründlichst in Wasser das überschüssige Hydrosulfit nebst Leukobase aus und bringe den Schnitt in Glyzerin oder am besten in Lävulose. Später zieht man mit Kanadabalsam einen Ring um das Deckglas. Derartig rezent-elektiv gefärbte Schnitte haben sich unverändert farbenprächtig seit einem Jahr gehalten. Erwähnt sei, daß man auch zwei reduzible Farbstoffe nacheinander einwirken lassen kann, wie z. B.

1. 1 proz. Fuchsinlösung;
2. Reduktion derselben durch Hydrosulfit;
3. 1 proz. Methylgrünlösung;
4. Reduktion derselben wie oben.

Derartig gefärbtes Gewebe nimmt violetten Ton an; stellenweise tritt Metachromasie auf.

B. Doppelfärbungen.

Es lag, um Doppelfärbungen zu erzielen, nun der Gedanke nahe, durch geeignete, möglichst kontrastreiche Farben ein sekundäres Anfärben der Gewebepartien, an denen keine Verankerung der Primärfarbe stattfindet, zu erreichen. Daß diese Sekundärfarbe einer chemisch ganz anders konstituierten Farbstoffgruppe zu entnehmen war, lag ja von vornherein auf der Hand. Die Sekundärfarbe mußte eben im Gegensatz zu den angeführten Primärfarben, die allein Gefäße und Bastbündel färben (vasophil sind), möglichst an die restierenden Gewebspartien, also den Siebteil (Kribralteil) herangehen, also kribrophil sein. Die Ausbeute an solchen den Siebteil elektiv anfärbenden Farbstoffen war nicht groß; als brauchbar für diesen Zweck aus der Reihe der mir zur Verfügung stehenden Farben ergaben sich: Kongorot, am besten in $\frac{1}{2}$ proz. wässriger Lösung arbeitend; ferner Rutheniumrot, Magdalarot, Diaminechtorange G, Trypanrot und Trypanblau, alle in $\frac{1}{2}$ proz. wässriger Lösung. Bei Doppelfärbung bringt man den mit der Primärfarbe gefärbten und reduzierten Schnitt nach gründlichem Auswaschen in Wasser noch drei bis fünf Minuten in die eine oder andere wässrige Lösung obiger Farbstoffe für Sekundärfärbung. Man spült dann mit Wasser ab, bringt den Schnitt nochmals für zwei bis drei Minuten in Hydrosulfitlösung, wäscht gut aus und legt den Schnitt, der jetzt Doppelfärbung zeigt, in Lävulose zur dauernden Aufbewahrung. Das nochmalige Einlegen des Schnittes in Hydrosulfitlösung, nachdem er mit der Sekundärfarbe angefärbt worden ist, hat den Zweck, diffus verteilten Farbstoff wegzuzüßen; da sich auch bei der Sekundärfärbung der betreffende Farbstoff mit der Faser chemisch fest verbunden hat (Gewebe und Sekundärfarbstoff sind „ätzfest“ geworden), so kann diese Ätzung der sekundären Elektivfärbung an sich nicht mehr schaden. Der freie Sekundärfarbstoff hingegen, der rein physikalisch hie und da im Gewebe adhäriert, wird durch das nochmalige Hydrosulfitbad weggeätzt. Wir haben also hier beim Wegzätzen mikrochemisch denselben Vorgang vor uns, der in der Färberei als Ätzdruck und Buntätzen bezeichnet wird.¹ Es kann natürlich auch dieses nochmalige Verbringen des Schnittes in Hydrosulfitlösung der Primärfärbung keinen Abtrag mehr tun; denn, wie ausgeführt, sind ja nach eingetretener Primärfärbung die gefärbten Gewebe völlig reduktionsfest geworden. So ermöglichen Reduktionsfestigkeit der Gewebe nach der Primärfärbung, Ätzfestigkeit nach der Sekundärfärbung, die Herstellung von Differenzierungen, deren Ausfall von vornherein angegeben werden kann, da ja die chemischen Vorgänge, soweit sie überhaupt zurzeit erkannt werden können, bei diesen Doppelfärbungen klar liegen. (Über die Einzelheiten der Färbung solcher Schnitte vgl. die Tafelerklärung.)

¹ Vgl. Jellinek, l. c., Teil II, S. 184.

C. Fixage-Elektivfärbungen.

(Elektivfärbungen an fixiertem Gewebe.)

Von großem Interesse war es, das Verhalten der reduzierten Farbstoffe gegenüber fixiertem Gewebe festzustellen: denn die neue Färbemethode hatte ja nur dann weitgehendere Bedeutung, wenn es gelang, die bei der Anfärbung frischen Gewebes geltenden Gesichtspunkte auch auf die Färbung fixierter Gewebe zu übertragen. Es war zunächst zweifelhaft, ob nach der Fixation durch die bekannten Fixierungsmittel das chemische Verhalten der Zellgewebe nicht derart geändert würde, daß beim Färben die reduktionsfeste chemische Bindung zwischen Farbstoff und Gewebe jetzt ausblieb. Aus der Reihe der bekannten Fixierungsmittel schieden von vornherein als unbrauchbar die verschiedenen Osmium-Essigsäuregemische aus. Am besten bewährt haben sich 10proz. Formaldehyd und Gemische von Formaldehyd und Alkohol (Guillandsche Lösung: 1 Teil Formol, käufliches 40proz., 9 Teile Alkohol).

Färbt man Querschnitte kleiner Stengelstücke, die in Guillandscher Lösung fixiert wurden, in der geschilderten Weise, so beobachtet man, daß die reduzierten Farbstoffe jetzt bei weitem schlechter anfärben als an frischen Schnitten. Durch die Fixierung werden also die chemischen Eigenschaften der Gewebe, wie zu erwarten, wesentlich abgeändert. Daß jedoch immer noch, wenn auch stark vermindert, Affinität zwischen reduziertem Farbstoff und Gewebefaser bei fixiertem Objekt besteht, zeigt sich unschwer, da ja, wie oben gesagt, die Farbstoffe, wenn auch schlecht, immer noch anfärben. Es galt daher, Mittel und Wege zu finden, die Anfärbbarkeit der fixierten Faser durch die betreffenden Farbstoffe zu erhöhen. Es wurden zunächst bekannte Beizen der Färberei angewendet, wie Tannin, Alaun, Eisensalze, Chrombeize und andere mehr; alle, wie erwartet, mit negativem Ergebnis. Denn eine Beize beizt meist den Schnitt als Ganzes; eine Sonderstellung kommt hierin dem Eisenchlorid zu, das neben der allgemeinen beizenden Wirkung noch auf einige Gewebe elektiv beizend einwirkt. So kann das Eisenchlorid als spezifische Beize für die Endodermis des Gefäßbündels von *Pteris aquilina* gelten. Es läßt sich schon deutlich unter der Lupe beobachten, wie bei Einwirkung einer verdünnten Eisenchloridlösung mit einem Male die Grenzzellen (Endodermis) des Gefäßbündels schwarz gefärbt in die Erscheinung treten. Auffällig günstig auf die Intensität der Färbung hingegen wirkt der Zusatz einiger neutralen Salze zur Farblösung, vor allem ein Zusatz von Magnesiumsulfat, Natriumsulfat und Natriumchlorid. Durch Kontrollen kann man leicht feststellen, daß ein Farbbad mit Zusatz von Magnesiumsulfat einem Farbbad mit Zusatz von Natriumchlorid hinsichtlich der Färbegeschwindigkeit mehrfach überlegen ist.

D. Einfache Elektivfärbungen an fixiertem Gewebe.

Hierzu eignen sich dieselben reduzierten Farbstoffe, die bei der Rezent-Elektivfärbung Verwendung fanden. Die besten Resultate ergaben Farbstoffe der Triphenylmethan-, der Pyronin-, der Azingruppe. Man bringe die z. B. in Guillandscher Lösung fixierten Schnitte in das betreffende Farbbad. Ich habe nachfolgende Zusammensetzung des Farbbades gewählt, bemerke aber, daß auch andere ebenso gut arbeiten müssen, wenn man nur auf folgende drei Punkte Rücksicht nimmt:

1. Man arbeite bei fixiertem Material mit verdünnten Farblösungen.
2. Man belasse die Schnitte mindestens 4—5 Stunden in der Lösung.
3. Man füge stets als Färbeverstärker einen Zusatz von Magnesiumsulfat, Natriumsulfat oder Natriumchlorid zu.

Zusammensetzung eines der von mir benutzten Farbbäder:

$\frac{1}{4}$ proz. Lösung von Äthylviolett in Alkohol abs.	5 cc
Magnesiumsulfat, 10proz. wässrige Lösung	15 cc
Alkohol abs.	20 cc
Aqua destillata	20 cc

An Stelle des Äthylviolett kann jeder andere gewünschte Farbstoff der reduzierten Gruppen eintreten. Man färbe die Schnitte einige Stunden, wasche in Alkohol aus, reduziere in 2proz. wässriger Lösung von Hydrosulfit, bringe die Schnitte in 96proz. Alkohol, in Alkohol abs., Nelkenöl und neutralen Kanadabalsam.

Bei Anwendung von Äthylviolett zeigen die Schnitte leuchtend blauviolette Elektivfärbung des Vasalteils, ferner der Bastbündel vieler phanerogamischen Gewächse und der Rinde bei Farnen. Man beachte bei den abgebildeten Schnitten die außerordentlich scharfe Abgrenzung des gefärbten Gewebes gegenüber den ungefärbt gebliebenen übrigen Zellverbänden.

E. Doppel-Elektivfärbungen an fixiertem Gewebe.

Auch an fixiertem Material lassen sich instruktive Doppelfärbungen erzielen. Man wähle aus denselben Gründen wie bei der Färbung frischer Schnitte die dort benutzten Sekundärfarben, nur mit dem Unterschied, daß man $\frac{1}{2}$ proz. Lösungen dieser Farbstoffe in Alkohol abs. verwendet. Eine derartige Doppelfärbung verläuft also folgendermaßen: Der mit der Primärfarbe, beispielsweise Äthylviolett, gefärbte und reduzierte Schnitt gelangt noch für etwa 5 Minuten in eine alkoholische $\frac{1}{2}$ proz. Kongorot-Lösung, wird dann herausgenommen, nochmals zur Fortätzung des freien Kongorots in 2proz. Hydrosulfit gebracht, dann durch Alkohol abs. und Nelkenöl in neutralen Kanadabalsam übergeführt. Über den Ausfall der Färbung solcher Schnitte vgl. die Besprechung der Abbildungen.

F. Dreifachfärbungen an fixierten Gefäßbündeln der Farne, vor allem an solchen von *Pteris aquilina*.

Die Gefäßbündel der Farne, namentlich die von *Pteris aquilina*, bilden ihres Baues und ihrer Größe wegen ein geradezu ideales Studienobjekt für färberisch-analytische Untersuchungen. Ein solches Bündel zeigt im Querschnitt nicht weniger als sieben morphologisch differenzierte Gewebe, wozu sich noch als achttes das Grundparenchym gesellt, in das die Gefäßbündel eingelagert sind. Die sieben verschiedenen Gewebelemente sind:

- | | |
|--------------------------|-------------------------|
| 1. die Treppengefäße, | 5. die Kribralprimanen, |
| 2. die Schraubengefäße, | 6. der Perizykel, |
| 3. das Vasalparenchym, | 7. die Endodermis. |
| 4. das Kribralparenchym, | |

Färbt man nun ein solches Gefäßbündel zunächst mit einer reduzierten Farbe, wie Äthylviolett, reduziert usw., so zeigt das Bündel von den sieben Schichten nur die Treppen- und die Schraubengefäße des Vasalteils violett tingiert. Bringt man alsdann den Schnitt noch auf wenige Minuten etwa in $\frac{1}{2}$ proz. alkoholische Kongorotlösung mit nachfolgendem Hydrosulfitbad, so erscheinen jetzt auch prächtig rot gefärbt: 1. die Zellwände der Siebröhren, 2. die Zellen des Kribralparenchyms, 3. die Kribralprimanen, 4. die Zellwände des Perizykels. Ungefärbt bleibt zunächst die Endodermis. Da es nun einige reduzierbare Farbstoffe gibt, die starke Affinität zur Endodermis des Gefäßbündels zeigen,

wie Fuchsin, Bernsteinsäurerhodamin, Janusgrün u. a., so läßt sich durch Anwendung dreier differenter Farben mit nachfolgender Hydrosulfitbehandlung eine charakteristische Dreifärbung des Bündels erreichen, bei der dann Vasalteil, Kribralteil und Endodermis verschieden gefärbt sind. Interessant ist hierbei, daß die zur Elektivfärbung der Endodermis besonders geeigneten Farbstoffe, Fuchsin (Triphenylmethanfarbstoff), Bernsteinsäurerhodamin (Pyroninfarbstoff), Janusgrün (Azofarbstoff), chemisch ganz verschiedenen Gruppen entlehnt sind. Der Verlauf einer derartigen Färbung war folgender: der in Guillaudscher Lösung fixierte Stengel wurde in Querschnitte zerlegt; die Schnitte gelangten in Lösung A (vgl. die Angaben am Ende); Färbedauer 5 Stunden. Reduziert wurde in 2proz. wässriger Lösung von Hydrosulfit; ausgewaschen wurde mit Alkohol. Alsdann kamen die Schnitte in Lösung K; Färbedauer 5 Minuten; nochmaliges Hydrosulfitbad: die Schnitte gelangten dann in die Lösung N für die Dauer von 10 Minuten; sie wurden dann nochmals in ein Hydrosulfitbad eingelegt. Der Schnitt wird zuletzt durch Alkohol absol. sowie Nelkenöl in Kanadabalsam übergeführt. (Über den Ausfall der Dreifärbung vgl. die Tafelerklärung, Abb. 8.)

Bei dem Bemühen, farbanalytisch vielleicht noch die eine oder andere Gewebsschicht besonders herauszuheben, hatte ich beobachtet, daß einige Farbstoffe auch spezifische Affinität zu den Zellen des Vasalparenchyms zeigen; hierzu gehören unter anderen Äthylgrün, Brillantkresylblau und Magdalarot. Letzteres, in $\frac{1}{4}$ proz. alkoholischer Lösung, ist leicht reduzibel und kann daher als Primärfärber verwendet werden. Färbt man nun mit einer solchen Magdalarot-Lösung fixierte Schnitte für 4—6 Stunden, reduziert dieselben und färbt mit alkoholischer Diaminechtorange G-Lösung wie oben nach, so erhält man eine prächtige Doppelfärbung, bei welcher der Vasalteil rot, die übrigen Partien gelb gefärbt sind und außerdem auch die einzelnen Zellen des Vasalparenchyms metachromatisch braunrot sich anfärben. Die Doppelfärbung mit Magdalarot und Diaminechtorange G ist besonders zur Sichtbarmachung des Vasalparenchyms geeignet; sie läßt sich jedoch nur gesondert für sich anwenden und nicht noch mit anderen Farbstoffen kombinieren. Auch Äthylgrün gibt typische Färbung des Vasalparenchyms, s. Abb. 6.

Der wissenschaftliche Wert der hier besprochenen Färbemethoden liegt m. E. vor allem darin, daß an der chemischen Natur dieser Elektivfärbungen nicht zu zweifeln ist; denn wie bei der Entwicklung einer photographischen Platte durch Reduktion der Silbersalze das photographische Negativ heraustritt, so wird hier durch Reduktion an den Stellen des Schnitts, an denen eine Verankerung der Farben nicht stattgefunden hat, das Farbbild optisch entwickelt. Methoden, bei denen man den Schnitt überfärbt und dann teilweise entfärbt, heißen in der mikroskopischen Technik regressiv; man könnte also das Verfahren, das auf die Reduzibilität der Farbstoffe sich gründet, das regressivchromographische Entwicklungsverfahren nennen. „Bei der idealen Art des elektiven Färbens müßten offenbar die Elemente, die man zu tingieren vor hat, genau so viel Farbstoff an sich binden, wie man wünscht, so daß nach dem rein mechanischen Auswaschen der Farblösung aus den Interstitien des Objektes mit Hilfe desselben Mittels, worin der Farbstoff gelöst ist (also meist des Wassers oder Alkohols), diese Elemente gleich in der richtigen Intensität gefärbt zurückblieben. Farblösungen, die solches leisten, sind leider selten bequem herstellbar.“¹

Das hier niedergelegte Färbeverfahren ermöglicht nun in der Tat diese ideale Art des elektiven Färbens. Wenn Lee und Meyer² weiterhin sagen: „In der Regel lassen sich scharfe Färbungen

¹ Lee und Meyer, Grundzüge der mikroskopischen Technik, Berlin 1910, S. 133, § 206.

² l. c. S. 136, § 208.

nur an sorgfältig fixierten Geweben erzielen; tote, aber nicht eigens fixierte Gewebe färben sich gewöhnlich nicht scharf, und lebendes Gewebe färbt sich in der Regel überhaupt nicht“ — so hat dieser Satz keine Gültigkeit mehr; denn das hier ausgearbeitete Verfahren leistet ja auch an frischen, in keiner Weise eigens präparierten Geweben in bequemster Weise und kürzester Zeit — eine Rezentelektiv-Doppelfärbung kann in zehn Minuten ausgeführt werden — Hervorragendes. Gerade für Demonstrationszwecke bei histologischen Übungen sei diese Methode empfohlen, da sie Strukturfeinheiten sichtbar macht, die an ungefärbten Glycerinpräparaten niemals hervortreten.

Anatomische und physiologische Beobachtungen.

Wie zu erwarten war, ergab das Studium der elektiv gefärbten Schnitte auch ein genaueres Bild des histologischen Aufbaues der Gefäßbündel, als es bislang bekannt war. Vergleicht man die Abbildungen der Gefäßbündel von *Pteris aquilina* auf den beigefügten Tafeln mit der Abbildung desselben Objektes bei Strasburger,¹ so zeigt sich, daß die Zellen der Endodermis, verglichen mit denen des Perizykels, viel dünner sind. Ferner kann man häufiger beobachten, daß der Perizykel an einer oder auch an mehreren Stellen zwei- bis dreischichtig sein kann. Der Bau der Kribralprimanen ist wesentlich anders, als ihn die Strasburgersche Abbildung darstellt. Sie bilden einen konzentrisch zur Peripherie des Bündels verlaufenden sehr feinzelligen, zwei- bis dreischichtigen, innig zusammenhängenden Netzstrang, der scharf den Perizykel von den Siebröhren scheidet.

Wenn Strasburger fernerhin schreibt: „Die Perizykel- und Endodermiszellen entsprechen einander und weisen auf einen gemeinsamen Ursprung hin“, so hat dies vom morphologischen Standpunkt aus betrachtet Berechtigung. Physiologisch liegt die Sache aber anders; denn die tinktorielle Analyse zeigt zur Evidenz, daß Endodermis und Perizykel im ausgebildeten Gefäßbündel chemisch scharf geschiedene Individuen sind. Während sich der Perizykel mit keiner der benutzten Farben anfärben ließ, hatten sich eine Reihe von Farbstoffen spezifisch endodermophil erwiesen. Chemisch wichtig in bezug auf die durch Fixierungsmittel eintretenden Veränderungen ist das färberische Verhalten der Treppen- und Schraubengefäße im Bündel bei Schnitten durch Farnstengel, die fixiert worden sind, im Gegensatz zu dem färberischen Verhalten der Gefäße an frischen Schnitten. Letztere zeigen stets gleichartige Anfärbung; an fixierten Objekten hingegen tritt eine Differenzierung der nachfolgend geschilderten Art ein: Während die Schraubengefäße stets die Primärfarbe gleichmäßig binden, beobachtet man im Verhalten der großlumigen Treppengefäße Schwankungen in der Färbeintensität. Bei älteren Stengelschnitten binden, gründliche Reduktion vorausgesetzt, eins bis zwei der größten Treppengefäße die Primärfarbe häufig nicht mehr, sondern färben bei Doppelfärbung des Schnitts mit der Sekundärfarbe an. (Siehe die Tafelerklärung: Fig. 9.)

Mithin vollziehen sich im Bündel durch den Fixierungsprozeß an diesen Orten chemische Änderungen, die tinktoriell-analytisch ohne weiteres nachgewiesen werden können, eine Tatsache, die aufs neue zeigt, wie außerordentlich vorsichtig Färbungsdifferenzen physiologisch anzuwerten sind. In unserem Fall beruht die Verschiedenheit der Anfärbung einzelner Gefäße nicht auf physiologisch bedingten Ursachen, sonst müßte der frische Schnitt die gleiche Färbung ergeben wie der fixierte.

Es wurden ferner eine Reihe von Versuchen angestellt, die über die Aufnahme von Teerfarbstoffen durch die Gefäßbündel Aufschluß geben sollten. Eingehendere Versuche derart hat kürzlich

¹ Botanisches Praktikum.

Ernst Küster¹ angestellt. Die Versuche wurden deshalb unternommen, um das Verhalten unversehrter Pflanzenteile, die von den Gefäßen her mit Farblösung versehen werden, also vital gefärbt werden, zu vergleichen mit dem Bilde der Rezent-Elektivfärbung am mikroskopischen Schnitt. Es galt also, aus der großen Reihe der reduzierbaren Farbstoffe diejenigen zu ermitteln, denen die relativ geringste Giftigkeit für lebendes Gewebe zukommt. Zu diesem Zwecke wurden intakte Sproßstücke von annähernd gleicher Größe in 1proz. wässrige Lösungen reduzierbarer Farbstoffe gestellt und folgende drei Beobachtungen angestellt:

Steigt der Farbstoff in den Gefäßen auf? In welcher Zeit zeigt der Sproß Totalfärbung? Zeigen sich am Sproß Vergiftungserscheinungen?

Die systematische Durchführung dieser Versuche ergab eine Fülle von Beobachtungen, die mit den von Küster erhaltenen Ergebnissen im wesentlichen übereinstimmen. Küster hat ausschließlich mit sauren Farbstoffen gearbeitet,² die bisher als allein fähig galten, die Zellmembran zu durchdringen. Meine Versuche haben nun aber auch für mehrere basische Farbstoffe gezeigt, daß sie, und zwar ganz hervorragend, geeignet sind, die Zellmembran vital färbend zu durchdringen. Ein basischer Farbstoff von geradezu souveränem Vitalfärbevermögen ist der Pyroninfarbstoff Bernsteinsäurerhodamin. Ein in eine 1proz. wässrige Lösung dieses Farbstoffs gestellter am besten blühender Sproß zeigt nach 20 Minuten bereits leuchtend rote Färbung der gesamten Nervatur von Blatt und Blüte. Vergleicht man nun Querschnitte solcher vital gefärbten Sprosse mit Querschnitten eines Sprosses, die man rezent-elektiv gefärbt hat, so zeigt der vital gefärbte Sproß nur Tinktion der Wände der Wassergefäßbahnen, während die rezent-elektiv gefärbten Schnitte bei Vorhandensein von Bastbündeln im Gefäßbündel, wie bei *Aesculus*, außer den Wasserbahnen auch diese gefärbt zeigen, ein Beweis, daß Vitalfärbung und Rezentfärbung verschiedene Vorgänge sind.

Bernsteinsäurerhodamin zeigt sich seiner geringen Toxizität wegen vielen sauren Farbstoffen überlegen; die damit vital gefärbten Sprosse halten bei völliger Frische wochenlang ihre Färbung, wenn man sie nach der Anfärbung aus der Farblösung herausnimmt und in reines Wasser stellt.

Es liegt der Gedanke nahe, die vorstehend geschilderten Elektivfärbungsverfahren auch an tierischem Gewebe zu versuchen. Weitere Studien werden zeigen, inwieweit färberische Versuche an tierischem Gewebe mit den oben geschilderten Tatsachen in Einklang zu bringen sind.

¹ Über die Aufnahme von Anilinfarben in lebende Pflanzenzellen. Jahrb. f. wissensch. Botanik, Bd. 50, 3. Heft, 1911.

² l. c. S. 287.

Besprechung der Abbildungen.

Vorbemerkung.

Sämtliche abgebildeten Schnitte sind mit Hilfe des Lumière-Verfahrens mikrofarbenphotographisch aufgenommen. Die Abbildungen sind dann nach diesen unretouchierten Lumière-Aufnahmen im Vierfarbendruck angefertigt worden.

Die Ausführung sowohl der mikrofarbenphotographischen Aufnahmen als auch des Tafeldrucks erfolgte durch die Lithographische Kunstanstalt Werner & Winter in Frankfurt a. M.

Für die tadellose Ausführung der sehr schwierigen photographischen Aufnahmen möchte ich Herrn Dr. Fritz W. Winter, dessen unermüdlicher Arbeit ich sie verdanke, an dieser Stelle ganz besonders meinen Dank aussprechen.

Sämtliche Abbildungen stellen Querschnitte dar. Alle Schnitte sind Freihandschnitte. Die Färbungsgegensätze der einzelnen Gewebe sind bei Anwendung starker Vergrößerungen noch typischer als bei Verwendung schwacher Vergrößerungen.

Tafel I.

Abbildung 1:

Junger Zweig von *Syringa vulgaris* L. (Querschnitt). Fixierung: Guillaudsche Lösung. Färbung: als Primärfarbe ist verwendet: Äthylviolett (Lösung A)¹; als Sekundärfarbe ist benutzt: Kongorot (Lösung B). Einbettung: neutraler Kanadabalsam.

An den violett gefärbten Stellen des Schnittes hat sich die Primärfarbe chemisch mit der Faser verbunden, an den rot gefärbten Stellen die Sekundärfarbe.

Schwach rot gefärbt erscheint das Mark (M). Es folgt nach außen als breites violettes Band der Vasalteil (V) (Wassergefäßteil) mit seinen großlumigen Punktgefäßen. Scharf grenzt der Rand des Wassergefäßteils an die nunmehr nach außen hin folgende rot gefärbte Kribralzone (K). Es lagert sich um die Kribralzone der durch seine regelmäßigen Unterbrechungen auffallende, tief violett gefärbte Ring sklerenchymatischer Bastbündel (BB); es folgen weiterhin, rot gefärbt, das vielschichtige Rindengewebe (R); auf dieses, violett gefärbt, ein mehrschichtiges Periderm (P) und als letzter, dünnster Ring zu äußerst in violetterm Ton die Epidermis (E).

Abbildung 2:

Querschnitt durch einen jungen Blattstiel von *Acer negundo*. Der frische Schnitt wurde gefärbt. Die Färbung verlief folgendermaßen: Der Schnitt gelangte:

1. in 1proz. wässrige Methylviolettlösung — 10 Minuten,
2. er wurde gut ausgewässert,
3. Reduktion erfolgte in 5proz. wässriger Adurollösung,
4. er wurde gut ausgewässert,
5. in 1/2proz. wässrige Rutheniumrotlösung — 2 Minuten,
6. er wurde wiederum mit Wasser ausgewaschen

und dann in Lävulose (Dr. G. Grübler & Co., Leipzig) eingebettet

Das Mark (M) bleibt ungefärbt; im Inneren des Marks liegen halbkreisförmig angeordnet die Blattspurstränge (B). Alle Vasalteile derselben sind deutlich violett gefärbt; rot ist hingegen der Siebteil der Blattspur gefärbt. Betrachten wir jetzt die kollateral gebauten Gefäßbündel des Blattstiels. Die Bündel haben sich bereits ringförmig zusammengeschlossen, lassen jedoch ihre ursprüngliche Keilform noch erkennen. Die nach innen liegenden Vasalteile mit ihren großen Gefäßen (V) sind violett gefärbt; ebenso sind leuchtend violett gefärbt die nach außen liegenden ringförmig angeordneten sklerenchymatischen Bastbündel (BB); zwischen Bastbündel und Vasalteil eines jeden Bündels liegt rot gefärbt der Kribralteil (K). Das Rindenparenchym (R) zeigt rote Färbung; hingegen ist die Epidermis (E) leuchtend violett gefärbt.

¹ Die Zusammensetzung der benutzten Farblösungen A bis N ist am Ende der Arbeit angegeben.

Abbildung 3:

Querschnitt durch einen jungen Stamm von *Aspidium filix mas* L. Fixierung: 60proz. Alkohol. Färbung: Primärfarbe: Äthylviolett (Lösung A), Sekundärfarbe: Kongorot (Lösung B). Einbettung: neutraler Kanadabalsam.

Schwach rot angefärbt erscheint das Mark (M); in ihm eingelagert sind fünf Gefäßbündel; letztere stellen den Typ des konzentrischen Leitbündels dar; wir finden daher die primär violett gefärbten Vasalteile (V) in der Mitte des Bündels, umgeben von dem sekundär rot gefärbten Kribralteil (K), beide Gewebelemente gemeinsam nach außen von der in natura braunschwarz gefärbten Endodermis (Ed) umgeben; im Gefäßbündel erkennt man das zwischen den Wassergefäßen liegende, deutlich rot gefärbte Vasalparenchym (Vp). Die sklerenchymatische Rindenteil (R) zeigt violette Primärfärbung.

Abbildung 4:

Partie aus dem Querschnitt durch einen jungen Blattstiel von *Aesculus hippocastanum* L. Fixierung: Guillandsche Lösung. Färbung: Primärfarbe: Methylblau (Lösung G), Sekundärfarbe: Kongorot (Alkohol-Lösung dess.), (Lösung B).

Nach dem Mittelpunkt des Schnittes zu erblicken wir die Blattspurstränge (B), nach der Peripherie zu die keilförmigen, kollateralen Gefäßbündel, die sich zu einem Ring, der zur Peripherie des Schnittes konzentrisch verläuft, zusammengefügt haben.

Der Blattspurstrang zeigt konzentrischen Aufbau seines Leitungsgewebes. Der sekundär rot gefärbte Siebteil (K) ist umschlossen von dem primär blau gefärbten Vasalteil (V) mit seinen großen Gefäßen.

Die Gefäßbündel zeigen tiefe Blaufärbung der sklerenchymatischen Bastbündelklappen (BB), ferner des Vasalteils (V), sowie der Grenze zwischen je zwei Bündeln. Sekundäre Rotfärbung zeigt der unter den Sklerenchymklappen liegende Siebteil. Rot gefärbt erscheinen die nach dem Mittelpunkte des Schnittes gerichteten Enden der Gefäßbündel; Mark und Rindenschicht sind schwach rot gefärbt.

Abbildung 5:

Querschnitt durch den Stamm von *Euphorbia Cyparissias* Scop. Fixierung: 60proz. Alkohol. Färbung: Äthylviolett (Lösung A) als Primärfarbe und Kongorot (Lösung B) als Sekundärfarbe. Einbettung: neutraler Kanadabalsam. Vasalteil (V) primär violett gefärbt, alles übrige Gewebe sekundär rot; im Mark erscheinen einige Zellen violett gefärbt.

Die Abbildungen 6—9 stellen Färbungen dar, die an Querschnitten durch den Stamm von *Pteris aquilina* L. ausgeführt wurden. Die Gefäßbündel gerade dieses Farns sind ihrer Größe und ihres zusammengesetzten Baues halber hervorragend zu farbanalytischen Versuchen geeignet; die Schnitte lassen sich sowohl frisch als fixiert mit Leichtigkeit elektiv färben. Abgebildet wurden jedoch jedesmal nur ein bis zwei Bündel, da die übrigen Bündel des Stammes dieselben Färbungen zeigen.

Abbildung 6:

Einzelnes Gefäßbündel von *Pteris aquilina* L. Querschnitt: Fixierung: Guillandsche Lösung. Färbung: Primärfarbe: Äthylgrün (Lösung J). Sekundärfarbe: Diaminocchorange G (Lösung K). Einbettung: neutraler Kanadabalsam.

In das gelb gefärbte Mark (M) eingelagert liegt das elliptisch gestaltete Gefäßbündel. Es ist umgeben von der dunkel gefärbten einschichtigen Endodermis (Ed); konzentrisch zu ihr folgt der aus zwei Zellschichten gebildete Perizykel (p), dann ein engmaschiges, mehrschichtiges Gewebe, die Kribralprimanen (Kp); auf diese die Siebröhren (S); zwischen letzteren, grün gefärbt, die Zellen des Vasalparenchyms (Vp), die namentlich am Rande des großen Gefäßstrangs starke Anhäufung zeigen. Es folgen zu innerst die großen Treppengefäße (Tr) in typisch leuchtend grüner Anfärbung, sowie ihnen angelagert, zahlreiche grün tingierte Spiralgefäße (Sp).

Der Schnitt soll besonders die Anfärbung des Vasalparenchyms durch Äthylgrün zeigen, ein Gewebe, das sich nur noch durch einige wenige andere Farben anfärben läßt (vgl. im Text S. 476).

Abbildung 7:

Zwei Gefäßbündel eines jungen Stammes von *Pteris aquilina* L. Stammquerschnitt. Fixierung: Guillandsche Lösung. Färbung: Primärfarbe: Äthylgrün (Lösung J); Sekundärfarbe: Trypanrot (Lösung L). Treppen- und Spiralgefäße haben Äthylgrün gebunden, alle übrigen Schichten Trypanrot; die Endodermis hat ihre in natura braune Färbung unverändert beibehalten, denn weder Primär- noch Sekundärfarbe sind endodermophil.

Abbildung 8:

Großes Gefäßbündel von *Pteris aquilina* L. Querschnitt. Fixierung: Guillandsche Lösung. Es liegt **eine Dreifach-Elektiv-Färbung** vor. Primärfarbe: Äthylviolett (Lösung A). Sekundärfarbe: Diaminechtorange (Lösung K). Tertiärfarbe: Bernsteinsäurerhodamin (Lösung N). Einbettung: Neutraler Kanadabalsam.

Das dreistrahlig ausgebildete Bündel wird an Rande von der durch das endodermophile Bernsteinsäurerhodamin rot gefärbten Endodermis (Ed) gegen das gelblich gefärbte Mark (M) abgegrenzt. Es folgt der hier zweischichtige Perizykel (p), der gelblich angefärbt ist; scharf gelb gefärbt hebt sich der engmaschige Zellverband der Kribralprimanen (Kp) heraus; es folgen die größeren Siebröhren (S), zwischen denen man die Färbung des Vasalparenchyms (Vp) erkennt. Die Primärfarbe — Äthylviolett — hat die großlumigen Treppen- (Tr) und die engeren Spiralgefäße (Sp) angefärbt. Bei x sind ebenfalls violett die Verdickungsleisten des Treppengefäßes angefärbt.

Abbildung 9:

Einzelnes Gefäßbündel aus einem älteren Stamm von *Pteris aquilina* L. Querschnitt. Fixierung: Guillandsche Lösung. Primärfärbung: Äthylviolett (Lösung A). Sekundärfärbung: Brillantkresylblau + Methylgrün (Lösung M). Eingebettet in neutralen Kanadabalsam.

Während sich bei jüngeren Gefäßbündeln die großen Gefäße (Treppen- und Spiralgefäße) des Vasalteils stets gleichmäßig anfärben, wie sämtliche Abbildungen es bisher zeigen,¹ tritt bei älteren Gefäßbündeln ein deutlicher tinktorieller Unterschied zwischen den morphologisch gleichwertigen Treppengefäßen hervor.

Die größten Treppengefäße, also die ältesten des Bündels, verankern nicht mehr die Primärfarbe (Äthylviolett), sondern färben offenbar mit dem Sekundärfarbgemisch (Brillantkresylblau + Methylgrün) an (T₁); jüngere Treppengefäße, blaugefärbt (T₂).

Der Schnitt ist lange gefärbt und stundenlang mit Hydrosulfit behandelt worden, so daß die Gefäßdifferenzierung nicht etwa durch unzureichendes Auswaschen zustande gekommen ist.

Brillantkresylblau und Methylgrün sind beide endodermophile Farbstoffe, daher die Endodermis blaugrün erscheint (Ed).

¹ Man vergleiche Abbildung 7 — Färbung junger Gefäßbündel — mit Abbildung 9.

Zusammensetzung der Farbstofflösungen,
die bei der Färbung der abgebildeten Schnitte benutzt wurden.

Lösung A.*

1/4 proz. Äthylviolettlösung (in absolutem Alkohol)	5 cc
10 proz. wässrige Magnesiumsulfatlösung	15 cc
Absoluter Alkohol	20 cc
Destilliertes Wasser	40 cc.

Lösung B.

1 proz. wässrige Lösung von Kongorot	5 cc
Absoluter Alkohol	45 cc.

Lösung C.

1 proz. wässrige Lösung von Fuchsin (Rosanilin).

Lösung D.*

1 proz. wässrige Methylgrünlösung.

Lösung E.

1 proz. Methylviolettlösung (wässrig).

Lösung F.

1/2 proz. wässrige Rutheniumrotlösung.

Lösung G.*

1/2 gr Methylblau wird in ein wenig destilliertem Wasser gelöst, alsdann werden
50 cc absoluten Alkohols zugesetzt.

Lösung H.

1/2 proz. wässrige Kongorotlösung.

Lösung I.*

1/2 proz. Äthylgrünlösung (in 96 proz. Alkohol)	5 cc
10 proz. wässrige Magnesiumsulfatlösung	15 cc
Absoluter Alkohol	20 cc
Destilliertes Wasser	40 cc.

Lösung K.

1 proz. wässrige Lösung von Diaminechlororange G	10 cc
96 proz. Alkohol	90 cc.

Lösung L.

1 proz. Lösung von Trypanrot in absolutem Alkohol

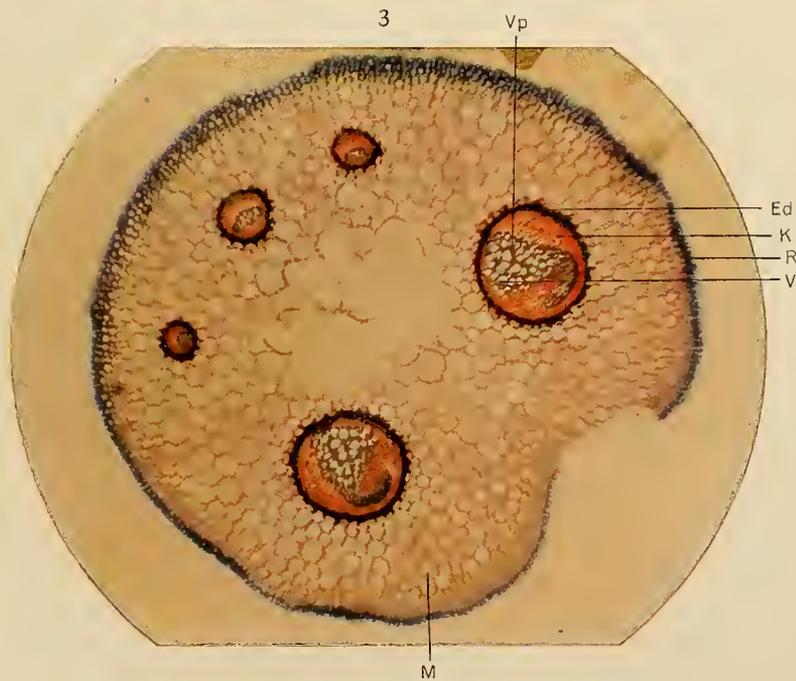
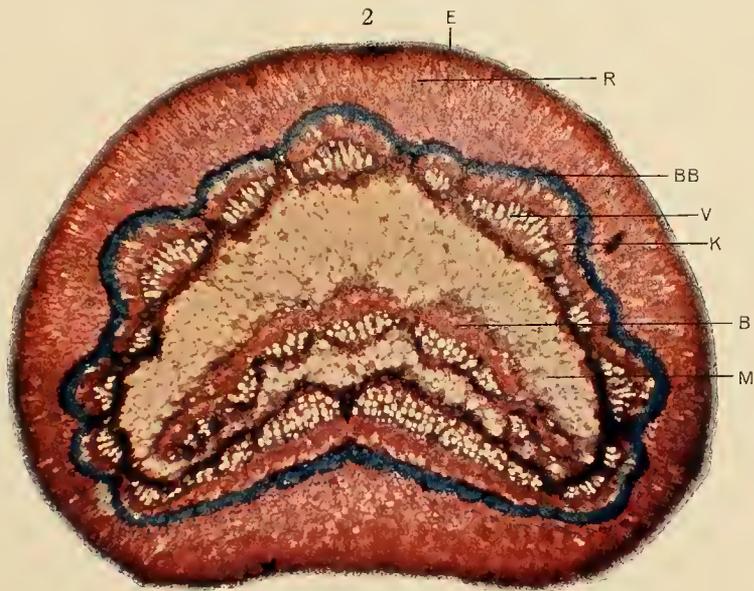
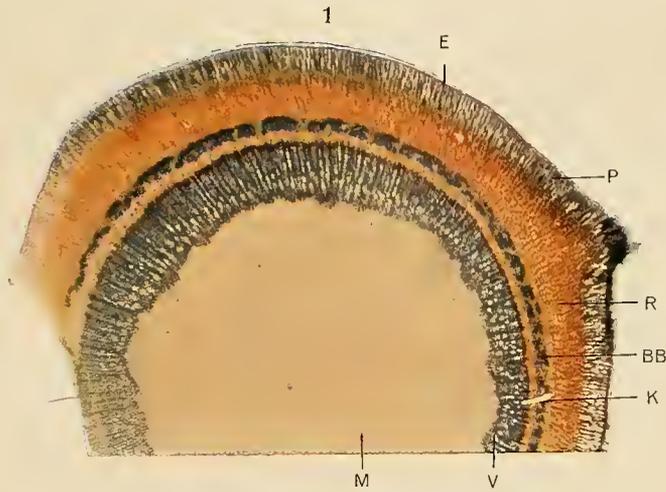
Lösung M.

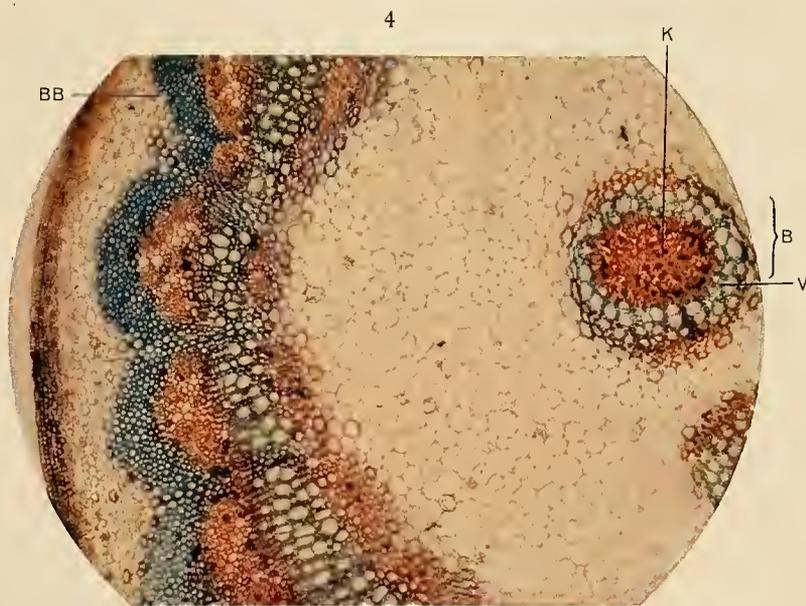
1 proz. wässrige Lösung von Brillantkresylblau	10 cc
1 proz. wässrige Lösung von Methylgrün	20 cc
Absoluter Alkohol	70 cc.

Lösung N.

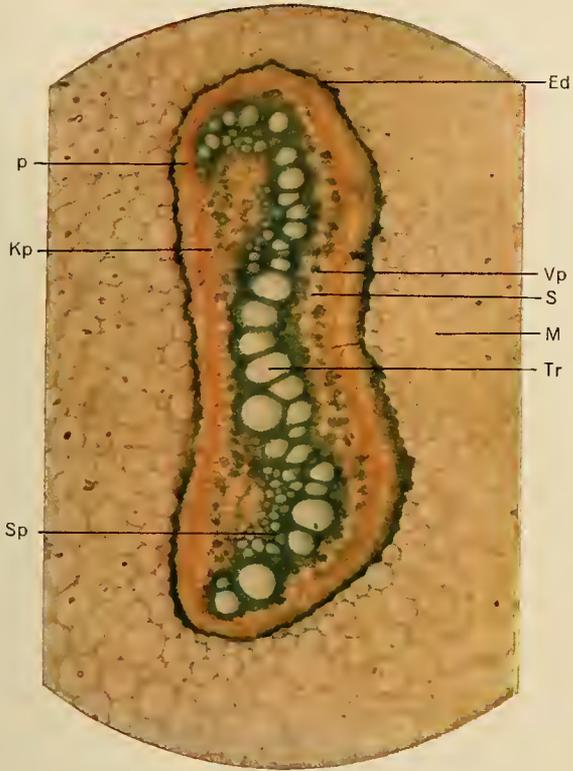
1 proz. Lösung von Bernsteinsäurerhodamin in 96 proz. Alkohol.

Anmerkung: Die meisten der obigen Farbstoffe wurden von Dr. G. Grübler & Co., Leipzig geliefert.
Die mit * versehenen Lösungen müssen 6–12 Stunden einwirken; die übrigen Lösungen nur
2–10 Minuten.





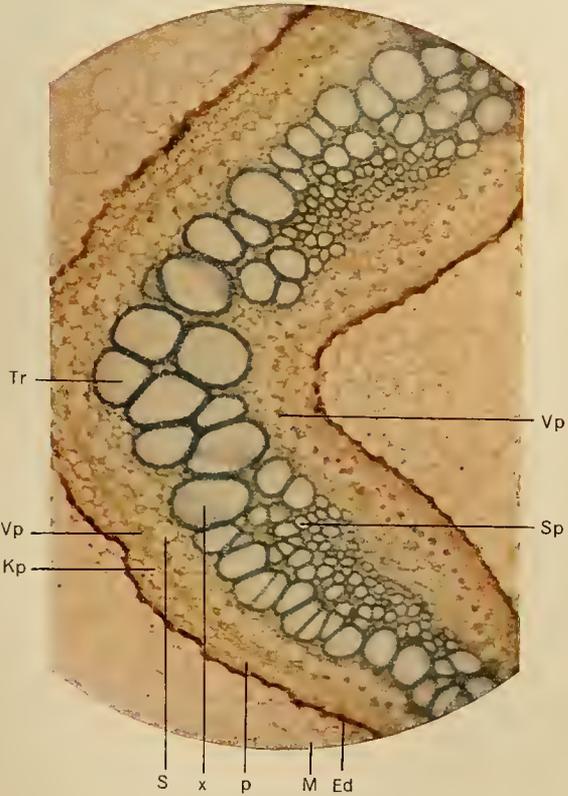
6



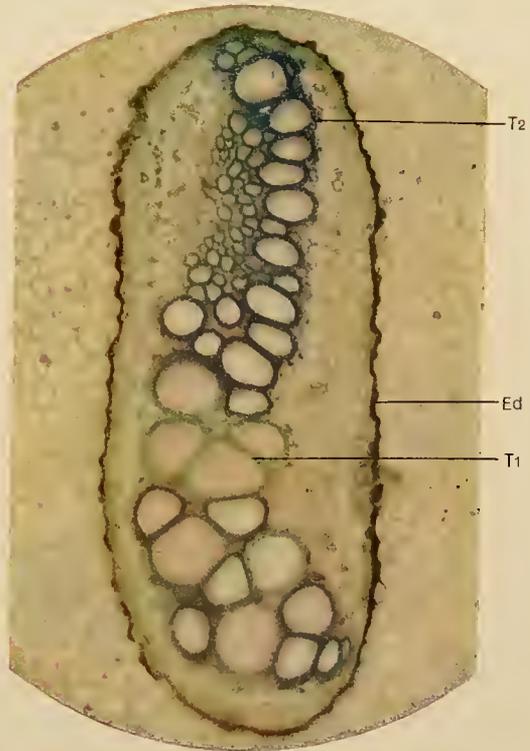
7



8



9



ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft](#)

Jahr/Year: 1910-1913

Band/Volume: [31_1910-1913](#)

Autor(en)/Author(s): Hof A. C.

Artikel/Article: [Färberische Studien an Gefäßbündeln. Ein Beitrag zur Chemie der Elektivfärbungen. 463-482](#)