

28. E. Zacharias: Ueber Nachweis und Vorkommen von Nucleïn.

Eingegangen am 27. Juli 1898.

Am Schlusse meiner Mittheilung „Ueber einige mikrochemische Untersuchungsmethoden“¹⁾ habe ich der Angabe HEINE's²⁾ gegenüber, dass schon nach 1—1½-stündiger Pepsinverdauung bei 40° C. Salamander-Spermatozoenköpfe und Mitosen völlig ausgelaugt seien, und dass von den Chromosomen nur die Plastinhüllen zurückblieben, meine abweichenden früheren Befunde betont. Bei den in grosser Anzahl von mir angestellten und beschriebenen Verdauungsversuchen fand ein „Auslaugen“ der Chromatinkörper, wie es HEINE beschreibt, nicht statt. Nach Einwirkung der Verdauungsflüssigkeit traten die Chromatinkörper des Zellkernes stets ungemein scharf im mikro-kopischen Bilde hervor. Meine früheren Versuche waren in der Weise angestellt, dass ich eine Verdauungsflüssigkeit von der in meiner Arbeit über die chemische Beschaffenheit des Zellkerns³⁾ angegebenen Zusammensetzung entweder auf frisches Material, oder auf solches, welches eine Alkoholbehandlung von verschiedener Dauer erfahren hatte, einwirken liess. Die Zeitdauer der Einwirkung und die Höhe der Temperatur während derselben wurde bei den verschiedenen Versuchen mehrfach abgeändert. HEINE (briefliche Mittheilung) gewann seine Pepsinsalzsäure durch Verreiben von frisch abpräparirter Schweinsmagen-Schleimhaut mit 0,8 pCt. HCl. Mithin war seine Verdauungsflüssigkeit in anderer Weise hergestellt als die meinige. Ob etwa hierdurch und etwaige sonstige Besonderheiten seines Verfahrens oder durch andere Umstände seine abweichenden Angaben bedingt wurden, mag dahingestellt bleiben. Jedenfalls löst sich bei dem von mir beschriebenen Verfahren ein bestimmter Bestandtheil der untersuchten Chromatinkörper im Zellkern, das Kernnucleïn⁴⁾,

1) Ber. der Deutschen Bot. Gesellsch. 1896.

2) Die Mikrochemie der Mitose, zugleich eine Kritik mikrochemischer Methoden. Zeitschr. für physiologische Chemie, Bd. XXI.

3) Bot. Ztg. 1881.

4) E. ZACHARIAS, Ueber die chemische Beschaffenheit von Cytoplasma und Zellkern. Ber. der Deutschen Bot. Gesellsch. 1893, S. 300. Der Namen „Kernnucleïn“ ist nicht schön, aber zweckentsprechend. Derselbe ist übrigens schon von anderer Seite in etwas abweichendem Sinne verwendet worden. — KOSSEL, Weitere Beiträge zur Chemie des Zellkerns. Zeitschrift für physiolog. Chemie, 1886. — MIESCHER, Biologische Studien über das Leben des Rheinlaches im Süsswasser. Vortrag, gehalten vor der naturforschenden Gesellschaft in Basel, 1890. Histochemische und Physiolog. Arbeiten, 1897.

nicht auf, noch quillt er, während bestimmte Eiweissstoffe in Lösung gehen. Mein Verfahren gestattet eine scharfe mikrochemische Unterscheidung dieser Eiweissstoffe vom Kernnuclein. Sollten Gewebsarten aufgefunden werden, deren Chromatinkörper sich gegen künstlichen Magensaft bei gleichartiger Verwendung desselben anders verhalten als die von mir untersuchten, so würde damit nicht bewiesen sein, dass man den Magensaft nicht als geeignetes mikrochemisches Reagens verwenden könne¹⁾, sondern lediglich, dass die Beschaffenheit der betreffenden Gewebe sich von derjenigen der bisher untersuchten unterscheidet. Es würde dann zu untersuchen sein, ob etwa besondere in diesen Geweben vorhandene Stoffe die Reactionen der Chromatinkörper modificiren, oder ob diesen letzteren jene Substanz fehlt, als deren Verdauungsrest das Kernnuclein bei den seither untersuchten Chromatinkörpern erschien.

Dass die Pepsin-Reaction genüge, um das Kernnuclein in der Zelle mikrochemisch zu erkennen und von allen anderen Inhaltsstoffen zu unterscheiden, kann selbstverständlich nicht behauptet werden. Nur das gesammte Verhalten des Kernnucleins zu einer Mehrzahl von Reagentien kann hier massgebend sein. Wenn es Histologen giebt, die geneigt sind, eine Reaction deshalb als unbrauchbar zu verwerfen, weil sie nicht ohne Weiteres eindeutig ist, so muss ihnen gegenüber an die jedem Chemiker geläufige Thatsache erinnert werden, dass es überhaupt sehr viele chemische Verbindungen giebt, welche sich nicht durch eine einzige Reaction hinreichend charakterisiren lassen.

Neuerdings hat sich FISCHER²⁾ wiederholt dahin ausgesprochen, dass es keine Kernfarbstoffe gäbe. Wenn unter „Kernfarbstoff“ ein Farbstoff verstanden wird, dessen Verwendung es ermöglicht, ohne Weiteres eine Entscheidung darüber zu treffen, ob irgend ein fraglicher Körper ein Zellkern sei oder nicht, so wird die Richtigkeit des FISCHER'schen Satzes von Niemandem anzuzweifeln sein. Ein allgemeines Reagens auf Zellkerne besitzen wir nicht³⁾. Wohl aber giebt

1) Vergl. HEINE, l. c. S. 499.

2) Untersuchungen über den Bau der Cyanophyceen und Bacterien. Leipzig 1897. — FISCHER's Bemerkung mir gegenüber auf Seite 13 ist wohl als eine Folge mangelhafter Kenntniss meiner Publicationen zu betrachten.

3) Es mag hier übrigens darauf hingewiesen werden, dass von MIESCHER (Physiologisch-chemische Untersuchungen über die Lachsmilch, Leipzig 1896, S. 50) ein „Verfahren zur vollständigen und sicheren Isolirung der Kerne der Hodenzellen (des Lachses), das auch bei anderen Geweben verwendbar ist,“ benutzt worden ist. „Das Verfahren besteht in der Behandlung der Hodensubstanz mit einer Lösung von krystallisirter Galle oder taurocholsaurem Natrium und Chlorcalcium.“ Dabei soll das Protoplasma vollkommen aufgelöst werden, während die Kerne erhalten bleiben. Einige von mir mit pflanzlichen Geweben angestellte Versuche ergaben keine entsprechenden Resultate. Dieselben sind allerdings noch weiterer, eingehenderer Prüfung bedürftig. Verschiedenheiten hinsichtlich der von MIESCHER

es Reagentien auf bestimmte, in den meisten untersuchten Kernen, nicht aber im Zellprotoplasma nachgewiesene Substanzen. Als solche Reagentien lassen sich mit wesentlichem Vorthail bei sorgfältig geordnetem (nicht etwa beliebig modificirtem) Verfahren bestimmte Farbstoffe verwenden. Die Entscheidung der Frage, ob die im Kern auftretenden Färbungen auf der Bildung „chemischer Verbindungen“ beruhen oder nicht, ist für die Entscheidung über die Brauchbarkeit der Färbungen als Erkennungsmittel für bestimmte Stoffe nicht von ausschlaggebender Bedeutung¹⁾. Auch der Umstand, dass sich z. B. ausser dem Kernnuclein bei bestimmtem Färbeverfahren auch sonstige Zellbestandtheile färben können, schliesst die Brauchbarkeit dieser Färbeverfahren für die Erkennung des Nucleins keineswegs aus. Der Umstand, dass Wasser ausser dem Rohrzucker auch viele andere Stoffe löst, bildet kein Hinderniss dafür, die Löslichkeit des Rohrzuckers in Wasser in Verbindung mit sonstigen Eigenschaften des Rohrzuckers als Erkennungsmittel für letzteren zu benutzen.

Die Ergebnisse einer abermaligen Nachprüfung der Einwirkung von künstlichem Magensaft unter verschiedenen Bedingungen sowie bestimmter Farblösungen auf den Zellinhalt bilden den Gegenstand der vorliegenden Mittheilung. Namentlich wurde das mikrochemische Verhalten der Spermatozoen des Lachses einer erneuten Prüfung unterzogen, da eine gründliche Kenntniss dieses Verhaltens der durch MIESCHER makrochemisch so eingehend bearbeiteten Zellen den Ausgangspunkt für das mikrochemische Studium anderer Zellen zu bilden vermag, deren makrochemische Untersuchung nicht thunlich ist.

Untersucht man in Alkohol aufbewahrte Spermatozoen des Lachses in Alkohol mit ZEISS' Apochromat 2,0 mm, 1,40 Apert., Compensations-Ocular 6, so erkennt man mit voller Schärfe an den Köpfen eine glänzende Hülle, welche einen Innenraum von dem Aussehen der umgebenden Flüssigkeit umschliesst (vergl. den Holzschnitt diese Berichte 1896, S. 273). In Alkohol aufbewahrte Spermatozoen zeigten nach 25stündigem Verweilen in Salzsäure von der Concentration 0,28 pCt.

und mir benutzten Reagentien könnten in Betracht kommen. Ich verwendete von GRÜBLER in Leipzig bezogenes taurocholsaures Natrium und Chlorcalcium, *cryst. pur. pro analysi* von MERCK in Darmstadt, ferner glykocholsaures Natrium, hergestellt durch Auflösen in kohlsaurem Natrium von Glykocholsäure, welche ich der Freundlichkeit des Herrn Prof. HÜFNER verdanke.

1) Vergl. hierzu PAUL MAYER, Beruht die Färbung der Zellkerne auf einem chemischen Vorgang oder nicht? *Anatom. Anzeiger*, XIII. Bd., Nr. 12, 1897. — GALEOTTI sagt in seinem „Beitrag zur Kenntniss der bacteriellen Nucleoproteide“ (*Zeitschr. für physiolog. Chemie* 1898): „Diese verschiedenen Grade des Färbungsvermögens, welche mit der chemischen Constitution des Körpers im Zusammenhang scheinen, und z. B. denjenigen der Löslichkeit in verschiedenen Menstruen analog sind, können dazu dienen, die untersuchte Substanz zu charakterisiren und besser zu bestimmen.“

HCl und Färbung mit einem Gemisch von Methylenblau und Fuchsin S¹⁾ blau gefärbte Kopfhüllen, welche scharf von einem nicht blau gefärbten Innenraum abgegrenzt waren. Ob dieser Innenraum roth oder gar nicht gefärbt sei, blieb fraglich.

Für die Verdauungsversuche wurde ausser der bei meinen früheren Arbeiten benutzten Verdauungsflüssigkeit aus Schweinemagen ein nach der Vorschrift von KLUG²⁾ aus Hundemagen hergestelltes Pepsin verwendet. Dieses Präparat war im chemisch-hygienischen Institute von Dr. CARL ENOCH in Hamburg vor den Versuchen frisch bereitet worden und wurde in zugeschmolzenen Glasröhrchen bezogen. Diese enthielten je 1 *ccm* Lösung von der Zusammensetzung 0,01 Pepsin, 5 *ccm* $\frac{1}{1}$ n. HCl, H₂O ad 100 *ccm*. Bei längerer Aufbewahrung vermindert sich die Wirksamkeit des Präparates. Die Verdauungsflüssigkeit aus Schweinemagen wurde stets unmittelbar vor den Versuchen durch Vermischen von 1 Vol. Glycerinextract aus Schweinemagen mit 3 Vol. Salzsäure von der Concentration 0,28 pCt. HCl hergestellt.

Der Kürze halber soll im Folgenden die aus Schweinemagen bereitete Verdauungsflüssigkeit mit dem Buchstaben „S“, die aus Hundemagen hergestellte mit dem Buchstaben „h“ bezeichnet werden. Die Wirksamkeit der Flüssigkeiten wurde einerseits durch in Alkohol aufbewahrtes Fibrin, andererseits durch Hühnereiweiss geprüft. Letzteres ist nach KLUG³⁾ hier besser geeignet, da Fibrin schon durch verdünnte Salzsäure angegriffen werden kann. Es wurde sowohl in Wasser gekochtes Hühnereiweiss, als auch durch Alkohol coagulirtes verwendet. Zur Darstellung des letzteren Präparates wurde frisches Hühnereiweiss durch ein Leinentuch gedrückt, dann durch absoluten Alkohol gefällt, mit destillirtem Wasser ausgewaschen bis das Waschwasser nicht mehr alkalisch reagirte und schliesslich in Alkohol aufbewahrt. Von diesem Präparate pflegten nach der Einwirkung von Pepsinlösungen minimale Reste in Form von kleinen undurchsichtigen, weissen Fetzen ungelöst zurückzubleiben. Es mag die Erwähnung dieses Umstandes an dieser Stelle genügen.

Verdauungsversuche.

Lachssperma (Alkoholmaterial) gelangte gleichzeitig mit einer Flocke in Alkohol aufbewahrten Fibrins bei Zimmertemperatur in je ein Gefäss mit Flüssigkeit S. Nach 7 Stunden war die Fibrinflocke gelöst, das Sperma hingegen, welches als zusammenhängende Masse in die Flüssigkeit gelangt war, bildete nunmehr einen weissen, pulverigen Bodensatz. Dieser bestand aus den Köpfen der Spermatozoen. Die

1) E. ZACHARIAS, Ueber Chromatophilie. Ber. der Deutschen Bot. Ges. 1893.

2) Untersuchungen über Pepsinverdauung. PFLÜGER's Archiv für die gesammte Physiologie, Bd. 60, 1895.

3) l. c. S. 48.

Schwänze, welche vorher die Masse durch gegenseitige Verschlingung zusammen gehalten hatten, waren nicht mehr zu erkennen, ebenso wenig die Mittelstücke. Auf Zusatz von Methylenblau-Fuchsin *S* färbten sich die Kopfhüllen intensiv blau und setzten sich gut gegen einen Centralraum ab, welcher die Färbung der umgebenden Flüssigkeit zeigte.

Eine Probe desselben Sperma-Alkoholmaterialies wurde nach siebenstündigem Verweilen in Salzsäure von der Concentration 0,28 pCt. untersucht. Das Sperma bildete zusammenhängende Flocken. Auf Zusatz von Methylenblau-Fuchsin *S* zeigten sich sofort intensiv roth gefärbte Schwänze, die Köpfe erschienen zunächst farblos, dann blau.

Alkoholmaterial von Lachssperma und in Wasser gekochtes Hühnereiweiss wurde in annähernd gleichen Mengen auf gesonderte Gefässe mit annähernd gleichen Flüssigkeitsmengen vertheilt. Zwei Gefässe enthielten Flüssigkeit *S*, zwei andere Flüssigkeit *h*. Nach 24stündigem Verweilen in den Flüssigkeiten bei Zimmertemperatur war das Eiweiss in Flüssigkeit *h* stark angegriffen, von durchscheinendem Aussehen, in Flüssigkeit *S* minder verändert, während sich die ursprünglich zusammenhängende Masse der Lachsspermatozoen in beiden Flüssigkeiten in einen weissen, pulverigen Bodensatz verwandelt hatte. Nach weiteren 48 Stunden war das Eiweiss in beiden Flüssigkeiten gelöst, während das Sperma keine Veränderung erkennen liess. Das Sperma-Pulver bestand aus Köpfen mit scharf contourirten, glänzenden Hüllen.

In gesonderte, mit Flüssigkeit *h* gefüllte Gefässe gelangte Lachssperma (Alkoholmaterial), mit Alkohol gefälltes Hühnereiweiss und in destillirtem Wasser gekochtes Hühnereiweiss. Die aus Alkohol in die Verdauungsflüssigkeit eingetragenen Substanzen wurden vorher durch Fliesspapier von Alkohol befreit.

Nach $5\frac{1}{2}$ stündiger Einwirkung der Verdauungsflüssigkeit bei 35 bis 36° C. war das Eiweiss gelöst. Nach weiteren 3 Stunden, während welcher die Temperatur auf 41° C. gestiegen war, wurde das Sperma untersucht. Von den Schwänzen und Mittelstücken liess sich nichts mehr erkennen, die Kopfhüllen aber waren glänzend, glatt und scharf contourirt, der Innenraum enthielt anscheinend keine feste Substanz. Nun blieben die Verdauungsgefässe 14 Stunden lang (während der Nacht) bei Zimmertemperatur stehen, dann wurde die Verdauungsflüssigkeit abgegossen und erneuert.

Die abgegossene Flüssigkeit erwies sich noch als wirksam. Ein Quantum Eiweiss (Alkoholmaterial) wurde von derselben bei 36 bis 40° C. binnen 5 Stunden gelöst.

Nachdem das Lachssperma in der erneuerten Flüssigkeit bei 36 bis 40° C. 10 Stunden gelegen hatte, wurden Proben in der Flüssigkeit untersucht. Die Kopfhüllen erschienen nach wie vor glänzend, scharf contourirt und völlig intact.

Annähernd gleiche Volumina von in destillirtem Wasser gekochtem Hühnereiweiss, Fibrin (Alkoholmaterial) und Lachssperma (Alkoholmaterial) gelangten (und zwar die beiden letzteren nach Abtrocknen des Alkohols mittelst Fliesspapier) in verschiedene Gefässe, welche annähernd gleiche Mengen von Flüssigkeit *S* enthielten. Nach einstündiger Einwirkung der letzteren bei $40-47\frac{1}{2}^{\circ}\text{C}$. war das Fibrin gelöst. Nach weiteren $4\frac{3}{4}$ Stunden, während welcher die Temperatur bis auf 52°C . anstieg, war das Eiweiss gelöst, das Sperma anscheinend unverändert. Die mikroskopische Untersuchung ergab jedoch, dass die Köpfe mehr oder weniger mit einander verklebt, zum Theil sogar zu einer anscheinend homogenen Masse mit einander vereinigt waren.

Um dem denkbaren Einwande zu begegnen, die Einwirkung der Verdauungsflüssigkeit auf die Kopfhüllen könne vielleicht durch eine etwa vorhandene Aussenschicht von besonderer Beschaffenheit beeinträchtigt werden, wurde getrocknetes Lachssperma (Alkoholmaterial) zwischen rauhen Porcellanplatten zerrieben und dann der Einwirkung von Flüssigkeit *h* 10 Stunden lang bei $36-41^{\circ}\text{C}$. ausgesetzt. Nachdem das zerriebene Sperma schliesslich noch 24 Stunden bei Zimmertemperatur in der Verdauungsflüssigkeit gelegen hatte, wurde es in der Flüssigkeit untersucht. Die Fragmente der zertrümmerten Kopfhüllen waren wohl erhalten.

Es werden demnach unter Bedingungen, unter welchen die Schwänze und Mittelstücke der Spermatozoen verschwinden¹⁾, in Alkohol aufbewahrtes Fibrin, mit Alkohol gefälltes Hühnereiweiss und in destillirtem Wasser gekochtes Hühnereiweiss von künstlichem Magensaft getöst werden, die Kopfhüllen der untersuchten Spermatozoen, welche nach MIESCHER²⁾ den alleinigen Sitz der Nucleänsäure darstellen, nicht aufgelöst³⁾. Die Reactionen dieser unlöslichen Theile sind früher eingehender beschrieben worden. Sie zeigen eine weitgehende Uebereinstimmung mit derjenigen Substanz der Zellkerne, welche ich Kernnuclein genannt habe. Inwiefern die von mir untersuchten Verdauungs-

1) Für die Annahme, dass Schwänze und Mittelstücke durch künstlichen Magensaft gelöst werden, spricht u. a. auch folgender Versuch: Lachssperma (Alkoholmaterial) gelangte (nach Entfernung des Alkohols mittelst Fliesspapier) in Flüssigkeit *h* und verblieb darin zunächst 5 Stunden bei $30-39^{\circ}\text{C}$., darauf 20 Stunden bei Zimmertemperatur. Die Verdauungsreste wurden mit Wasser abgespült und in Alkohol eingelegt. Nach Zusatz einer Methylgrünlösung, welche auf 100 *g* Wasser 1 *g* reine concentrirte Essigsäure und 10 *g* Glaubersalz enthielt, liess sich nunmehr von den Schwänzen und Mittelstücken nichts erkennen, während diese Theile an nicht verdaulichem Alkoholmaterial in der genannten Lösung besonders scharf hervortreten.

2) *Fragments physiologiques sur le Saumon du Rhin. Extrait des Archives des Sciences physiques et naturelles, III. période, t. XXVIII, Déc. 1892.*

3) Die besondere Beschaffenheit des Innenraumes und Centralstäbchens wird durch die Resultate der vorstehenden Verdauungsversuche auf's Neue bestätigt.

reste der Sperma-Kopfhüllen den von MIESCHER analysirten Lachsnuclein-Präparaten entsprochen haben, ist übrigens nicht sicher. Durch mehr oder weniger lange andauernde Verdauung kann die Bildung phosphorärmerer Substanzen bewirkt werden¹⁾.

Dass die Widerstandsfähigkeit des Kernnucleins gegen künstlichen Magensaft derjenigen der in der Kopfhülle der Lachsspermatozoen vorkommenden Nucleinsubstanz entspricht, wurde wiederum für bestimmte Fälle festgestellt.

Epidermis der Blätter von *Arum italicum* gelangte nach Behandlung mit Alkohol und nach Entfernung des Alkohols durch Fliesspapier in Flüssigkeit *h*. Nach achtstündiger Einwirkung dieser Flüssigkeit²⁾ bei 35—41° C. wurden Epidermisstücke in derselben untersucht. In den Kernen traten die Nucleinkörper ungemein scharf und glänzend hervor. Das war auch in solchen Zellen der Fall, welche angeschnitten worden waren, so dass die Kerne einseitig frei hervorragten. Plasmarreste waren vorhanden, zeigten aber ein zartes, nicht glänzendes Aussehen. Ein Theil der *Arum*-Epidermis verblieb nun 14 Stunden bei Zimmertemperatur in der Verdauungsflüssigkeit. Dann wurde dieselbe abgestossen und erneuert. Nachdem die Epidermis nun abermals $9\frac{3}{4}$ Stunden bei 35—41° C. der Verdauung ausgesetzt worden war, ergab die mikroskopische Prüfung dasselbe Bild wie bei der ersten Untersuchung.

Dass nicht etwa die Einwirkung von Alkohol die Widerstandsfähigkeit der Nucleinkörper der Zellkerne gegen künstlichen Magensaft bedingt, zeigt folgender Versuch: Frische Epidermis von *Arum italicum* gelangte auf 6 Stunden bei 30—40° C. in Flüssigkeit *h*, wurde dann in Wasser abgespült und in Methylenblau-Fuchsin *S* untersucht. Die Nucleinkörper traten nun intensiv blau gefärbt hervor, während die Plasmarreste hell rosa gefärbt waren. Auch angeschnittene Zellen zeigten dieses Verhalten. Gleichartige Untersuchung von Epidermisstücken, welche noch weitere 20 Stunden bei Zimmertemperatur in der Verdauungsflüssigkeit gelegen hatten, ergab dasselbe Resultat³⁾.

1) Vergl. ZACHARIAS, Ueber die chemische Beschaffenheit von Cytoplasma und Zellkern. Ber. der Deutschen Bot. Gesellschaft 1893, S. 300. — Ferner MIESCHER, Wissenschaftlicher Briefwechsel. Die histochemischen und physiologischen Arbeiten von FR. MIESCHER, gesammelt und herausgegeben von seinen Freunden; 1897, Bd. 1, S. 75, 83, 84.

2) Nach $5\frac{1}{2}$ stündiger Einwirkung derselben Flüssigkeit bei 35—36° C. war sowohl mit Alkohol behandeltes, als auch mit destillirtem Wasser gekochtes Hühner-eiweiss gelöst.

3) Nach der Behandlung von frischen Zellen mit künstlichem Magensaft fiel es mir mehrfach auf, dass zahlreiche Tröpfchen von fettartigem Aussehen aus dem Zellplasma ausgetreten waren, und zwar schien bei *Arum italicum* diese „Fett“-Auscheidung nach der Einwirkung von Flüssigkeit *S* reichlicher auszufallen als nach der Behandlung mit Flüssigkeit *h*.

Da HEINE speciell für Spermatozoenköpfe des Salamanders angegeben hat, dass diese nach 1- bis $1\frac{1}{2}$ stündiger Verdauung bei 40°C . „völlig ausgelaugt“ seien, Salamander-Material mir aber nicht zu Gebote stand, so habe ich die Spermatozoen von *Triton* hinsichtlich ihres Verhaltens gegen Magensaft einer erneuten Untersuchung unterzogen¹⁾. Es hat sich dabei wiederum ergeben, dass künstlicher Magensaft stoffliche Unterschiede zwischen den einzelnen Formbestandtheilen dieser Spermatozoen auf das Schärfste hervortreten lässt, dass ferner eine Substanz mit dem Verhalten des Kernnuclein nur im Kopfe vorhanden ist wie beim Lachs. Das Mittelstück, welches nach MEVES' Untersuchungen am Salamander²⁾ aus dem Centrosom hervorgeht, enthält kein nachweisbares Kernnuclein, ebenso wenig Schwanz und Kopfspitze.

Untersucht man frisch in Alkohol absolutus eingelegte Spermatozoen von *Triton taeniatus* in Alkohol mit ZEISS' Apochromat 2,0 mm, 1,40 Apert., Compensationsocular 6, so zeigt die Substanz von Schwanz, Mittelstück und Kopf ein gleichartiges Aussehen, nur wird der Kopf von einer sehr feinen Linie abweichenden Aussehens durchzogen. Wesentliche Unterschiede zeigen sich nach der Behandlung mit künstlichem Magensaft. Spermatozoen von *Triton taeniatus* gelangten nach Behandlung mit Alkohol in Flüssigkeit *h*. Gleichzeitig wurde in ein besonderes, mit Flüssigkeit *h* beschicktes Gefäss Hühnereiweiss (Alkoholmaterial) eingetragen. Nachdem die Verdauungsflüssigkeit zunächst 5 Stunden bei $36-42^{\circ}\text{C}$. und dann weitere 17 Stunden bei Zimmertemperatur eingewirkt hatte, wurde untersucht. Das Eiweiss war gelöst, die Spermatozoenköpfe waren glatt contourirt, lebhaft glänzend, von ausgelaugtem Aussehen keine Spur. Die Kopfspitzen und Schwänze hingegen erschienen sehr blass und zart, im schärfsten Gegensatz zu den Köpfen. Das Mittelstück war nicht mehr zu erkennen. (Bei der Untersuchung mit ZEISS' Apochromat sah man eine feine, den Kopf der Länge nach durchziehende Linie.) Es scheint hier wie beim Lachs im Kopfe ein innerer Theil von besonderer chemischer Beschaffenheit vorhanden zu sein.³⁾ Eine feine Membran, welche die äussere Hülle des nunmehr verschwundenen Mittelstückes gebildet hatte, verband die

1) Vergl. E. ZACHARIAS, Ueber die Spermatozoiden. Bot. Ztg. 1881.

2) Archiv für mikr. Anatomie. Bd. 50, 1897.

3) Möglicher Weise kommt auch bei pflanzlichen Spermatozoiden ein solcher „Innenraum“ vor, wenigstens scheint eine Beobachtung, welche ich an Schraubenbändern von Characeen-Spermatozoiden vor Jahren gelegentlich der Einwirkung von Kochsalzlösung machen konnte (Ueber die Spermatozoiden, Bot. Ztg. 1881, S. 829), darauf hinzudeuten. Die Uebereinstimmung in der Beschaffenheit thierischer und pflanzlicher Spermatozoen, auf welche ich aufmerksam gemacht habe (l. c. S. 837), erstreckt sich jedenfalls nach den neueren Untersuchungen BELAJEFF's u. a. noch weiter auf die Einzelheiten des Aufbaues als ich seiner Zeit annehmen konnte.

Kopfbasis mit dem Schwanz. Auf Zusatz von Alkohol wurde das Mittelstück nicht wieder sichtbar.

Ein weiterer Verdauungsversuch wurde wie folgt ausgeführt: Hühner-eiweiss (Alkoholmaterial) und mit Alkohol behandelte *Triton*-Spermatozoen gelangten gleichzeitig in Flüssigkeit *h*, nachdem die Spermatozoen mit einer feinen Schere zerschnitten worden waren, um eine möglichst innige Berührung des Kopffinern mit der Verdauungsflüssigkeit zu erzielen. Ferner wurden mit Alkohol behandelte *Triton*-Spermatozoen in zwei verschiedene Gefässe mit Salzsäure von der Concentration 0,28 pCt. eingelegt, von welchen das eine bei Zimmertemperatur stehen blieb, während das andere mitsammt den Gefässen, welche die in Verdauungsflüssigkeit liegenden Objecte enthielten, 9 Stunden lang auf 37—42° C. erwärmt wurde. Nachdem die Gefässe weitere 15 Stunden bei Zimmertemperatur gestanden hatten, wurde untersucht. Das Eiweiss war gelöst. Die zerschnittenen, mit Flüssigkeit *h* behandelten Köpfe zeigten bei der Untersuchung in der Flüssigkeit mit ZEISS' Apochromat durchaus dieselbe Beschaffenheit wie die intacten Köpfe nach dem weiter oben beschriebenen Verdauungsversuch. Das mit Verdauungsflüssigkeit und das lediglich mit Salzsäure (Concentration 0,28 pCt.) in der Wärme und bei Zimmertemperatur behandelte Sperma wurde schliesslich in Alkohol eingelegt¹⁾. Bei der Untersuchung in Alkohol erschien das Mittelstück der mit Salzsäure behandelten Spermatozoen deutlich als solider Körper, während in den mit Flüssigkeit *h* behandelten Spermatozoen vom Mittelstück nur die zarte Umhüllungsmembran zu erkennen war. Auf Zusatz von Methylenblau-Fuchsin *S*²⁾ zu den mit Salzsäure behandelten Sperma-Portionen färbten sich Schwanz, Kopfspitze und Mittelstücke sofort roth, besonders intensiv das letztere. Der Kopf blieb zunächst farblos, um dann schöne blaue Färbung anzunehmen. In dem mit Flüssigkeit *h* behandelten Sperma färbte Methylenblau-Fuchsin *S* den Kopf zunächst roth, derselbe nahm dann jedoch alsbald blaue Färbung an.

Spermatozoen, welche frisch in Salzsäure von der Concentration 0,28 pCt. eingetragen worden waren, besaßen nach 20stündigem Verweilen in der Säure sehr stark glänzende, scharf contourirte Köpfe; zu diesen standen die Kopfspitzen, Mittelstücke und Schwänze durch ihr blasses, glanzloses Aussehen im deutlichsten Gegensatz.

Methylenblau-Fuchsin *S*-Lösung färbte an Spermatozoen, welche

1) Die Prüfung der zur Verdauung benutzten Flüssigkeiten auf ihre Wirksamkeit durch Fibrin (Alkoholmaterial) ergab nun, dass Fibrinflocken nach sechsstündigem Verweilen in den Flüssigkeiten bei 39—41° C. gelöst waren. Gleich lange bei gleicher Temperatur mit Salzsäure von der Concentration 0,28 pCt. behandelte Fibrinflocken waren lediglich gequollen.

2) Vergl. E. ZACHARIAS, Ueber Chromatophilie in den hier citirten Untersuchungen AUERBACH's. Ber. der Deutschen Bot. Gesellsch. 1893.

vorher frisch auf drei Stunden in Salzsäure von der Concentration 0,28 pCt. eingelegt worden waren, die Köpfe rein himmelblau, die übrigen Formbestandtheile roth, und zwar das Mittelstück besonders intensiv.

Die mitgetheilten Untersuchungsergebnisse bestätigen und ergänzen meine früheren einschlägigen Angaben.

Da das Mittelstück vom Centrosom abgeleitet wird, dürfte es von Werth sein, zu betonen, dass die chemische Beschaffenheit des Mittelstückes nach Obigem von derjenigen der untersuchten Kerngerüste und auch der Nucleolen wesentlich abweicht.

In meiner Mittheilung „Ueber einige mikrochemische Untersuchungsmethoden“ bemerkte ich auf Seite 274, dass hinsichtlich der Einwirkung von Glaubersalzhaltigen Methylgrünlösungen auf Lachssperma frisches Sperma noch zu vergleichen sei. Durch die Freundlichkeit des Herrn Fischmeisters in Hameln, der mich reichlich mit lebendem Lachssperma versah, bin ich nunmehr in den Stand gesetzt, diesen Vergleich anzustellen. Behandelt man, sagt MIESCHER¹⁾, schneeweisses Sperma von einem lebenden Lachs mit einer Flüssigkeit, die 1 pCt. Essigsäure, 9—10 pCt. Glaubersalz und ziemlich viel Methylgrün enthält, so sieht man mit ZEISS' Apochromat 4 mm, Ocular 12, eine kräftig grüne und scharfe Färbung des Innenraumes (des Kopfes), der wie ein Smaragd glänzt, während die Hülle sich gar nicht oder nur schwach färbt.

Die Ergebnisse meiner Untersuchung stehen mit denjenigen MIESCHER's hier nicht im Einklang. Lebendes Sperma vom Lachse wurde in eine Methylgrünlösung eingetragen, welche auf 100 g Wasser 10 g Glaubersalz²⁾ und 1 g reine concentrirte Essigsäure enthielt. Darauf verquoll bei zahlreichen Spermatozoen der Kopf sofort unter gleichzeitiger Grünfärbung. Die Stelle des Kopfes wurde dann von einem verschwommenen hellgrünen Fleck eingenommen. Schwanz, Mittelstück und Centralstäbchen (ob nur ein basaler Theil desselben, oder das Gebilde in seiner ganzen Ausdehnung, war zweifelhaft) blieben durchaus ungequollen und ungefärbt erhalten (Fig. 1, *c* das Centralstäbchen).³⁾ An einzelnen quellenden Köpfen glaubte ich, eine dieselben umspannende, äusserst zarte Haut zu erkennen, welche schliesslich zu platzen schien. Am Mittelstück konnten dann, während der Kopf sich in einen hellgrünen, verschwommenen Fleck ohne jede scharfe Abgrenzung verwandelt hatte, zarte zerknitterte Hautfetzen erkannt werden (Fig. 2).

Bei manchen Köpfen erfolgte die Verquellung langsamer unter verschiedenartigen Erscheinungen. Sie quollen zunächst nicht, und

1) Physiologisch-chemische Untersuchungen über die Lachsmilch. S. 27.

2) „puriss. cryst. pro analysi.“ von E. MERCK in Darmstadt.

3) Dasselbe Verhalten wurde an lebendem Sperma der Bachforelle beobachtet.

färbten sich stark. Das Verhalten des Innenraumes war nicht festzustellen. Manche dieser Köpfe sah ich nach und nach, nachdem sie eine vacuolige Beschaffenheit angenommen hatten, verquellen, während andere sich längere Zeit hindurch nicht veränderten. Auch Zustände wie Fig. 3 wurden beobachtet. Eine schwach gefärbte, gequollene äussere Partie des Kopfes umgab eine innere nicht homogene, intensiv gefärbte Masse. Dieser Zustand schien dem von MIESCHER beschriebenen ähnlich zu sein. Ob hier indessen die innere gefärbte Masse aus der Substanz des Innenraumes, oder aus inneren, nicht verquollenen Theilen der Hülle bestand, blieb zweifelhaft.

Als zu einer zusammenhängenden Spermamasse (Alkoholmaterial), welche in destillirtem Wasser auf dem Objectträger lag, die Glaubersalzlösung hinzufloss, färbten sich die am Rande der Spermamasse liegenden Köpfe sofort intensiv. Dann erfolgte eine Verquellung der Köpfe unter Abnahme der Färbungsintensität. Die Verquellung des



Fig. 1.



Fig. 2.



Fig. 3.

einzelnen Kopfes schritt von aussen nach innen fort, dergestalt, dass eine hellgrüne, verquollene, nach und nach breiter werdende Zone einen intensiv grünen, sich nach und nach verkleinernden und endlich verschwindenden Innenkörper umgab. Wahrscheinlich durchdringt zunächst nur Essigsäure-Methylgrün den Kopf und färbt die Hülle in üblicher Weise.¹⁾ Nun folgt das Glaubersalz und bewirkt (unter Umständen sehr langsam fortschreitend) die Verquellung. Wahrscheinlich sind die smaragdgrünen Innenkörper MIESCHER's nichts anderes als nicht verquollene innere Theile der Hüllen. Jedenfalls ergibt sich aus meinen Untersuchungen eine vollständige Uebereinsimmung im Verhalten der Kopfhüllen des frischen Lachsspermas mit demjenigen der Zellkern-Chromatinkörper gegen Glaubersalz-Methylgrün-Essigsäure-Lösung.²⁾ Nach 4stündiger Einwirkung dieser Lösung auf frische Blattepidermis von *Tradescantia spec.* z. B. zeigten einzelne Kerne

1) E. ZACHARIAS, Ueber einige mikrochemische Untersuchungsmethoden. I. c. p. 273.

2) Diese Lösung, welche die Spermatozoen-Schwänze so scharf conservirt, dürfte mit Erfolg für die Untersuchung derjenigen Substanzen zu verwenden sein, welche STRASBURGER unter dem Namen „Kinoplasma“ zusammengefasst hat.

noch scharf begrenzte, grün gefärbte Chromatinkörper (ebenso, wie die Kerne von Tradescantien-Epidermis, welche frisch auf 4 Stunden in eine Methylgrünlösung eingelegt war, die auf 100 g Wasser 1 g reiner conc. Essigsäure enthielt), in anderen Kernen waren die Chromatinkörper heller gefärbt und in verschiedenem Grade gequollen. In vielen Kernen liess sich die Abgrenzung der Chromatinkörper überhaupt nicht mehr erkennen, die Kerne waren diffus grün gefärbt.

Methylgrün-Essigsäure ist vor Kurzem von CARNOY¹⁾ als Reagens auf Nuclein mit Recht wiederum in den Vordergrund gestellt worden und für die Untersuchung der Nucleolen der Batrachier-Eikerne verwendet. CARNOY betont meinen abweichenden Befunden²⁾ gegenüber auf's Neue, dass diese Nucleolen nucleinhaltig seien, ohne zu einem richtigen Verständniss meiner einschlägigen Ausführungen gelangt zu sein.

Eine abermalige Untersuchung von Eierstockseiern des Frosches führte, wie bei meiner ersten Untersuchung des Objectes, zu dem Ergebniss, dass Substanzen mit den Eigenschaften des Kernnucleins in den Nucleolen des Froscheies sich ebenso wenig nachweisen lassen, wie in andern untersuchten Nucleolen³⁾. Geprüft wurde das Verhalten gegen Methylgrün-Essigsäure und verdünnte Salzsäure. CARNOY meint allerdings (S. 200), um zu sicheren Schlüssen zu gelangen, müsste man eine grössere Anzahl von Reactionen prüfen. Diese Forderung beruht jedoch nicht auf hinreichender Ueberlegung. Die mikrochemische Untersuchung soll im vorliegenden Fall die Frage beantworten, ob im Nucleolus eine Substanz mit den Eigenschaften des Kernnuclein durch unsere gegenwärtigen Hilfsmittel nachzuweisen sei oder nicht. Tritt eine der charakteristischen Reactionen, wie sie das Nuclein der untersuchten Zellkern-Chromatinkörper zeigt, nicht ein, so ist die Frage im negativen Sinne beantwortet. Umgekehrt würde selbstverständlich das Eintreten der einen Reaction die Frage nicht im positiven Sinne beantworten können.

Die Untersuchung des mikrochemischen Verhaltens der Froscheinucleolen geschah folgendermassen: ein frisches Eierstocksei gelangte auf den Objectträger in etwas Froschblut und wurde mit Nadeln unter

1) CARNOY et LEBRUN, La vésicule germinative et les globules polaires chez les Batraciens (La Cellule T. XII, 2. fasc. 1897).

2) E. ZACHARIAS, Beiträge zur Kenntniss des Zellkerns und der Sexualzellen. (Bot. Ztg. 1887.)

3) Eine Besprechung der theilweise dem Verhalten der Nucleolen gewidmeten Arbeiten von CAVARA (Intorno ad alcune strutture nucleari. Estratto dagli atti del R. istituto botanico dell' università di Pavia. Nuova Serie vol. V.) und LONGO (Esiste cromatolisi nei nuclei normali vegetali? Rendiconti della R. academia dei Lincei Cl. d. Scienze fisiche etc. vol. VII. Ser. 5a fasc. 10, 1898) soll demnächst a. a. O. erfolgen.

dem Simplex vorsichtig geöffnet, so dass der Kern mit dem ausfliessenden Inhalt des Eies unverletzt frei heraustrat.¹⁾ Nun wurde Methylgrünlösung²⁾ hinzugesetzt und ein Deckglas aufgelegt. Während der mikroskopischen Beobachtung platzte alsbald der Kern unter dem Druck des Deckglases, und die Nucleolen gelangten zum Theil in die umgebende Flüssigkeit. Während sich hier die Nucleingerüste der Blutkörperkerne sofort intensiv grün färbten, blieben die Nucleolen ungefärbt, von gequollenem Aussehen. Auch nach halbstündiger Einwirkung der Farblösung war keine Färbung der Nucleolen eingetreten. Ein schärferer Gegensatz als derjenige zwischen den intensiv smaragdgrün gefärbten Nucleingerüsten der Blutkörperkerne und den ungefärbten Eikern-Nucleolen war gar nicht denkbar. Eierstockseier, welche einige Tage in Alkohol gelegen hatten, wurden in destillirtem Wasser untersucht. In den Eikernen traten die Nucleolen als glänzende Körper scharf umschrieben hervor. Auf Zusatz von Salzsäure (Conc. 0,28 pCt.) verblassten und verquollen sie jedoch sofort, während im selben Präparat befindliche Kerne von Blutkörperchen glänzende, scharf contourirte Gerüste erkennen liessen. Auch hier war wiederum gar kein schärferer Gegensatz denkbar. Nach zweitägiger Einwirkung der Salzsäure hatte sich das Bild nicht geändert. Nun erfolgt ein Zusatz von Methylgrün-Essigsäure. Zunächst färbten sich die Kerngerüste der Blutkörperchen intensiv grün, dann wurde auch das Eioplasma mehr oder weniger gefärbt und gleichzeitig färbten sich auch die Nucleolen ein wenig, bewahrten aber ihr gequollenes Aussehen. Die Eigenschaft sich unter Umständen schliesslich schwach mit Methylgrün zu färben, kommt manchen Bestandtheilen des Zellinhaltes zu. Eine Verwechslung derartiger Färbungen mit der charakteristischen Nucleinreaction ist bei einiger Umsicht ausgeschlossen.

In den Nucleolen des Froscheies liessen sich also Substanzen, welche gegen Methylgrün-Essigsäure und Salzsäure (0,28 pCt.) das charakteristische Verhalten des Kernnuclein zeigen, nicht nachweisen.

Auch über die Kerne von *Spirogyra* ist abermals eine Arbeit erschienen³⁾, welche für die besondere Beschaffenheit der Nucleolen dieser Pflanzen eintritt. Die Resultate des Verfassers, welche auf Grund der Untersuchung gefärbter Präparate gewonnen sind, stehen denjenigen MOLL's nahe. Auch sind die Schlüsse, welche Verfasser aus seinen Beobachtungen zieht, ebensowenig zwingend wie diejenigen MOLL's.⁴⁾ Es

1) Vergl. CARNOY, l. c. p. 24.

2) Sie enthielt auf 100 g Wasser 1 g reine concentrirte Essigsäure.

3) L. MITZKEWITSCH, Ueber die Kernteilung bei *Spirogyra*. (Flora, 1898, II).

4) Vergl. meine kritischen Bemerkungen. Bot. Ztg. 1893, S. 282, namentlich auch Anm. 2. Eigenthümliche, von denjenigen anderer Beobachter abweichende Angaben über das Verhalten der Nucleolen von *Spirogyra* enthält eine interessante Mittheilung von C. VAN WISELINGH (Over den nucleolus van *Spirogyra*. Koninklijke Akademie van Wetenschappen te Amsterdam. Verslag van de gewone Vergadering der Wis- en natuurkundige Afdeeling van 27. Nov. 1897).

wäre gut gewesen, wenn der Verfasser vor der Veröffentlichung seiner Arbeit seine in Aussicht gestellten mikrochemischen Untersuchungen zum Abschluss gebracht und diese mit Beobachtungen am lebenden Object combinirt hätte.

Es dürfte wohl keinem Zweifel unterliegen, dass das Mass von Arbeit, welches in der letzten Zeit bei der grossen Zahl von Abhandlungen, welche sich mit Gegenständen der Zellenlehre beschäftigten, aufgewendet worden ist, zu minder unsicheren und widerstreitenden Resultaten geführt hätte, als das thatsächlich der Fall ist, wenn nicht in so vielen Fällen ausschliesslich nach überlieferten Recepten mit „allen Hilfsmitteln der modernen Technik“ gearbeitet worden wäre¹⁾, und wenn nicht bei der Beurtheilung der Beobachtungsergebnisse sich eine eigenthümliche Art der Schlussfolgerungen eingeschlichen hätte; namentlich dort, wo es sich darum handelt, die Beziehungen verschiedener Formbestandtheile zu einander hinsichtlich ihrer Entstehung oder ihres Wachstums zu beurtheilen. Da bei manchen auf dem einschlägigen Gebiet arbeitenden Forschern eine Abneigung besteht gegen die Ergänzung ihrer Methode der Betrachtung gefärbter Mikrotom-schnitte durch andere Arten der Untersuchung, so gelangen sie bei ihren Versuchen befriedigende, zusammenhängende Gesamtergebnisse zu erzielen, unter Umständen unwillkürlich dahin Schlüsse zu ziehen, welchen thatsächlich die erforderlichen Grundlagen fehlen.

1) Vergl. MIESCHER, Histochemische und physiologische Arbeiten. Gesammelt und herausgegeben von seinen Freunden. Leipzig 1897, Bd. I, S. 86 (Briefe über histochemische Probleme allgemeiner Natur).

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

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

Jahr/Year: 1898

Band/Volume: [16](#)

Autor(en)/Author(s): Zacharias Eduard

Artikel/Article: [Ueber Nachweis und Vorkommen von Nuclein. 185-198](#)