

Zur Chromolyse des pflanzlichen Kernkörperchens.

Von P. G. Unna und Henny Fein.

I.

Einleitung.

Die Chromolyse, die uns bei der Erforschung tierischer Eiweiße von so großem Nutzen geworden ist, da sie es uns ermöglicht hat, eine Reihe der tierischen Zellbestandteile mit bestimmten Eiweißen zu identifizieren, veranlaßte uns, diese Methode auch zur Erforschung pflanzlicher Eiweiße heranzuziehen. Das Wesen der Chromolyse beruht darauf, bestimmte Bestandteile der Zelle, die sich durch eine spezielle Färbung darstellen lassen, vorher einer Reihe von eiweißlösenden und -fällenden Mitteln auszusetzen und durch die nachfolgende Färbung den Verlust oder das Vorhandensein der betreffenden Eiweiße festzustellen. Es ist wohl klar ersichtlich, daß wir bei der Auswahl der Färbungen nur solche ins Auge fassen dürfen, die das zu untersuchende Zellelement isoliert von der Umgebung klar und deutlich im Normalpräparat hervortreten lassen. Von Vorteil ist es natürlich, verschiedene solcher guten Färbungen zu besitzen, da dieselben sich wohl nicht immer genau decken werden. Als zweiter wichtiger Hauptfaktor kommt bei der Chromolyse der Gewebsbestandteile die Fixation des zu untersuchenden Materials in Betracht. Jedes vorherige eingreifende Fixationsmittel, welches an den Eiweißkörpern Veränderungen hervorruft, d. h. welches das eventuelle Löslichkeitsvermögen der Zelleiweiße aufhebt, wie z. B. Formalin, Sublimat, Eisessig, Chromate, ist zu vermeiden. In dieser Hinsicht indifferent verhält sich nur der absolute Alkohol, der die Eiweiße wohl denaturiert, aber ihre Löslichkeitsverhältnisse nicht verändert¹⁾, er kommt somit für uns als alleiniges Fixierungsmittel in Betracht. Mithin tritt die Forderung nach genauester morphologischer und struktureller Darstellung, wie sie bei allen botanischen Färbungen bezweckt wird, etwas in den Hintergrund, denn auf diesem Wege kann das Hauptziel, einen Einblick in die mikrochemischen Verhältnisse der pflanzlichen Zelleiweiße zu gewinnen, nie erreicht werden. Auch in bezug auf die nachfolgenden Färbungen müssen wir uns bestimmte Beschränkungen auferlegen. Nur solche Färbungen sind für uns maßgebend, welche das betreffende Eiweiß spezifisch färben, d. h. von seiner Umgebung gut abgesetzt, sei es mit deutlichem Intensitäts- oder Farbenkontrast. Wir wandten natürlich zunächst die bei der Chromolyse tierischer Eiweiße nach Alkoholfixation brauchbaren und bewährten Färbemethoden an und fanden, daß dieselben zum großen Teil auch bei der Untersuchung auf pflanzliche Zelleiweiße vollauf genügen.

Als erstes Objekt wurde die Chromolyse des pflanzlichen Nukleolus

1) Nur in seltenen Ausnahmefällen tritt eine leichte Veränderung der Löslichkeit ein, so bei gewissen Albumosen.

ins Auge gefaßt, um die erhaltenen Ergebnisse mit der Analyse der schon gut bekannten Eiweiße des tierischen Nukleolus zu vergleichen. Die einzelnen Eiweiße des letzteren sind seinerzeit in der Arbeit von P. G. Unna²⁾ eingehend behandelt und festgelegt worden. Nach den betreffenden Ausführungen handelt es sich dort um vier Eiweiße, zwei saure und zwei basische, welche bereits größtenteils genauer studiert sind: das basophile Nuklein, das basophile Globulin, das oxyphile Nukleolin und die Grundsubstanz, das oxyphile Plastin. Sie alle lassen sich bis auf das als Rest zurückbleibende Plastin durch gewisse Lösungsmittel ausziehen und es verändert sich dementsprechend das normale tinktorielle Bild des Kernkörperchens in gesetzmäßiger Weise. Es gilt nun festzustellen, ob in den Nukleoli der Pflanzen ähnliche Verhältnisse vorliegen, inwieweit sich ihre Eiweiße mit denen des tierischen Kernkörperchens vergleichen lassen und welche Unterschiede sie eventuell aufweisen.

Als Material dienten uns einerseits Rasiermesserschnitte von Kürbissamen, andererseits Wurzelspitzen von *Allium*, die in absolutem Alkohol fixiert, in Celloidin eingebettet und mit dem Mikrotom geschnitten wurden, da dieselben zu zart sind, um von ihnen Rasiermesserschnitte anzufertigen. Als gänzlich unbrauchbar erwies sich die Gefriermethode, da sie die Struktur der Zellelemente fast gänzlich zerstört.

Färbemethoden für pflanzliches Gewebe.

Zur Färbung dieser pflanzlichen Präparate trafen wir eine Auswahl der besten, für tierische Eiweiße erprobten Methoden, die, nach den verschiedenen Farbgruppen geordnet, in folgender Tabelle zusammengestellt sind. Die darin gewählten kurzen Bezeichnungen (Basichrom etc.) sind dem Kapitel: Chromolyse von P. G. Unna in Abderhaldens Handbuch der biologischen Methoden entnommen.

Tabelle der Farbgemische.

1. Basichrom: Toluidinblau, polychrome Methylenblaulösung.
2. Basichrom mit saurer Nachbeize: Toluidinblau — Tannin + Orange.
3. Dibasichrome:
 - a) Neutralviolett extra.
 - b) Pappenheim-Unna.
4. Oxychrom mit saurer Zubeize: Haematein + Alaun.
5. Dioxychrom: Wep.
6. Trioxychrom, dann Basichrom mit saurer Nachbeize: Epithelfaserfärbung.

Die Farbstoffe, mit denen diese Färbungen ausgeführt werden, zer-

2) P. G. Unna, Zur Chemie der Zelle. II. Kernkörperchen. Berl. Klin. Woch. 1913.

fallen in zwei natürliche Gruppen: basische Farbstoffe, welche die sauren Eiweiße anfärben, und saure, welche sich mit basischen Eiweißen verbinden. Unter den ersteren, den Basichromen, hat sich besonders das stark und unter Umständen metachromatisch färbende Toluidinblau gut bewährt, welches dieselben Resultate liefert wie die bekannte polychrome Methylenblaulösung. In einem Längsschnitt der Wurzelspitze von *Allium*, die sich bekanntlich durch ihr kern- und mitosenhaltiges Gewebe am besten zu Kernstudien eignet, da die Zelle mit ihren Elementen im embryonalen Zustande dargeboten wird, speichert das Kernkörperchen das Toluidinblau am stärksten und hebt sich dunkelblau tingiert von dem etwas schwächer gefärbten Kern ab, während das Protoplasma nur hellblau erscheint. Dieselben quantitativen Unterschiede erhalten wir bei Querschnitten von Kürbissamen, die große Zellen des kotyledonalen Gewebes sowie kleinere des Urmeristems zeigen, welche außer Kern, Kernkörperchen und Protoplasma noch eine Fülle von Reservestoffen, Stärke, Eiweißkristalle etc. aufweisen. Auch hier speichert der Nukleolus das Toluidinblau am stärksten, in schwächerem Maße der Kern, während Plasma und Reservestoffe den geringsten Teil dieser basischen Farbe aufnehmen. Hieraus ist zu schließen, daß der sauerste Bestandteil sich im Kernkörperchen befindet, der am wenigsten saure im Protoplasma seinen Sitz hat, während der Kern die Mitte hält. — Für die Chromolyse des Kürbissamens erweist sich die schwache Färbung der Reservestoffe mit basischen Farben als äußerst vorteilhaft, da wir unter diesen Umständen gut die Reaktionen des Kerns und Kernkörperchen-Eiweißes verfolgen können.

Interessante Unterschiede erhalten wir bei der Färbung des Kürbissamens mit Toluidinblau und nachfolgender saurer Beize (Tannin + Orange). Metachromatisch rot gefärbt heben sich Kern und Nukleolus vom blau tingierten Zellinhalt ab. Im Gegensatz zu allen gerbenden Fixationsmitteln vor der Chromolyse sind solche wie hier nach dem Lösungsprozeß angewandte sehr berechtigt und bedeuten für die Chromolyse keine Fehlerquelle. Merkwürdigerweise findet sich eine derartige Metachromasie der Kerne wie beim Kürbis nicht in den Wurzelspitzen, dort werden Nukleus und Nukleolus blau tingiert, und die Stärkegrade der einzelnen Zellelemente sind dieselben wie die einer einfachen Toluidinblaufärbung. Dieser färberische Unterschied beider Kernarten, der tätigen Embryonalzelle der Wurzelspitze einerseits und der ruhenden „Speicherzelle“ des Kürbissamens andererseits deutet auf eine mit der Mitosenbildung einsetzende chemische Veränderung hin.

Die Anwendung des Dibasichroms Neutralviolett, eines Gemisches von Neutralrot und Neublau, welches uns in der tierischen Histologie bei Gefrierschnitten so wertvolle Aufschlüsse über oxydierende und reduzierende Eiweiße liefert, da es beispielsweise die tierischen Zellkerne (Sauerstoffträger) rot und die reduzierende Muskelsubstanz blau färbt, weist an frischen Schnitten der Wurzelspitzen und des Kürbissamens solche Gegensätze nicht auf. Bei beiden zeigen Kern und Kernkörper-

chen eine starke Affinität ausschließlich zum Neutralrot und eine entschiedene Abneigung gegen Neublau, welche auch vom übrigen Zellinhalt geteilt wird, der, wenn auch bedeutend schwächer, ebenfalls rot tingiert wird.

Waren in den bisherigen Methoden nur Intensitätsunterschiede zwischen Kern und Kernkörperchen zu verwerten, so kommen bei Anwendung des Dibasicchroms Pappenheim-Unna (Methylgrün + Pyronin + Karbol) die noch wertvolleren, qualitativen Farbunterschiede zur Geltung. Diese seit langer Zeit bewährte Färbung der tierischen Histologie, die in schönster Weise tinktorielle Kontraste schafft, gibt auch bei der Chromolyse für embryonales pflanzliches Gewebe und so auch beim Kürbissamen die beste Doppelfärbung. Das Methylgrün, mit spezifischer Affinität zu den Kernen, wirft sich hauptsächlich auf diese, färbt aber auch die Zellulosemembranen, während die Kernkörperchen isoliert leuchtend pyroninrot hervortreten und der Zellinhalt, das Protoplasma einerseits, die Reservestoffe andererseits ebenfalls das Pyronin, wenn auch nur spurweise, aufnimmt. Wir finden also hier dieselben Farbdifferenzen wie beim tierischen Gewebe. Für dieses konnte bekanntlich, wie schon oben erwähnt, durch die Arbeiten von P. G. Unna bewiesen werden, daß die im tierischen Nukleolus befindliche Substanz, welche sich mit dem Pyronin verbindet, ein Globulin ist. Ob es gelingt, ein ähnliches Eiweiß im pflanzlichen Kernkörperchen nachzuweisen, kann erst durch eine sorgfältige Chromolyse erwiesen werden.

Dienten uns die bisher genannten Färbungsmethoden von vornherein nur zum Nachweis saurer Eiweiße, da sie als basische Farben sich nur mit solchen verbinden, so müssen wir zur Prüfung basischer Eiweiße saure Farben und Farbgemische heranziehen.

Gerade die guten Erfahrungen mit der Färbung mit Haematoxylin (Böhmmer), die uns für die tierische Histologie unentbehrlich geworden ist, da sie es uns gestattet, gewisse basische Eiweiße der tierischen Zelle näher zu bestimmen, ließen uns diese Färbung auch auf unser pflanzliches Material anwenden. Hier zeigte sich nun, daß im Normalpräparat der Wurzelspitze von *Allium* ein so geringer Intensitätsunterschied zwischen Kern und Kernkörperchen, im Gegensatz zur tierischen Zelle, auftritt, daß der ganze Kernapparat homogen blauviolett gefärbt erscheint, daß also diese Färbemethode für die Chromolyse von *Allium* hinfällig wird. Bei Normalschnitten von Kürbis dagegen speichern zwar die Reservestoffe das Haematoxylin in so hohem Maße, daß hier sogar der ganze Kern fast vollständig verdeckt wird, aber gerade während der Chromolyse treten, nachdem durch bestimmte Lösungsmittel gleichzeitig die basischen Eiweiße der Reservestoffe herausgelöst sind, die vorhandenen Intensitätsunterschiede zwischen Nukleus und Nukleolus deutlich hervor. Diese Neigung der Reservestoffe, die sauren Farben im Gegensatz zu den basischen stärker zu speichern als die Kerne, erschwert die Anwendung einfacher saurer Farben für die Erkennung der basischen Eiweiße im allgemeinen sehr, weist aber nebenbei darauf hin,

daß die Reservestoffe der Hauptsache nach aus basischen Eiweißen bestehen. Hier sind uns daher saure Farbgemische vorteilhafter, da sie Zellinhalt, Kern und Kernkörperchen durch simultane Farbkontraste zur Darstellung bringen. Solche Resultate erzielten wir bei Anwendung des Dioxychroms: Wep³⁾. Nach einer Wep-Färbung zeigen die Nukleoli sowohl in der Embryonalzelle von Allium wie im Kürbissamen eine ausgesprochene Affinität zum Eosin und heben sich rot gefärbt vom Wasserblau speichernden Kern ab. Das Plasma nimmt ebenfalls, wenn auch schwächer, das Wasserblau auf.

Die in der Tabelle zuletzt angeführte Färbungsmethode, die Epithelfaserfärbung, gestattet bei zweizeitiger Anwendung: 1. eines sauren Farbgemisches aus Wasserblau + Orcein + Eisessig + Eosin mit 2. darauffolgender basischer Safraninfärbung mit saurer Nachbeize (Kalium bichromicum), eine kontrastierende Darstellung der basischen (Plasma und Kern) und der sauren Eiweiße des embryonalen (Nukleolus). Durch die Avivierung von Wasserblau mittelst des Eisessigs wirkt sich dieses auf die basischen Eiweiße von Kern und Protoplasma, während das Safranin durch die saure Nachbeize auf dem sauren Eiweiß des Kernkörperchens fixiert wird. Die komplizierte Epithelfaserfärbung ist wegen der Anwesenheit reichlicher, vorwiegend basischer Reservestoffe beim Kürbis nicht brauchbar, da sich bei ihr im Bereich der Reservestoffe stets safraninrote Niederschläge bilden.

Die sauren Eiweiße des pflanzlichen Kernkörperchens lassen sich also am besten durch Toluidinblau, Pyronin (Pappenheim-Unna) und Safranin, welches durch die Chromnachbeize fixiert wird, darstellen; die basischen durch Haematoxylin und Eosin.

Die genannten Methoden sind uns bei Anwendung der Chromolyse auf das pflanzliche Gewebe im allgemeinen unentbehrlich geworden. Jede einzelne trägt dazu bei, uns einen Einblick in die mikrochemischen Verhältnisse der pflanzlichen Zelleiweiße zu ermöglichen. Im folgenden stellen wir die genauen Vorschriften für dieselben kurz zusammen.

Färbemethoden.

- a) 1. Färben der Schnitte in 1% iger Toluidinblaulösung $\frac{1}{2}$ Min.
2. Abspülen in Aqua dest.
3. Entfärben in Alkohol abs. 1—2 Min.
4. Öl, Balsam.
- b) 1. Färben der Schnitte in polychromer Methylenblaulösung $\frac{1}{2}$ Min.

3) Eine Mischung von Wasserblau, Eosin und Phloxin. Ztschr. f. wiss. Mikrosk. 1918, Bd. 34, p. 234.

2. Abspülen in Aqua dest.
 3. Entfärben in Glycerinäthemischung (Hollborn) (1:5 Wasser).
 4. Abspülen in Wasser.
 5. Alkohol, Öl, Balsam.
- c) 1. Färben der Schnitte in einer 1% igen Toluidinblaulösung $\frac{1}{2}$ Min.
2. Abspülen in Aqua dest.
 3. Entfärben in Tannin + Orange-Mischung⁴⁾ 3—5 Min.
 4. Spülen in Wasser.
 5. Alkohol, Öl, Balsam.
- d) 1. Färben in 1% iger Lösung von Neutralviolett extra (Hollborn) 10—15 Min.
2. Abspülen in Wasser.
 3. Differenzieren in Alkohol abs. $\frac{1}{2}$ —2 Min.
 4. Öl, Balsam.
- e) 1. Färben der Schnitte in einer Pappenheim-Unna-Lösung 10—20 Min.
2. Abspülen in Aqua dest.
 3. Kurzes Differenzieren in Alkohol abs.
 4. Öl, Balsam.
- f) 1. Färben der Schnitte in Haematein + Alaun (Böhmer) 1—2 Min.
2. Wässern in Leitungswasser ca. 30 Min.
 3. Entwässern in Alkohol abs.
 4. Öl, Balsam.
- g) 1. Färben der Schnitte in einer Weplösung (Hollborn) 5—10 Min.
2. Spülen in Aqua dest.
 3. Differenzieren in Alkohol abs.
 4. Öl, Balsam.

Epithelfaserfärbung.

- h) 1. Färben der Schnitte in einer Mischung von Wasserblau + Orcein + Eisessig (Hollborn) und einer 1% igen spirituösen Eosinlösung (4 Tropfen:15 Tropfen) 3—5 Min.
2. Gutes Spülen in Aqua dest.
 3. Färben in einer 1% igen Safraninlösung 5—10 Min.
 4. Spülen in Wasser.
 5. Nachbeizen in einer 5% igen Lösung von Kalium bichromicum 5—10 Min.
 6. Spülen in Wasser.
 7. Differenzieren in Alkohol abs. — 5 Min.
 8. Öl, Balsam.

4) 2 ccm einer 30% igen Tanninlösung + 1—2 Tropfen einer 1% igen Orange-lösung.

II.

Lösungen und Fällungen (Chromolyse) des pflanzlichen Kernkörperchens (Kürbissamen).

Die hier zunächst mitzuteilenden chromolytischen Ergebnisse beziehen sich nur auf ein bestimmtes Material, den Kürbissamen. Da sich im Laufe der Untersuchungen eine wesentliche Differenz zwischen den Kernkörperchen dieser und denen der Wurzelspitze ergab, müssen die bei letzterer gewonnenen Resultate einer späteren Arbeit vorbehalten bleiben.

Die Kernkörperchen der Kürbissamen bilden im Gegensatz zu den tierischen Kernkörperchen eine morphologische Einheit; es findet sich hier nicht der schmale, aus Nuklein bestehende, abweichende Randsaum wie bei jenen. Diese Einheit besteht aber nur in morphologischem Sinne, chemisch haben wir es auch hier mit den zwei gänzlich verschiedenen Gruppen der sauren und basischen Eiweiße zu tun. Die Kenntnis der ersteren erlangen wir durch basische, die der zweiten durch saure Färbungen. Bei den letzteren ergab sich sogar die Notwendigkeit, eine weitere Unterteilung vorzunehmen, da die Färbung mit einfach sauren Farben nicht vollständig übereinstimmte mit denjenigen Färbungen, die wir mittelst Haematein-Alaun erzielten. Daraus war zu folgern, daß auch die diesen Färbungen zugrunde liegende Gruppe basischer Eiweiße des Kürbissamens keine einheitliche ist, sondern sich aus wenigstens zwei verschiedenen Eiweißen zusammensetzt. Eine solche Notwendigkeit besteht für die basischen Färbungen nicht, so daß wir die sauren Eiweiße des Kürbissamens in der Tat als eine Einheit betrachten können, indem so verschiedene basische Farben wie Toluidinblau und Pyronin sich in bezug auf die chromolytischen Ergebnisse vollständig gleich verhalten. Wir treffen hier also nicht auf zwei ganz verschiedene saure Eiweiße, wie auf das Globulin und Nuklein beim tierischen Kernkörperchen, wo ja schon das durch die Pappenheim-Unna-Färbung erzeugte mikroskopische Bild beweist, daß es sich nicht um ein einheitliches saures Eiweiß handeln kann. Diesen aus der orientierenden Voruntersuchung hervorgehenden Tatsachen entspricht die Dreiteilung unserer Tabelle in eine Rubrik für saures Eiweiß (Färbung mit Pappenheim-Unna und Toluidinblau), eine zweite Rubrik für jenes basische Eiweiß, welches für Haematein + Alaun Affinität besitzt, und eine dritte Rubrik für dasjenige basische Eiweiß, welches sich mit allen sauren Farben (z. B. Eosin aus Wep) spezifisch färbt.

Das Zeichen + in der Tabelle bedeutet Erhaltung, bezw. Färbbarkeit des betreffenden Zelleiweißes, O Löslichkeit desselben, \odot teilweise Löslichkeit, geschlossen aus der schwächeren Färbbarkeit.

Was nun die Ergebnisse der Chromolyse betrifft, so erzielen allerdings die meisten unserer Lösungsmittel eine gleiche Wirkung beim Kürbissamen wie bei den tierischen Nukleoli, aber einige scharfe Unter-

Lösungstabelle saurer und basischer Eiweißse des Kernkörperchens
im Kürbissamen.

+ = erhalten, O = gelöst, Θ = teilweise gelöst.

Lösungsmittel	Conc.	Temp.	Std.	Kernkörperchen			
				Tier	Kürbissamen		
					Basische Färbung	Saure Beizen- färbung	Saure Färbung
Aqua dest.		37°	20	+	O	+	+
"		100°	"	+	O	Θ	O
Alkohol	70 %	37°	"	+	+	+	+
Kochsalz	2 %	"	"	O	O	+	+
"	18 %	"	"	+	+	+	+
"	36 %	"	"	+	+	+	+
Ammonsulfat	2 %	"	"	O	O	+	+
"	1/2 ges.	"	"	+	+	+	+
"	ges.	"	"	+	+	+	+
Magnesiumsulfat	2 %	"	"	+	+	+	+
"	ges.	"	"	+	+	+	+
Zinksulfat	2 %	"	"	+	+	+	+
"	ges.	"	"	+	+	+	+
Ferrocyankalium	2 %	"	"	O	O	O	O
Salzsäure	1 %	"	"	+	+	Θ	+
"	10 %	"	"	O	O	Θ	+
Schwefelsäure	1 %	"	"	+	+	+	+
"	10 %	"	"	O	O	Θ	+
Salpetersäure	1 %	"	"	+	+	+	+
"	10 %	"	"	O	O	Θ	+
Borsäure	1 %	"	"	O	+	+	+
"	4 %	"	"	+	O	+	+
Trichloressigsäure	2 %	"	"	+	+	+	+
Essigsäure	1 %	"	"	+	+	+	+
"	25 %	"	"	O	+	+	+
"	100 %	"	"	O	+	O	O
Kochsalz + Essigsäure	2 %	"	"	+	+	+	+
Ferrocyanal + "	2 %	"	"	+	+	+	+
Buttersäure	1 %	"	"	+	+	+	+
Apfelsäure	1 %	"	"	+	+	+	+
Zitronensäure	1 %	"	"	+	+	+	+
Milchsäure	1 %	"	"	+	+	+	+
Kohlensäure		"	"	+	Θ	+	O
Oxalsäure	1 %	"	"	O	O	+	+
Kalilauge	1 %	"	"	O	O	O	O
"	40 %	"	"	O	O	O	O
Soda	1 0/100	"	"	O	O	O	+
"	1 %	"	"	O	O	O	O
"	10 %	"	"	O	O	O	O
Alaun	1 %	"	"	O	O	Θ	+
Essigsäure Tonerde		"	"	O	O	+	+
Sublimat	1 %	"	"	+	+	+	+
Bleiacetat	2 %	"	"	+	+	+	+
Kupfersulfat	2 %	"	"	+	O	+	+
JK + HgJ ₂		"	"	+	+	+	+
Pepsin	1 %	"	"	+	O	+	+
Pepsin + HCl	1 %	"	"	O	O	O	O
Trypsin	1 %	"	"	O	O	O	O
Trypsin + Soda	1 %	"	"	O	O	O	O
Pankreatin	1 %	"	"	O	O	O	O

schiede treten doch auf. So erhält Aqua destillata bei 37° und nach 20 stündiger Einwirkung die sauren Eiweiße der tierischen Nukleoli, wie eine Pappenheim-Unna-Färbung deutlich zeigt, d. h. das sich dort mit dem Pyronin färbende Globulin widersteht natürlich einer Behandlung mit destilliertem Wasser unverändert und färbt sich — wie in der Norm — stark rot. Hingegen erfährt der mit Aqua dest. vorbehandelte Schnitt des Kürbissamens eine große Veränderung, er verwandelt sich fast in ein reines Konturenbild. Sämtlicher Zellinhalt, bis auf schwache Kern- und Reservestoffreste, ist verschwunden, und nur die Zellulosemembranen sind, nach wie vor blaugrün gefärbt, erhalten. Es müssen also alle sauren Eiweiße vom Kern und vor allem die der Kernkörperchen und Reservestoffe, die sich mit Pyronin färben lassen, in Lösung gegangen sein. Folglich ist auch, was uns hier besonders interessiert, das saure, pyroninliebende Eiweiß des Kernkörperchens wasserlöslich. Dasselbe negative Resultat zeigt das gleich vorbehandelte Präparat, wenn man es mit Toluidinblau färbt, wo nebenbei die Zellulose schön violett tingiert meta-chromatisch hervortritt.

Wie ein photographisches Positiv zu diesen negativen Bildern wirkt nun der in gleicher Weise mit Wasser vorbehandelte Schnitt, wenn er mit Haematoxylin oder Wep gefärbt wird. Alle Zellelemente treten wiederum klar hervor, nur sind, was für unseren Zweck vorteilhaft ist, die Reservestoffe etwas schwächer gefärbt als im Normalpräparat, so daß sich Kern und Kernkörperchen jetzt deutlich voneinander unterscheiden lassen, folglich werden die **basischen** Eiweiße dieser Nukleoli nicht, wie die sauren, von Aqua dest. angegriffen und gelöst.

Schwache Lösungen von Kochsalz, Ammonsulfat und Ferrocyankalium (2 %) verhalten sich hierin ebenso wie Wasser; auch sie lösen sämtliche sauren Eiweiße aus dem Zellinhalt des Kürbissamens vollständig auf, so daß wiederum nach einer Pappenheim-Unna- und Toluidinblau-Färbung nur ein leeres Konturenbild entsteht. Daß aber die basischen Eiweiße derselben Zellelemente dann noch vorhanden sind, beweist wiederum die Färbung mit Haematoxylin und Wep, welche dieselben deutlich gefärbt hervortreten lassen. Bei vorheriger Einwirkung einer halb und ganz gesättigten Kochsalzlösung dagegen finden wir keine Lösung der sauren Eiweiße, sondern eine Fällung, genau wie bei den basischen, so daß so vorbehandelte Präparate nach allen, d. h. basischen sowohl wie sauren Färbungen, den unvorbehandelten gleichen.

Hiervon abweichend verhalten sich die Neutralsalze: Zinksulfat und Magnesiumsulfat, untereinander aber übereinstimmend; sie fällen nämlich das saure Eiweiß des Kernkörperchens im Kürbissamen nicht nur in höherer Konzentration, sondern auch schon in 2 % iger Lösung, in scharfem Gegensatz zum Kochsalz, Ammonsulfat und Ferrocyankalium, welche sie, wie eben erwähnt, in 1- und 2 % iger Lösung lösen.

Genau denselben Unterschied zwischen schwachen Lösungen von Zinksulfat und Magnesiumsulfat einerseits und den Alkalisalzen auf der anderen Seite finden wir übrigens, wie neuere Untersuchungen gezeigt haben, auch beim Globulin des tierischen Kernkörperchens. Sonst herrscht, abgesehen von dem bemerkenswerten Verhalten des Wassers, bei fast allen übrigen von uns beim Kürbissamen gebrauchten Eiweißreagentien eine völlige Übereinstimmung mit dem Globulin des tierischen Nukleolus. Gehen wir an Hand der Tabelle die einzelnen Reagentien durch, so ist also, wie das Globulin des tierischen Nukleolus, das saure Eiweiß des Kernkörperchens im Kürbissamen löslich in: schwachen Kochsalz-, Ammonsulfat- und Ferrocyankaliumlösungen, 10 % igen Mineralsäuren, 1 % iger Oxalsäure, den Alkalien: Kalilauge (1 %, 40 %) und Soda (1⁰/₁₀₀, 1 %, 10 %), Alaun, essigsaurer Tonerde, Pepsin + HCl, Trypsin und Trypsin + Soda; unlöslich in: Alkohol (70 %), konz. Neutralsalzlösungen, Kochsalz + Essigsäure, Ferrocyankalium + Essigsäure, 1 % igen Mineralsäuren, Essigsäure in schwacher und konzentrierter Lösung, in den Schwermetallen (Sublimat, Bleiacetat, Jodkalium + Jodquecksilber), endlich auch in den organischen Säuren (Buttersäure, Apfelsäure, Zitronensäure, Milchsäure).

Besonders interessante Verhältnisse bestehen bei diesen organischen Säuren: Milchsäure, Buttersäure, Apfelsäure und Zitronensäure. Diese haben nebenbei die Eigenschaft gemeinsam, eine stärkere Einwirkung auf die Eiweiße des Kerns als auf diejenigen des Kernkörperchens auszuüben. Die nach dieser Vorbehandlung folgenden Färbungen weisen demnach wohl gequollene, aber noch sehr deutlich tingierte Nukleoli auf, während die Kerne nur noch sehr schwach gefärbt, also teilweise gelöst werden. Diese organischen Säuren hindern mithin das Lösungsvermögen des einfachen Wassers für die sauren Kernkörpercheneiweiße vollkommen. Für die Natur des hier vorliegenden Eiweißes ist aber von noch größerer Bedeutung das Verhalten der Essigsäure, welche bei allen Konzentrationen (1—100 %) die Wasserlöslichkeit desselben aufhebt. Dagegen hindert viel Kohlensäure haltiges Wasser die Wasserlöslichkeit nur wenig; es resultiert eine gleichmäßige, aber bedeutend schwächere Färbung, was in der Tabelle durch das Zeichen \ominus angedeutet ist. Die Oxalsäure endlich setzt dem Lösungsvermögen des Wassers gar kein Hindernis entgegen; die sauren Eiweiße des Kürbiskernkörperchens werden durch Oxalsäure vollkommen aufgelöst.

Was endlich die Fermente betrifft, so ist das saure Eiweiß der Kernkörperchen des Kürbissamens in den gewöhnlichen (Pepsin, Pepsin + HCl, Trypsin, Trypsin + Soda, Pankreatin) löslich, während bekanntlich Globulin in einer nicht angesäuerten Pepsinlösung so wenig löslich ist wie in Wasser.

Überblicken wir die Resultate, welche aus dieser Tabelle für das saure Eiweiß des Kernkörperchens im Kürbissamen hervorgehen, so ist unstreitig das wichtigste Ergebnis derselben die unerwartete Löslichkeit in Wasser, welche die Annahme von Globulin in den Kern-

körperchen des Kürbissamens unmöglich macht. Globulin ist aber weiter noch deswegen ausgeschlossen, weil es in 2 % iger Kupfersulfat- und -acetatlösungen unlöslich ist, dagegen in 100 % Essigsäure löslich ist, während das saure Eiweiß des Kernkörperchens, wie die Tabelle ergibt, in den Kupfersalzen löslich ist. Wir müssen nun nach Ausschließung des Globulins an einen Vergleich mit den übrigen bekannten Eiweißen herantreten.

Außer Globulin lassen sich noch folgende Eiweiße ausschließen (s. Tabelle):

Albumin, weil es in kochendem Wasser und 2 % iger Kupfersulfat- und -acetatlösung unlöslich, anderseits in gesättigter Kochsalzlösung, schwacher Salzsäure und Essigsäure löslich ist.

Protalbumose, weil sie in 2 % iger Kupfersulfat- und -acetatlösung unlöslich ist, dagegen von gesättigter Kochsalzlösung, 70 % igem Alkohol, schwachen Mineralsäuren, schwacher und starker Essigsäure gelöst wird.

Die **Deuteroalbumosen** lassen sich im allgemeinen wegen ihrer Löslichkeit in 70 % igem Alkohol, gesättigter Kochsalzlösung, schwachen Mineralsäuren, schwacher und starker Essigsäure ausschließen.

Heteroalbumose kommt nicht in Frage, weil sie in 2 % iger Kupfersulfat- und -acetatlösung unlöslich, dagegen in schwachen Mineralsäuren und Kochsalz + Essigsäure löslich ist.

Akroalbumose läßt sich ausschließen, da sie in Kupfersulfat und -acetat unlöslich, dagegen in Kochsalz + Essigsäure löslich ist. Aber immerhin steht die Akroalbumose von Kühne dem sauren Kernkörpercheninhalt des Kürbissamens am nächsten. Er teilt mit ihr fast alle Reaktionen mit Ausnahme der eben genannten.

Gerade in diesen Beziehungen stimmt aber der saure Kernkörpercheninhalt mit derjenigen Deuteroalbumose überein, welche wir neuerdings als nächste Verwandte der Akroalbumose aus dem Granoplasma der tierischen Zellen isoliert und näher kennen gelernt haben, mit der **Cytose**. Diese, ein weit verbreiteter Zellbestandteil im Tierreich, teilt mit unserem sauren Kernkörpercheneiweiß, wie die Tabelle zeigt, alle charakteristischen Eigenschaften. Wir haben in der Tat bisher noch keine Eigenschaft des sauren Eiweißes im Kernkörperchen des Kürbissamens gefunden, welche nicht mit dem Verhalten der tierischen Cytose übereinstimmt⁵⁾. Dieses Resultat ist um so bemerkenswerter, als im tierischen Körper die Cytose niemals im Kernkörperchen vorkommt,

5) Hier ist eine kleine Einschränkung zu machen, die sich auf ein merkwürdiges Verhalten der Borsäure bezieht. Von dieser ist in früheren Arbeiten festgestellt worden, daß sie die tierische Cytose in 1 % iger Lösung löst, in 4 % iger fällt. Bei dem Kernkörperchen des Kürbissamens hat sich nun herausgestellt, daß das fragliche cytoseähnliche Eiweiß umgekehrt in 1 % iger Borsäure unlöslich ist, aber von einer 4 % igen gelöst wird.

sondern nur im Protoplasma. Es liegt hier also ein Grundunterschied zwischen tierischer und pflanzlicher Zelle vor, welcher aber, wenn man den anatomischen Bau der Kerne hier und dort ins Auge faßt, gar nicht so unerklärlich ist. Während das tierische Kernkörperchen sich durch eine konstante feste Umhüllung mit einem nukleinhaltigen Randsaum auszeichnet, fehlt dieser beim pflanzlichen Kernkörperchen. Das saure tierische Kernkörpercheneiweiß ist mithin viel besser gegen den Einfluß der Körpersäfte und ihrer Salze geschützt und geborgen als das pflanzliche. Es wäre also ganz gut zu verstehen, daß beim ruhenden Samen der Pflanze im Kernkörperchen bereits Abbauprodukte des sauren Kernkörpercheneiweißes vorkommen, die wir in dem so gut nach außen geschützten tierischen Kernkörperchen nicht finden.

In allen genannten Beziehungen verhält sich das saure Eiweiß des Kernkörperchens im Kürbissamen tatsächlich als eine Einheit, so daß es wohl erlaubt ist, hier gerade so von einem „Cytosegehalt“ zu sprechen wie beim tierischen Kernkörperchen von seinem „Globulingehalt“.

Etwas anders ist es mit den basischen Eiweißen des Kernkörperchens im Kürbissamen. Hier sind wir, wie gesagt, auf zwei grundverschiedene saure Färbungen angewiesen, auf das Dioxychrom:Wep als Vertreter der einfach sauren Farben und die saure Beizenfarbe: Haematein + Alaun. Im großen und ganzen stimmen die Resultate mit diesen beiden Färbungen sehr gut überein. Die basischen Eiweiße des Kernkörperchens sind nämlich unlöslich in Wasser bei 37°, in 70%igem Alkohol, schwachen Mineralsäuren, in Ferrocyankalium + Essigsäure, in allen organischen Säuren mit Ausnahme von konzentrierter Essigsäure, weiter in 1/100 iger Sodalösung, essigsaurer Tonerde, in den Lösungen der Schwermetalle und in neutraler Pepsinlösung und lassen sich nach Vorbehandlung mit diesen Substanzen noch durch beide sauren Färbungen in gleicher Weise darstellen. Ebenfalls sind die basischen Eiweiße gleichmäßig löslich in konzentrierter Essigsäure, in 2% iger Ferrocyankaliumlösung, in den Alkalien: KOH und Soda (1%, 10%) und in den Fermenten: Pepsin + HCl, Trypsin + Soda und Pankreatin. Dagegen zeigen sich insofern bemerkenswerte Unterschiede zwischen den beiden Färbungen der basischen Eiweiße, als in der Kochhitze das Wasser das eosinliebende Eiweiß löst, dagegen das Haematein + Alaun liebende nicht vollständig beseitigt. Nach der Vorbehandlung mit 10% iger HCl, H₂SO₄ und HNO₃ läßt sich mit Wep noch ein basisches Eiweiß nachweisen, weniger deutlich aber mittelst Haematein + Alaun. Dieses ließe sich wohl durch eine Aufnahme jener Säuren in das Molekül des basischen Eiweißes (Bildung von Acidalbumin) erklären, da das nachher anfärbende Wasserblau (im Wep) bekanntlich durch jede Mineralsäure stark aviviert⁶⁾, die Haematein + Alaun-Färbung dagegen ab-

6) Es ist wohl auch als eine Folge dieser Avivierung anzusehen, daß mitunter die normale Eosinfärbung des Kernkörperchens nach der Säurevorbehandlung durch eine Wasserblaufärbung ersetzt wird.

geschwächt wird. Diesen Säuren schließt sich auch noch das saure Salz Alaun an, indem nach Vorbehandlung mit einer 1% igen Lösung in der Wärme die Wepfärbung sich normal verhält, dagegen die mit Haematein + Alaun sichtlich schwächer als normal ausfällt. Auch dieser leichte Unterschied dürfte sich als eine Nachwirkung des Lösungsmittels auf die nachfolgende Färbung deuten lassen. Eigentümlich aber bleibt es immerhin, daß nach Einwirkung des CO_2 -Stroms keine Eosinfärbung der basischen Kernkörpercheneiweiße mehr zustande kommt, während eine solche mit Haematein + Alaun noch zu erzielen ist. Diese allerdings sehr geringen Unterschiede zwischen dem eosinliebenden und dem haemateinliebenden basischen Eiweiß beweisen, daß die basischen Eiweiße nicht als eine Einheit aufzufassen sind, sondern daß sich hinter diesen wenigstens zwei verschiedene, wenn auch nah verwandte Eiweiße verbergen. Jedenfalls ist es geraten, bei der basischen Eiweißgrundlage des Kürbiskernkörperchens vorläufig nicht von einem basischen Eiweiß, sondern von „basischen Eiweißen“ zu sprechen.

Ergebnisse.

1. Die für tierische Eiweiße erprobten Färbungen lassen auch eine Anwendung auf die pflanzlichen Eiweiße zu.
 2. Die bisher hauptsächlich für die mikrochemische Analyse tierischer Gewebelemente mit gutem Erfolge angewandte Methode der Chromolyse läßt sich auch zur Erforschung der pflanzlichen Zellgebilde benutzen.
 3. Während beim tierischen Kernkörperchen, soweit saure Eiweiße in Betracht kommen, eine nukleinhaltige Hülle von einem globulinhaltigen Inhalt zu unterscheiden ist, besitzt das Kernkörperchen des Kürbissamens einen einheitlicheren Bau. Hier ist als saures Eiweiß nur Cytose nachweisbar.
 4. Die basische Eiweißgrundlage des Kernkörperchens des Kürbissamens scheint dagegen nach den bisherigen Lösungsversuchen aus zwei etwas verschiedenen basischen Eiweißen zu bestehen.
-

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Biologisches Zentralblatt](#)

Jahr/Year: 1921

Band/Volume: [41](#)

Autor(en)/Author(s): Unna P. G., Fein Henny

Artikel/Article: [Zur Chromolyse des pflanzlichen Kernkörperchens. 495-507](#)