

WAS LEHRT DIE FLUORESZENZMIKROSKOPIE VON DER PLASMAPERMEABILITÄT UND STOFFSPEICHERUNG?

Von PROF. DR. KARL HÖFLER, Wien

Die Fluoreszenzmikroskopie war im wesentlichen auf die Bearbeitung anatomischer Fragen beschränkt, solange man im ultravioletten Licht nur die Eigenfluoreszenz der Zellen und Gewebe beobachtete. Seitdem aber HAITINGER die Methodik der Fluorochromierung begründet hat, nach der die zu untersuchenden Gewebs- oder Zellelemente durch Vorbehandlung mit fluoreszierenden Lösungen zum Leuchten gebracht werden, hat nicht nur die anatomische Forschung weiteren Auftrieb erfahren, sondern die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung konnte in steigendem Maß auch in den Dienst wichtiger Fragen der Physiologie gestellt werden. Auf botanischer Seite sind die Erfolge auf dem Felde der Stoffleitung und Saftbewegung allgemein bekannt. In der eigentlichen Zellphysiologie ist es besonders die Permeabilitätsforschung und das Problem der zellulären Stoffaufnahme und Stoffspeicherung, das durch die Anwendung der Fluorochromtechnik bedeutsam gefördert und vertieft werden konnte.

Hatte beim Studium der Stoffaufnahme in die Zelle schon die Vitalfärbung mit gewöhnlichen Hellfeldfarbstoffen vor den anderen, osmotischen oder mikrochemischen, Methoden den großen Vorteil direkter Anschaulichkeit geboten, so sind bei der Fluorochromfärbung weit geringere, lebensunschädliche Konzentrationen vonnöten, und man erhält, wie schon HAITINGER (1938) betont, sehr oft vielfarbige Bilder, wenn auch nur ein einziger Stoff zur Anregung des Fluoreszenzlichtes verwendet wird (Fluoreszenz-Metachromasie).

Nachdem DÖRING (1935) in einer genialen Studie die Fluoreszenzmikroskopie in den Dienst zellphysiologischer Fragen gestellt hatte, war es zweifellos vor allem STRUGGER, der in umfassenden, planmäßigen Untersuchungen die Fruchtbarkeit der neuen Methoden dartun konnte. In methodischer Hinsicht ist es sein Verdienst, die Abhängigkeit des Färbefeffektes von der Reaktion des Farbbades, d. h. von der Wasserstoffionenkonzentration planmäßig und konsequent untersucht zu haben, indem er den gleichen Farbstoff jeweils in Reihenversuchen mit abgestuftem p_H zur Anwendung bringt. Bei der Herstellung der Farblösungen verdienen Phosphatpuffer (vgl. z. B. REICHERT 1934, S. 8) den Vorzug, wenn lebende Zellen untersucht werden sollen.

STRUGGERS in mehreren Abhandlungen niedergelegte Ergebnisse sind von so großer Bedeutung, daß ich mich schon vor einigen Jahren zu eingehender Nachprüfung und Erweiterung seiner Grundversuche entschloß. STRUGGER hatte zuerst den sauren Farbstoff Kaliumfluorescein (1938 a), dann aber vor allem basische Fluorochrome: das Berberinsulfat (1939), das Akridinorange (1940 a ff.), das Neutralrot (1940 d), das Benzoflavin, Akri-

din, Pyronin (1941 a) und Auramin (1943 b) eingehendst untersucht. Nur von der Aufnahme und Speicherung der basischen Farben soll in dieser ersten Mitteilung die Rede sein.

Die basischen Farbstoffe sind bekanntlich meist bei saurer Reaktion ganz oder zum Großteil ionisiert, bei alkalischer Reaktion aber in Form undissoziierter Moleküle vorhanden. Der Umschlagsbereich liegt für die einzelnen Farbstoffe verschieden in der pH -Reihe. Die Moleküle sind nun lipoidlöslich und fähig, durch das lebende Plasma ins Zellinnere zu permeieren, die Ionen sind lipoidunlöslich und der Durchtritt durch das Plasma ist ihnen versperrt. Im molekularen Zustand können die basischen Farbstoffe daher bis in den Zellsaft dringen, während ihnen im ionisierten zunächst nur die Zellwand mit ihren submikroskopisch engen kapillaren Räumen zugänglich ist, wo sie gegebenenfalls adsorptiv festgelegt werden. Es ist eine vielfach bestätigte Tatsache, daß sowohl Hellfeldfarbstoffe (DRAWERT 1939, 1940) als Fluorochromfarbstoffe (STRUGGER l. c.) je nach dem pH -Wert des Farbbades im ionisierten Zustand nur die Zellmembranen, im molekularen aber auch das Zellinnere, im besonderen die Vakuolen anzufärben vermögen. Diese Feststellung liefert zugleich einen der wertvollsten Beweise für die Gültigkeit der Lipoidtheorie der Plasmapermeabilität, wonach lipoidlösliche Substanzen permeieren können, lipoidunlösliche im allgemeinen nicht.

Das Permeieren eines Farbstoffes genügt allerdings allein noch nicht, damit eine vitale Färbung des Zellinhaltes sichtbar wird. Denn die Permeation ist ein Diffusionsvorgang und kann als solcher nach dem FICKschen Gesetz nur so lange andauern, als ein Diffusionsgefälle für den Farbstoff besteht. Bei der extrem hohen Durchlässigkeit des Plasmas für Farbbasen — COLLANDER (1943) bestimmt an *Allium*-Zellen die Permeationskonstante der Neutralrotbase mit etwa 1800 — erfolgt der Konzentrationsausgleich binnen kürzester Zeit; dann ist aber die dünne Farbschicht in den Zellen mikroskopisch noch nicht zu sehen. Der Farbstoff muß nicht nur permeieren, er muß auch gespeichert werden, das Diffusionsgefälle muß dabei erhalten bleiben, damit eine sichtbare Vitalfärbung zustande kommt.

Am eingehendsten ist von STRUGGER (1940 a) unter den basischen Fluorochromfarbstoffen das *Akridinorange* untersucht worden. Wenn man pH -gestufte Reihen von Lösungen dieses Farbstoffes zur Anwendung bringt, so werden alle wichtigen Zellbestandteile, also Plasma, Zellkern, Zellsaft und Zellmembran spezifisch angefärbt. STRUGGERs Objekt war die innenseitige Epidermis der Schuppen unserer Küchenzwiebel (*Allium cepa*), die, jederzeit zur Verfügung stehend, als feines Häutchen abgezogen wird und nach Entlüftung durch die Wasserstrahlpumpe ohne Schnittverletzung der mikroskopischen Beobachtung zugänglich ist. Die wichtigsten Ergebnisse STRUGGERs sind an diesem vorzüglichen Objekt der Zellforschung gewonnen worden. Die Präparate werden etwa 10 Minuten lang in Farblösungen 1 : 10.000 von abgestuftem pH -Wert gefärbt und sodann im entsprechenden ungefärbten Phosphatpuffer vom gleichen pH ausgewaschen und darin aufbewahrt und untersucht.

Ich setze STRUGGERS eigene Tabelle hierher, wobei ich bemerke, daß ich in eingehender, oftmals wiederholter Nachprüfung am ruhenden Zwiebelmaterial alle seine experimentellen Befunde bestätigt fand und, wie im folgenden auszuführen, nur in der theoretischen Interpretation des Gesehenen in einigen Punkten zu grundsätzlich anderer Auffassung als der von STRUGGER vorgetragenen gelangt bin.

Allium cepa, gefärbt mit Akridinorange
(aus STRUGGER, 1940a, S. 102)

pH ungef. gef.	Membran	Plasma	Kern	Vakuole	Bemerkungen
$\frac{2,07}{2,04}$	+ grüngelb	-	-	-	Membranen grüngelb! Zellen am Leben, normal
$\frac{3,44}{3,45}$	+++ kupferrot	-	-	-	Membranen kupferrot! Zellen am Leben, normal
$\frac{4,98}{4,76}$	+++ kupferrot	-	+ - grün	-	keine Vakuolenkontraktion
$\frac{5,98}{5,98}$	+++ kupferrot	+ - grün	+ grün	-	keine Vakuolenkontraktion
$\frac{6,48}{6,42}$	+++ kupferrot	+ grün	++ grün	-	keine Vakuolenkontraktion
$\frac{7,16}{7,18}$	+ grüngelb	++ grün	++ grüngelb	+++ kupferrot	Vakuolenkontraktion, besonders in Wundrand- zellen stärkere Vakuolen- färbung
$\frac{7,36}{7,39}$	+ grüngelb	++ grün	++ grüngelb	+++ kupferrot	Vakuolenkontraktion, besonders in Wundrand- zellen stärkere Vakuolen- färbung

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die pH -Abhängigkeit der Farbstoffverteilung und -speicherung in der lebenden Zwiebelzelle. Wie man sieht, wird der Farbstoff jeweils selektiv von bestimmten Zellelementen festgehalten, und jeder Zellenbestandteil reagiert in färberischer Hinsicht prinzipiell verschieden bei saurer und bei schwach basischer Reaktion.

Wir haben nun die Aufgabe, die einzelnen Schwellenwerte wissenschaftlich zu diskutieren und, wo es möglich ist, physikalisch-chemisch zu erklären.

Was zunächst die Zellmembran betrifft, so ist die scharfe Schwelle zwischen p_H 2,07 und p_H 3,45 höchst auffällig. Im stark sauren Bereich färben sich die Membranen nur zu schwacher grünlicher Fluoreszenz; diese beruht, wie STRUGGER gezeigt hat, auf bloßer Imbibition des submikroskopischen Kapillarsystems (FREY-WYSSLING 1937) der Zellwand mit der Farblösung. Schon bei p_H 3,4 sind dagegen alle Zellmembranen zu kräftigster, „gleichmäßig kupferroter“ Fluoreszenz angefärbt. Reihenversuche in Farbbädern mit feinerer p_H -Abstufung ergaben mir Schwellenwerte um p_H 2,8—2,9. — Die Erklärung des Phänomens, die STRUGGER gab, trifft zweifellos das Richtige. BRÄUTIGAM (1946) hat schon auf diesen schönen Erfolg fluoreszenzmikroskopischer Technik hingewiesen: Der isoelektrische Punkt (IEP) der untersuchten Allium-Zellmembranen liegt nach DRAWERT (1937) um p_H 3. Oberhalb des IEP sind die Zellwandungen negativ aufgeladen und können daher die positiv geladenen Kationen basischer Farbstoffe elektro-adsorptiv festlegen und speichern. Unterhalb des IEP unterbleibt die Elektro-adsorption. Auch mit basischen Hellfeldfarbstoffen — Neutralrot, Methylenblau, Toluidinblau, Chrysoidin, Mauvein, Gentianaviolett (DRAWERT 1937, S. 97) und vielen anderen — läßt sich die Schwelle ermitteln, allein bei weitem nicht mit solcher Schärfe, wie mit unserem Fluorochrom, bei dem die adsorptive Speicherung zu auffälligster, leuchtend kupferroter Fluoreszenz der Membranen führt. STRUGGERs elegante Methode der Schwellenbestimmung verdient allgemeine Anwendung. Offen bleibt eigentlich nur die terminologische Frage, ob man, wie wir es hier im Anschluß an STRUGGER und DRAWERT tun, von einem „isoelektrischen Punkt“ der Zellulosemembran sprechen darf. Wenn die Zellulose (vgl. z. B. MICHAELIS 1922) zwar oberhalb eine negative Ladung, unterhalb des Punktes aber keine positive zeigte, so wäre vom physiko-chemischen Standpunkt der Ausdruck „Entladungspunkt“ einwandfreier (vgl. HÖFLER 1946). Wir glauben aber doch, vorläufig dem Sprachgebrauch DRAWERTs und STRUGGERs folgen zu dürfen.

Bei Chitinmembranen höherer Pilze (HÖFLER u. PECKSIEDER 1947) liegt der IEP etwa um 1 p_H -Einheit höher in der p_H -Reihe als bei den Zellulosemembranen; dabei ist der Übergangsbereich zwischen grünlicher Imbibitions- und vollroter Adsorptionsfärbung dort wesentlich breiter. Während noch VAN WISSELINGH (1925) betont, daß sich Chitin auf färbischem Wege allein von Zellulose nicht unterscheiden lasse, ist damit — auch für mikrotechnische Zwecke — ein Weg zur Unterscheidung gewiesen. Wenn der IEP für Pilzchitin und Zellulose verschieden liegt, dann muß in einer gewissen Zone der absteigenden p_H -Reihe (nämlich etwa zwischen p_H 3,8—2,8, praktisch zwischen p_H 3,5—3,0) die Zellulosemembran die basischen Farbstoffe noch elektro-adsorptiv festhalten, die Pilzchitinmembran aber nicht mehr.

Die kupferrote Fluoreszenzfärbung der Zellulosewand mit Akridinorange reicht nach STRUGGER von etwa pH 3 bis pH 6,48. Bei pH 7,16 zeigen die Membranen wieder bloß einen schwachen grünlichen Farbton. STRUGGER erklärt diese obere Schwelle so, daß „von pH 2,04 bis pH 6,48 der Farbstoff in dissoziierter Form vorliegt. Bei weiterer Alkalinisierung wird die Dissoziation aber vollkommen zurückgedrängt“. „Solange der Farbstoff dissoziiert ist, muß sich oberhalb ihres IEP die Membran stark elektroadsorptiv anfärben, was auch der Fall ist. Liegt der Farbstoff aber in molekularer Form vor, so färbt sich lediglich das Plasma und vor allem in vollkommener Parallele zum Neutralrot die Vakuole.“ STRUGGER hat Farblösungen mit abgestuften pH -Wert auch kataphoretisch im Gleichstromfeld untersucht. Bei pH 2,04—6,48 war an der Kathode ein deutlicher Anstieg mit starker Farbstoffansammlung wahrzunehmen. Bei pH 7,1 und 7,4 war letzterer stark geschwächt. Mit KOH alkalisierte Farblösungen zeigten keinen Unterschied zwischen An- und Kathode mehr.

Allium, Innenepidermis, gefärbt mit Akridinorange
(aus HÖFLER 1944/48).

pH $\frac{\text{ungefärbt}}{\text{gefärbt}}$	Vakuole	Kern	Plasma	Membran
$\frac{6,20}{6,28}$	leer	grün	—	gleißend kupferrot
$\frac{6,45}{6,48}$	leer, $\frac{1}{2}$ d. Fl. kontrahiert	+ grün	— $\frac{1}{2}$ d. Fl. blaugrün	zart kupferrot
$\frac{6,60}{6,68}$	stumpf kupferrot kontrahiert	+ + grün	blaugrün	perlschnurartig lackrot
$\frac{6,75}{6,85}$	zart kupferrot kontrahiert	+ + grün	blaugrün	perlschnurartig lackrot bis zart kupferrot
$\frac{6,95}{6,96}$	kupferrot kontrahiert	+ + grün	blaugrün	zart lackrot bis farblos

Ich habe in Versuchen mit fein abgestuften pH -Reihen die Färbeschwelle bei Alliumzellen zwischen pH 6,45 und pH 6,60, bei Epidermiszellen der Blattunterseite von *Orchis maculata* zwischen pH 6,2 und 6,45 gefunden, was STRUGGERs Befunde aufs beste bestätigten. Trotzdem kann ich mich seiner Deutung nicht ganz anschließen. Der Grenzwert gilt nämlich bloß für die

Membranen der lebenden Zellflächen. In toten Teilen der Schnitte, wo die Zellinhalte ausgeflossen sind, stellt sich dagegen die kupferrote Fluoreszenzfärbung bei p_H 7—10 oft so stark oder noch stärker ein als im sauren Bereich. Und gleiches läßt sich bei Reihenversuchen an toten Pflanzenhaaren mit Zellulosemembranen allenthalben beobachten (HÖFLER 1946). Am Ausbleiben der Membranfärbung in lebenden Schnitten im leicht alkalischen Bereich ist demnach nur die Speicher Konkurrenz der lebenden Protoplasten schuld, auf welche STRUGGER und DRAWERT selbst in anderem Zusammenhang hinweisen, und nicht das Fehlen adsorbierbarer Farbkationen. Man muß sich nämlich vor Augen halten, daß der Übergang vom ionisierten zum undissoziierten Zustand keineswegs sprunghaft, sondern ganz allmählich in der p_H -Reihe erfolgt. Wir kommen darauf noch zurück.

Wir halten also das Ausbleiben der roten Membranfluoreszenz oberhalb p_H 6,48 für eine sekundäre Sache. Das primäre Phänomen ist das ziemlich plötzliche Einsetzen der roten Vakuolenfärbung, wenn in der p_H -Reihe der Wert von 6,5 überschritten wird.

Vakuolenfärbung

Wir wenden uns damit zur Frage der Vitalfärbung bzw. Fluorochromierung des Zellsaftes. Auch hier fand ich STRUGGERs Befunde sowohl an Zwiebelinnenepidermen als an mancherlei anderen Zellobjekten bestätigt. Der von ihm gegebenen Deutung der Färbungsschwellen kann ich mich aber nach eingehender Beschäftigung mit der Frage nicht anschließen.

Nachdem Beobachtungen von RUHLAND, BETHE, IRWIN, GUILLIERMOND, CZAJA u. a.¹⁾ vorangegangen waren, hat STRUGGER die für das Gesamtgebiet der Vitalfärbung grundlegende Tatsache, daß Zellsaftfärbung mit basischen Farbstoffen erst oberhalb eines gewissen p_H -Wertes zustande kommt, zuerst für Neutralrot (1936), dann für Akridinorange (1940 a) unter Beweis gestellt, wobei gleichfalls u. a. die innenseitige Zwiebelepidermis als Objekt diente. DRAWERT (1940) hat analoge Schwellen in umfassenden Versuchen für zahlreiche andere basische Hellfeldfarbstoffe nachgewiesen. — Die Erklärung, die STRUGGER gibt, erscheint einfach und durchaus befriedigend; oberhalb der Schwelle kann der Farbstoff in den Zellsaft permeieren, weil er in Form undissoziierter, lipophiler (Salz- und Basen-) Moleküle vorhanden ist. Ist im Umschlagbereich auch nur ein Teil der Farbe undissoziiert, so fangen die lebenden Zellinhalte die eingedrungenen Moleküle ab, so daß weitere endosmieren, und rings um die Zelle treten Ionen, dem Massenwirkungsgesetz entsprechend, zu neuen Molekülen zusammen. Unterhalb des Schwellenbereiches ist der Farbstoff dagegen zur Gänze in Form dissoziierter Ionen vorhanden, die zur Permeation unfähig sind und infolgedessen nicht in den Zellsaft gelangen können. — Ist diese Vorstellung richtig, dann müßte der Schwellenwert, der beispielsweise für

¹⁾ Kritische Literaturübersicht bei BROOKS 1941, S. 234—249.

die ruhende Zwiebelinnenhaut und Akridinorange zwischen p_H 6,45 und 6,6 liegt, zugleich die untere Grenze in der p_H -Reihe erkennen lassen, bis zu welcher herab undissoziierte und lipoidlösliche Moleküle des Farbstoffs vorhanden sind.

Auch mit Neutralrot hatte STRUGGER (1936) analoge, im Hellfeld sichtbare Färbungen durchgeführt. Sie sind, wenn man winterlich ruhende Zwiebeln verwendet, so zuverlässig reproduzierbar, daß ich sie jährlich in meinem zellphysiologischen Praktikum mit Erfolg vorführen konnte. Oberhalb p_H 7 färben sich die Vakuolen rot, unterhalb p_H 6 nur die Zellwände. In Neutralrotlösungen, die mit destilliertem H_2O (p_H um 5) hergestellt sind, erhält man demgemäß nur die bei STRUGGER (1936, S. 57, 66) abgebildete alleinige Membranfärbung, in mit Wiener Leitungswasser (p_H 7,5—7,8) hergestellten Farblösungen hingegen Vakuolenfärbung. — Trotzdem war ich, was die Deutung betrifft, seit langem bedenklich. Bei p_H 5 sollten nach dem Gesagten nur mehr Neutralrotationen und keine permeierfähigen Moleküle mehr vorhanden sein. Es gibt aber, wie jeder Vitalfärber weiß, viele Zellsorten, die auch schon mit Neutralrot in destilliertem Wasser und in gepufferten Farblösungen bei p_H 4—5 eine kräftige vitale Färbung der Vakuolen annehmen. Warum dringen die bei saurer Reaktion ionisierten Lösungen bei der einen Zellsorte nicht mehr durchs Plasma, bei der anderen aber wohl? Wenn STRUGGER (1936, S. 64) sagt, „daß für die Lage des Umschlagspunktes“ von der Membran- zur Vakuolenfärbung bei seinem Objekt „nicht etwa eine physikalische Konstante des Farbstoffs, sondern daß bestimmte Eigenschaften der Zellen verantwortlich sind“ und wenn er findet, daß die Umschlagspunkte für die Wurzelspitzen junger Weizenpflanzen je nach dem Alter bei p_H 3,4—7,62 und für die Innenepidermen angetriebener und ruhender Zwiebeln bei p_H 3,2—7,1 liegen, so hat er damit einschlägige Phänomene zwar beschrieben, aber nicht erklärt (vgl. zumal auch DRAWERT und STRUGGER 1938 und DRAWERT 1940, S. 191).

Es war vom Standpunkt der vergleichenden Zellphysiologie eine der wichtigsten Aufgaben, die verschiedene Reaktionsweise und verschiedene Lage der Schwellen der Zellsaftfärbung einer Erklärung zuzuführen.

Erst vergleichende Untersuchungen mit Fluoreszenzfarbstoffen vom Sommer 1945 haben mir die Klärung gebracht. Besonders günstige Objekte fand ich in den Epidermen der Blattunterseite verschiedener heimischer Orchideen. Die Beobachtung erfolgte an Flächenschnitten, die meine Mitarbeiterin Fr. E. PECKSIEDER eine lebende Zellschicht dick herstellte. Ich will die Versuche, deren ausführliche Mitteilung in buchmäßiger Darstellung geplant ist, schon hier kurz heranziehen. — Bei *Orchis maculata* färben sich die Zellsäfte der Epidermis über p_H 6,45 zu graugrünroter (olivgrauer) und schon bei etwas höherem p_H (6,6) und bis p_H 10,5 zu stumpf kupferroter Fluoreszenz; unter p_H 6,2 bleiben sie leer, indes die Zellmembranen bei p_H 6,2 bis 3,0 eine strahlend rote Fluoreszenzfärbung annehmen; also gleiches Verhalten wie bei der Innenepidermis der Zwiebeln. Ganz anders verhielt sich z. B. die Blattepidermis von *Platanthera*

bifolia. Behandelt man Schnitte dieser Orchidee, die eine Zellschicht unverletzt enthalten, mit p_H -gestuften Akridinorange-Lösungen, so färben sich die Vakuolen bei p_H 6,5—10 intensiv grün oder gelbgrün.

Diese Fluorochromfärbung tritt auch bei p_H 5 und p_H 4 auf und reicht in der p_H -Reihe bis weit ins saure Gebiet, bis p_H 3 und darunter; bei p_H 2,5 bis 2,1 fehlt sie. Daß die grüne Zellsaftfluoreszenz in so viel weiteren Grenzen von der Wasserstoffionenkonzentration unabhängig ist, ist eine überraschende Neubeobachtung. Wir können nicht umhin zu schließen, daß der Farbstoff auch aus saurem Farbbade permeieren kann. Es kann also die Erklärung, wonach Akridinorange die Vakuolen unter p_H 6,4 deshalb nicht anfärbt, weil der Farbstoff in ionisiertem Zustand vorliegt und nicht durch das Plasma permeieren kann, nicht allgemein zutreffen.

Man könnte ja zunächst an grundsätzliche Permeabilitätsunterschiede der Protoplasmen von Orchis und Platanthera denken; man müßte, um auf dem Boden der STRUGGERschen Deutung zu bleiben, annehmen, daß das Zytoplasma von Platanthera auch für die Farbionen permeabel sei. Eine solche Interpretation wäre aber nach allem, was wir aus der vergleichenden Permeabilitätsforschung über die Durchlässigkeitseigenschaften des lebenden Plasmas wissen, sehr unwahrscheinlich. Übrigens unterbleibt die Zellsaftfärbung auch in der Platanthera-Epidermis bei p_H 2,7—2,1.

Das gegensätzliche Verhalten der anatomisch homologen Zellen der beiden Orchideen nach Fluorochromfärbung und die aparte Beobachtungstatsache, daß das Akridinorange in den einen Zellsäften eine gelbgrüne, in den anderen aber eine kupferrote Fluoreszenz hervorruft, hat ganz andere Ursachen. Ich sehe die Erklärung nach eingehender Beschäftigung mit dem Fragenkomplex in folgendem. Im Falle der Rotfärbung werden bloß Farbstoffionen im Zellsaft angereichert, im Falle der gelbgrünen Fluoreszenzfärbung geht der Farbstoff im Zellsaft eine chemische Bindung mit Stoffen ein, die in der Vakuole vorhanden sind. Es handelt sich dabei um zwei völlig verschiedene Mechanismen vitaler Färbung.

Wie STRUGGER gezeigt hat, ist beim Akridinorange, das sich im ionisierten Zustand befindet, die Fluoreszenzfarbe abhängig von der Konzentration. Sie ist bei niederer graugrün, dann graurot, bei höherer stumpf kupferrot (Konzentrations-Metachromasie). Wahrscheinlich hat der Farbwechsel seinen Grund in einer (reversiblen) Ionenpolymerisation durch Nebenvalenzbindung, wie sie G. SCHEIBE (1938, 1939) beim Farbstoff Pseudoisocyanin exakt hat nachweisen können. Man kann also beim Akridinorange die Anwesenheit von Ionen im UV-Licht an der roten Farbe sicher erkennen.

Ich möchte den Mechanismus der Zellsaftspeicherung im Falle der Rotfärbung folgendermaßen verstehen: Die Moleküle des Akridinorange permeieren in undissoziiertem Zustand aus der neutralen oder alkalischen Außenlösung durch das Plasma in die Vakuole. Weil der Zellsaft aber sauer ist, dissoziieren sie hier und polymerisieren zu Kationenketten. Auf diese Weise bleibt dauernd ein Gefälle für die Moleküle erhalten. So wird auch die Speicherung verständlich. — Bewahrt man die akridinorangegefärbten Präparate

von Allium oder Orchis maculata in leicht alkalischen ungefärbten Phosphatpufferlösungen, so kann sich die Rotfärbung der Zellsäfte tagelang halten. Das beweist, daß die Ionen wirklich nicht durch das Plasma exosmieren können. Die — leicht sauren — Zellsäfte fungieren demnach als „Ionenfallene“. Damit sie als solche wirken, ist bloß nötig, daß sie durch lebendes Protoplasma, welches für Farbmoleküle durchlässig, für Farbiolen aber undurchlässig ist, von einem neutralen oder alkalischen Farbbad, das undissoziierte Moleküle von Akridinorange enthält, getrennt sind. — Bei Platanthera hingegen, wo die Zellsäfte bei der Behandlung mit dem gleichen Farbstoff eine grell gelbgrüne Fluoreszenz annehmen, wird der endosmierende basische Farbstoff an in der Vakuole vorhandene Stoffe chemisch gebunden.

Um diese These auf ihre Richtigkeit zu prüfen, habe ich mit Akridinorange gefärbte Schnitte — von Allium und von meinen Orchideen — mit verdünnten NH_3 -Lösungen ($n/200$ bis $n/500$) behandelt. Das NH_3 endosmiert, wie seit DE VRIES bekannt, leicht durch das lebende Plasma. Es macht die Zellsäfte alkalisch und verwandelt damit die rot leuchtenden Akridinorange-Ionen in permeierfähige Moleküle. Die letzteren exosmieren leicht. Sie werden außer in den Zellmembranen elektroadsorptiv mit leuchtend roter Farbe festgelegt. Die vorher roten Zellsäfte werden binnen 1—3 Minuten völlig entfärbt, wobei die Zellen am Leben bleiben. Im Gegensatz dazu werden die grün fluoreszierenden Zellsäfte von Platanthera, wenn man in gleicher Weise NH_3 einwirken läßt, nicht entfärbt: Der chemisch im Zellsaft gebundene Farbstoff wird durch den Eintritt alkalischer Reaktion nicht zu freien, permeierfähigen Molekülen rückverwandelt.

Auf Grund des vitalfärberischen Verhaltens lassen sich „volle“ und „leere“ Zellsäfte unterscheiden. In den „leeren“ erfolgt mit Akridinorange Ionenfärbung, in den „vollen“ geschieht die Färbung durch Löslichkeitsspeicherung unter gleichzeitiger Bindung des endosmierenden Farbstoffes an zelleigene Stoffe.

Die prinzipiell wichtige Beobachtungstatsache ist, daß die Ionenfärbung erst oberhalb einer scharf ausgeprägten pH -Schwelle (bei 6,2—6,5) erfolgt, während die Färbung durch chemische Bindung sich als viel mehr pH -unabhängig erweist, indem sie viel weiter in den sauren Bereich, nämlich bis pH 3 und darunter, reicht.

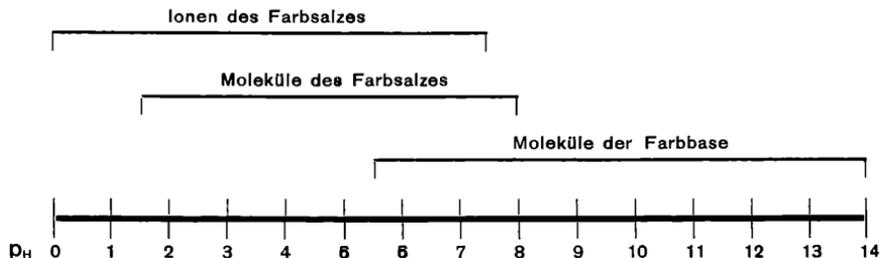
Man fragt sich, ob eine solche Vielheit der Speichermechanismen nicht auch bei anderen basischen Farbstoffen gegeben ist, z. B. beim Neutralrot. Hier kann die direkte Beobachtung nur schwer Auskunft geben. Behandelte ich aber lebendgefärbte Präparate mit verdünnten NH_3 -Lösungen, so ließen sich gleiche Unterschiede feststellen. Epidermisschnitte von Orchis maculata und Platanthera bifolia wurden 10 Minuten lang mit Neutralrot 1 10.000 von verschiedenem pH gefärbt und dann in den entsprechenden farblosen Phosphatpuffern im Tageslicht untersucht. Die Vakuolen von Platanthera färben sich überall, diejenigen von Orchis färben sich im alkalischen und neutralen Bereich, aber nicht bei pH 5—3. Die Speicherung von Neutralrot-Ionen im Zellsaft erfolgt also nicht aus saurer Lösung, wohl aber die chemi-

sche Bindung. — Verwendet man Schnitte beider Pflanzen, die bei pH 7—10 vorgefärbt worden sind, und läßt $n/200$ NH_3 einwirken, so werden die Epidermiszellen von Orchis binnen 1—3 Minuten entfärbt (weil die entstandenen Farbbasenmoleküle exosmieren); wogegen die Epidermiszellen von Platanthera nach gelb gebleicht aber nicht entfärbt werden (weil der chemisch gebundene Farbstoff nicht exosmiert). In Wasser oder Puffer zurückgebracht, zeigt Platanthera bald wieder die ursprüngliche lilarote Farbe, während Orchis maculata, da der Farbstoff wegdiffundiert ist, ungefärbt bleibt. Neutralrot und Akridinorange verhalten sich also in ihrer Wirkung auf „volle“ und „leere“ Zellsäfte gleichartig, und auch nach Vitalfärbung mit Neutralrot können die zwei Typen der diffusen Zellsaftfärbung mittels der NH_3 -Reaktion unterschieden werden.

Aus diesen Beobachtungen folgt nun sicher, daß die verwendeten basischen Farbstoffe auch aus sauren Lösungen von pH 6 bis pH 3 zu vitaler Permeation fähig sind. Der Färberefolg wird in diesem Bereich aber nur in den „vollen“ Zellsäften sichtbar, wo die Speicherung durch chemische Bindung an zell-eigene Stoffe geschieht. In „leeren“ Zellsäften kommt eine Speicherung des Farbstoffes nicht zustande, so daß, ganz im Sinne DRAWERTs (1940), bei schwach saurer Reaktion nicht der Permeationswiderstand des Plasmas, sondern das Speichervermögen der Zellsäfte über Färbung oder Nichtfärbung entscheidet.

Es erscheint als einer der schönsten Erfolge der Fluorochromtechnik, daß rote Ionenfärbung und gelbgrüne Färbung durch chemische Bindung nach Akridinorange-Behandlung im UV-Licht direkt unterscheidbar werden. —

Die Frage drängt sich auf, wie nun die scharfen, von STRUGGER gefundenen, von mir bestätigten Schwellen der roten Zellsaft-Ionenfärbung bei „leeren“ Zellsäften zu erklären sind. Prinzipielle Permeabilitätsunterschiede zwischen den Protoplasmen von Orchis und Platanthera als Ursache des differenten Verhaltens anzunehmen, ist, wie erwähnt, höchst unwahrschein-



*Die wahrscheinlichen Dissoziationsverhältnisse des Neutralrotes.
Nach SÖRENSEN aus DRAWERT (1940, S. 189).*

lich. Wenn aber der Farbstoff bei p_H 6—3, wie wir annehmen müssen, sowie bei Platanthera auch bei Allium und Orchis permeieren kann, so bleibt doch unklar, warum er in den „leeren“ Zellsäften dieser Objekte nicht auch zu Ionen zerfällt, die sich unter Polymerisation anreichern. — Ich kann vorläufig nur eine Arbeitshypothese aufstellen. Vielleicht kommt die Ionenfärbung und -speicherung nur dort zustande, wo außen im Farbbad hinreichende Mengen der Farbbas^e) vorhanden sind, während Farbsalze zwar permeieren können, doch eine Polymerisation frei werdender Kationen und die darauf beruhende Farbanreicherung im Zellsaft nicht erfolgen lassen. Für Neutralrot ist SÖRENSENs Schema der Dissoziationsverhältnisse allgemein bekannt. Die skizzierte These setzt voraus, daß auch für Akridinorange ähnliche Verhältnisse für den jeweiligen Anteil von Farbbase, Farbsalz und Farbionen in der absteigenden p_H -Reihe gelten; freilich liegen für diesen Farbstoff die nötigen quantitativen Daten von physikochemischer Seite noch nicht vor. Möglicherweise spielt außerdem auch das cH -Gefälle vom Zellsaft zur äußeren Farblösung für den Vorgang der Farbionenspeicherung eine Rolle.

Man darf aber sicherlich annehmen, daß auch beim Akridinorange wie bei anderen basischen Farben die Farbsalzmoleküle weiter in den sauren Bereich hinein existieren als die der Farbbase. Wahrscheinlich sind also bei p_H 6 bis 3 noch gewisse Partialkonzentrationen des permeierfähigen Salzes vorhanden. Diese Salzmoleküle können in die Vakuolen dringen und in „vollen“ Zellsäften mit Vakuolenstoffen in chemische Reaktion treten, wodurch die Speicherung erklärt wird. In den „leeren“ Zellsäften werden die Salzmoleküle nicht gespeichert, reichern sich daher nicht über die Außenkonzentration hinaus an und bleiben unsichtbar. —

Daß die grüne, in weiten Grenzen vom cH unabhängige Fluoreszenzfärbung des Vakuums mit Akridinorange STRUGGER noch entgangen ist, beruht wohl darauf, daß er bei seinen Fluorochromierungsstudien nur mit einer Sorte von Gewebszellen höherer Pflanzen, mit den Innenhautzellen der Zwiebelschuppen, gearbeitet, im weiteren aber mit Akridinorange, unter anderer Fragestellung, vorwiegend Mikroorganismen, Hefe, Myxamöben, Bakterien untersucht hat. Schon die Epidermiszellen der Außenseite der Zwiebelschuppen gehören aber dem Typus der „vollen“ Zellsäfte an. Der größere Lipoidreichtum ihrer Vakuolen ist längst bekannt. Ich habe dieses durch KÜSTER klassisch gewordene Zellobjekt im Jahre 1944 eingehend im UV-Licht studiert (HÖFLER 1944/48). Die volle Klärung der Akridin-

¹) DRAWERT hat auf Grund seiner umfassenden Erfahrungen mit Hellfeldfarbstoffen auf die Bedeutung von Farbsalz oder Farbbase für die Aufnahme hingewiesen. Er sagt (1940, S. 189): „Die an freien Fettsäuren bzw. an Gerbstoffen arme Zelle kann in erster Linie nur die Moleküle der Farbbase aufnehmen, die freie Fettsäuren oder Gerbstoffe enthaltende Zelle speichert dagegen auch die Moleküle des Farbsalzes sehr stark. Die Ionen des Farbsalzes werden entsprechend ihrer Unlöslichkeit in hydrophoben organischen Flüssigkeiten von der lebenden Zelle nicht aufgenommen . . .“

orange-Metachromasie ist mir dort aber noch nicht gelungen; die Erklärung wurde erst 1945 an den Orchideenzellen angebahnt und nachher bei anderen Objekten bestätigt. —

Was die neuen Termini der „vollen“ und „leeren“ Zellsäfte betrifft, so sei endlich, um Mißverständnisse zu vermeiden, an folgendes erinnert (vgl. zumal PFEFFER 1886, GICKLHORN 1929, BROOKS 1941).

Wenn lipoidlösliche Moleküle eines basischen Farbstoffs durch das Plasma in die Vakuole dringen, so kann hier die chemische Bindung und Speicherung auf verschiedene Art erfolgen:

1. Durch Bildung unlöslicher fester Niederschläge (Farblackbildung, z. B. Krümelbildung in gerbstoffhaltigen Zellen);
2. unter Bildung gefärbter Tröpfchen; sie zeigen BMB (BROWNSche Molekularbewegung) und fließen oft bei Berührung zu größeren Kugeln zusammen. Vgl. zumal GICKLHORN (1929 a), DRAWERT (1939) und KÜSTER (1935, S. 360);
3. unter Bildung kristallinischer Ausfällungen (GICKLHORN 1929 b);
4. unter Löslichkeitsspeicherung, wobei die Reaktionsprodukte gelöst und diffus im Vakuum verteilt bleiben.

Von diesem letzten Typ ist der neu aufgestellte Typ der — gleichfalls diffusen — Ionenspeicherung in „leeren“ Zellsäften dadurch verschieden, daß die Ionenspeicherung zustande kommt, ohne daß der Farbstoff mit Zellsaftstoffen in chemische Reaktion zu treten braucht.

Plasma- und Kernfärbung

Wir wenden uns schließlich den Fragen um die Fluorochromfärbung des Zytoplasmas und der Zellkerne zu.

Die Aufgabe der anatomischen Darstellung von Kern und Plasma im Fluoreszenzlicht, d. h. der Färbung der fixierten Zellstrukturen, ist schon von BUKATSCH und HAITINGER (1940; S. 516, vgl. HAITINGER 1938, S. 62) gelöst worden. Sie erzielten eine kontrastreiche Kern-Plasma-Färbung mit Coriphosphin O, welches die Kerne grünlichgelb, das Plasma orange fluorochromiert. Eine kurze zusätzliche Behandlung mit Fuchsin verstärkt die Kontraste, „der Kern hebt sich leuchtend gelbgrün bis gelb vom tiefrot erscheinenden Protoplasma ab“. Die genannten Autoren haben auch schon das Akridinorange NO als vorzügliches Mittel der Kerndarstellung empfohlen. Beide Akridinfarbstoffe werden im Chromatin gespeichert, die Nukleolen werden im UV-Licht orange bzw. rot differenziert. Vgl. REICHERT (1944, S. 16).

Beim Studium der Lebendfärbung mit pH -gestuften Akridinorangelösungen hat STRUGGER (vgl. die Tabelle S. 15) von pH 4,76 aufwärts eine grüne vitale Fluoreszenzfärbung der Kerne, von pH 5,98 an auch ein schwach grünes Leuchten des Zytoplasmas beobachtet. Die rote Ionenfärbung der Zellsäfte ist in der Innenepidermis der Zwiebelschuppe stets von einer Vakuolen-

kontraktion (KÜSTER 1926 a, WEBER 1930, STRUGGER 1936, 1940 a, 1941 a) leichten Grades begleitet, die mit einer Aufquellung des Zytoplasmas Hand in Hand geht. Beide Erscheinungen setzen in der p_H -Reihe mit der Zellsaftfärbung oder nach meiner Beobachtung (Tabelle S. 17) schon eine Feinstufe darunter ein. — Das Plasma in den freigelegten Zellecken wird dann deutlich sichtbar. Es kann strömen oder ruhen. Die eingebetteten Mikrosomen zeigen, solange das Plasma lebt, BMB (BROWNSche Mol.-Bew.). Diese hört im nekrotischen Stadium, bei beginnender Gelatinierung des Plasmas, naturgemäß auf. Oft zeigt nun schon das zweifellos lebende Plasma von Allium nach Akridinorange färbung im UV-Licht eine zartgrüne Fluoreszenz, in anderen Fällen bleibt es leer. Mit zunehmendem Grad der Vakuolenkontraktion im stärker alkalischen Farbbad verstärkt sich vielfach die Fluoreszenz. Noch wesentlich lebhafter wird sie, bei gleichbleibendem blaugrünem Farbton, im getrübbten Plasma in solchen irreversibel veränderten Nekroestadien, wo keine BMB mehr zu sehen ist. Das abgetötete Plasma in Schnitttrandzellen ist oft koaguliert, und es ist dann im UV-Licht ziegelrot gefärbt, wo die Tötung plötzlich erfolgte, dagegen grün, wo der Tod in den vom Schnitttrand abgewandten Polen langgestreckter Zellen langsamer eintrat.

Das Akridinorange wird nach STRUGGER am Eiweißgerüst des Zytoplasmas festgelegt. Bei manchen anderen vitalen Plasmafärbungen wird hingegen der Farbstoff nachweislich in den lipoiden Phasen der lebenden Substanz gespeichert. STRUGGER hat im Zuge seiner Fluorochromierungsstudien dem Neutralrot, diesem seit Jahrzehnten meist verwendeten Vitalfarbstoff, eine wesentlich neue Seite abgewinnen können. Betrachtet man neutralrotgefärbte Zwiebelinnenepidermen im Hellfeldmikroskop, so sind bekanntlich die Zellsäfte tiefrot gefärbt, während im Plasma keine Färbung sichtbar ist. Betrachtet man dieselben Zellen im UV-Licht, so sind die Zellsäfte fast leer, indes das Zytoplasma stark gelbgrün fluoresziert. — Die ionisierte, im Tageslicht gefärbte Neutralrotlösung fluoresziert im UV-Licht nicht. Dagegen gibt die Farbbase in lipoider Lösung eine ausgesprochen grügelbe und in wässriger Lösung eine goldorange gelbe Fluoreszenz (Lösungs-Metachromasie). STRUGGER schließt daraus, daß das Neutralrot als Base in den Lipoiden des Zytoplasmas gespeichert wird, und er weist darauf hin, daß es verfehlt wäre, aus dem Farbton etwa auf eine stark alkalische Reaktion der wässrigen Phase des Plasmas zu schließen.

In ähnlicher Weise werden durch Rhodamin B die Lipide des Plasmas der inneren Zwiebelepidermis vital und reversibel angefärbt. Selektiv stärker speichern diesen durch Unschädlichkeit ausgezeichneten Farbstoff die Chondriosomen, die von GUILLIERMOND (1923) durch Hellfeldfärbung mit Janusgrün, das aber rasch giftig wirkt, sichtbar gemacht worden sind. Die Färbung mit Rhodamin B ist auch im Hellfeld sichtbar, doch ist die goldgelbe Fluoreszenz im UV-Licht ungleich effektvoller. Am Zellkern färbt sich, wie beim Neutralrot, nach STRUGGER bloß die (lipoidreiche) Kernplasmagrenzschicht, die zweifellos mit der Kernmembran identisch ist. Das Innere des Kernes bleibt leer.

Nach Akridinorangebehandlung erstrahlen die Zellkerne der lebenden Zwiebelzellen im alkalischen Bereich in vollem grünen Fluoreszenzlicht, und hier ist es das Karyotin, d. h. die Substanz der Chromonemata bzw. der Chromosomen, welches den Farbstoff speichert. Im stärker sauren Farbbad bleiben die lebenden Kerne ungefärbt, während man in den meisten toten Zellen auch hier eine intensive Grünfärbung der Kerne gewahrt. Ich will die Frage offen lassen, ob der Farbstoff am Karyotin toter Zellkerne in diesem Falle durch Elektroadsorption oder ob er nicht vielmehr durch chemische Bindung etwa an Nucleinsäure festgelegt wird. Im schwach sauren Bereich zeigen die Kerne lebender Zellen, wie bereits STRUGGER feststellt, eine schwache Grünfärbung, und zwar auch schon bei p_H -Werten, wo das Plasma noch ungefärbt bleibt. STRUGGER glaubt, in allen Fällen solcher Vitalfluoreszenzfärbung eine elektroadsorptive Bindung des Farbstoffs am Eiweißgerüst der lebenden Substanz annehmen zu dürfen.

Seit längerer Zeit ist bekannt, daß basische Farbstoffe vom Kerngerüst (dem Karyotin), saure Farbstoffe dagegen vom Kernsaft (der Karyolymphe) gespeichert werden (vgl. STRUGGER 1932, 1938 a, 1939).

Tote, koagulierte Zellkerne, die bei Tinktion mit Akridinorange die Farbe gierig speichern und dann schon im Hellfeld lebhaft dottergelb gefärbt sind, erstrahlen im UV-Licht in kupferroter Fluoreszenzfarbe. STRUGGER (1940 a, 1941 b, 1942, STRUGGER u. HILBRICH 1942) hat auf diesen Farbdimorphismus von Kern und Plasma — grün oder rot — besonderen Wert gelegt und hat auf ihn eine Lebensreaktion zu gründen versucht. Er sagt (1943, S. 74), „färbt man tote Pflanzenzellen mit Akridinorange, so wird der gesamte Protoplast in kupferroter Fluoreszenzfarbe fluorochromiert. Diese Erscheinung ist nach jeder Tötungsart zu beobachten und wurde auf experimentellem Wege folgendermaßen geklärt: Das Akridinorange zeigt in vitro eine konzentrationsabhängige Verschiebung des Schwerpunktes seines Fluoreszenzspektrums. Verdünnte Lösungen (1 10.000) fluoreszieren grün, während konzentrierte Lösungen (1 100) kupferrot leuchten. Diese Konzentrationsmetachromasie kommt lediglich den Farbkationen zu. Das lebende Protoplasmaeiweiß vermag infolge seiner hochgeordneten Molekularstruktur nur wenig Farbkationen elektrostatisch zu binden. Das tote Protoplasmaeiweiß hingegen ist beim Absterben stark verändert worden. Viele saure Endgruppen sind in Freiheit gesetzt, so daß es eine große Quantität von Farbkationen elektrostatisch zu binden vermag. Deshalb muß das tote Protoplasma nach genügender Farbstoffzufuhr kupferrot fluoreszieren. Durch diese Untersuchungen ist der Biologie eine brauchbare Methodik gegeben worden, um lebendes von totem Protoplasma fluoreszenzmikroskopisch zu unterscheiden.“

An der Allgemeingültigkeit dieser Lebens- bzw. Todesreaktion sind schon von bakteriologischer Seite (GÄRTNER 1943, BUCHERER 1943) Zweifel erhoben worden.

In einer umfangreicheren Studie „Einige Nekrosen bei Färbung mit Akri-

dinorange⁴⁾) habe ich der Frage mein Augenmerk zugewandt. Ich kam zum Ergebnis, daß sich das Akridinorange vorzüglich eignet zur differenzierenden Färbung verschiedenartiger Nekrosen. Bestätigt wurde, daß Kern und Plasma im Leben, wenn überhaupt, so stets grün fluoreszieren, während bei Rotfluoreszenz beide stets tot sind. Ich lernte aber schon an den Alliumzellen Nekrosen kennen, bei welchen Kern oder Plasma im UV-Licht nach Akridinorangegefärbung grün leuchten, ja oft lebhaft verstärkte Grünfärbung zeigen. Es können demnach getötete Plasmen und Zellkerne rot oder grün fluoreszieren: Koagulationsnekrosen zeigen rote Fluoreszenz, wogegen Quellungsnekrosen, auch wenn das Akridinorange im Farbbad im Überschuß geboten wird, nur grüne Fluoreszenzfärbung annehmen. An toten Zellkernen verschiedener Orchideen wird nach jüngeren Erfahrungen bei gleicher Vorbehandlung überhaupt nur eine grüne Fluoreszenz erzielt.

Stellt demnach die rote Fluoreszenzfärbung in Übereinstimmung mit STRUGGER, soweit die bisherige Erfahrung reicht, in der Tat eine Todesreaktion dar, so darf dagegen die Grünfärbung mit Akridinorange nicht als Lebensreaktion der tingierten Zellelemente gewertet werden.

Erwähnt seien in diesem Zusammenhang meine Beobachtungen an Blattepidermiszellen von *Orchis latifolia*, die bei der Herstellung der Schnitte verletzt oder sonstwie getötet worden sind: Die toten Zellkerne leuchten nach der Fluorochromierung im UV-Licht grellgrün, das tote Zytoplasma aber matt kupferrot.

Mit solcher Kritik soll nicht behauptet werden, daß sich nicht in gewissen Fällen doch die Rot- oder Grünfluoreszenz zur Unterscheidung toter und lebender Zellen gut eignet. Daß dies zutrifft, hat STRUGGER durch eingehende Versuche mit Hefezellen und mit einigen Bakterien dargetan. Nur seine Verallgemeinerung ist unerlaubt. — Mit akridinorangegefärbten Hefen hat STRUGGER (1943 a) Mikrokulturversuche angestellt. Die grün oder rot fluoreszierenden Zellen wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators isoliert. So ließ sich exakt beweisen, daß die Individuen mit grünen Protoplasten noch voll entwicklungsfähig waren, während die kupferrot fluoreszierenden Zellen ihre Entwicklungsfähigkeit eingebüßt hatten. Auf solcher Grundlage ließ sich u. a. die Austrocknungsfähigkeit der Bäckerhefe studieren (l. c., S. 82). — Als Lichtquelle hat bei diesen Versuchen die REICHERT-sche Niedervoltlampe LUX FNI mit 2 Blaufiltern, welche monochromatisches Blaulicht liefern, gedient. Es ist in methodischer Hinsicht bemerkenswert, daß der Nachweis der Grün- oder Rotfluoreszenz nicht an die Verwendung von ultraviolettem Erregerlicht gebunden ist. Das bedeutet bei der Lebenduntersuchung einen großen Vorteil, weil das Blaulicht ja zweifellos unschädlicher ist. —

Nachdem vitale Kernfärbungen seit KÜSTER (1926 b), GICKL-HORN (1927), PALTAUF (1928), BECKER (1934) u. a. mehrfach gelungen waren, hat STRUGGER (1938 a, b, 1940 b) die Forderung aufgestellt,

⁴⁾ Die im Sommer 1944 abgeschlossene Arbeit steht in der Zeitschrift „Protoplasma“ in Druck und liegt in Fahnenkorrektur vor.

daß eine Vitalfärbung nur dann als völlig unschädlich, als „inturbant“ gelten kann, wenn der Beweis erbracht wird, daß die gefärbten Zellen ihre normalen Lebensfunktionen weiter erfüllen. Dieser Nachweis läßt sich an Zellen höherer Pflanzen nur in einzelnen Fällen erbringen. So zeigten teilungsbereite Zellkerne von *Tradescantia*-Staubfadenhaaren, die mit Akridinorange vital gefärbt wurden, nachher einen normalen Ablauf der Mitose, und angefärbte Chromosomen konnten sämtliche Mitosestadien durchlaufen, worauf die entstehenden Tochterkerne noch eine deutliche Färbung erkennen ließen (STRUGGER 1940 b). Am besten gelingt aber jener Beweis an geeigneten Protophytenzellen, die man in vitalgefärbtem Zustand weiterkultiviert. STRUGGER (1940 c) arbeitete mit Plasmodien von *Didymium nigripes*. Die Myxamöben dieses Schleimpilzes besitzen gut sichtbare Kerne. Sie wurden 2—6 Minuten lang mit klarer Basenlösung von Akridinorange überschichtet und nach sorgfältigem Abgießen der Farblösung auf Heudekoktagar im Dunklen weitergezüchtet. Ihr Zytoplasma fluoresziert nach dem Bade homogen grün, die Zellkerne noch stärker gelbgrün. Nach 8 Tagen hatten sie sich in der Regel zu schönen Plasmodien ausgebildet, die den Farbstoff in ihrem Inneren noch erkennen ließen, und nach weiteren 8 Tagen entwickelten sie Fruchtkörper, deren Sporen normal keim- und kulturfähig waren.

Durch solche Versuche erscheint eine alte Frage der Vitalfärbungsphysiologie dahin entschieden, daß in der Tat ein Protoplast, dessen strukturbildende Eiweißkörper mit einem Farbstoff beladen sind, noch lebend und entwicklungsfähig sein kann. Da die grüne Plasma- und Kernfärbung nur im UV-Licht sichtbar ist, hat die Fluoreszenzmikroskopie bei der Entscheidung der Frage das letzte Wort gesprochen.

Literatur

- Becker W. A.*, Acta Soc. Bot. Pol. **11** (1934): 139.
 — *Cytologia* **6** (1935): 337.
Bethe A., Biochem. Z. **127** (1922): 18.
Bräutigam F., Mikroskopie **2** (1947), 3/4.
Brooks S. C. u. Moldenhauer-Brooks M., The Permeability of living cells. Protoplasma-Monographien, Bd. 19. Borntraeger, Berlin 1941.
Bucherer H., Zbl. f. Bakt. usw., II. Abt. **106** (1943): 81.
Bukatsch F. und Haitinger M., Protoplasma **34** (1940): 515.
Collander R., Loenegren H. und Arhimo E., Protoplasma **37** (1943): 527.
Czaja A. Th., Planta **21** (1934): 531.
 — *Planta* **26** (1936): 90.
Döring H., Ber. dtsh. bot. Ges. **53** (1935): 415.
Drawert H., Flora **32** (1937): 91.
 — *Planta* **29** (1939): 376.
 — *Flora* **34** (1940): 159.
 — und *Strugger S.*, Ber. dtsh. bot. Ges. **56** (1938): 43.
Frey-Wyssling A., Protoplasma **27** (1937): 372.
Gärtner K., Z. Hyg. u. Infektionskrankh. **125** (1943): 86.
Gicklhorn J., Protoplasma **2** (1927): 1.
 — *Kolloidchem. Beih.* **28** (1929 a): 367.
 — *Protoplasma* **7** (1929 b): 341.
Guilliermond A., C. R. Soc. Biol. **84** (1923): 527.

- Guilliermond A. et Goutheret R., C. R. Ac. Paris **196** (1933): 367.
- — C. R. Soc. Biol. **112** (1933b): 537.
- et Obaton F., C. R. Soc. Biol. **116** (1934): 934.
- Haitinger M., Beih. Bot. Zbl. A **53** (1935): 378.
- Fluoreszenzmikroskopie. Ihre Anwendung in der Histologie und Chemie. Akad. Verlagsges. Leipzig 1938.
- Höfler K., Sitzungsanz. Akad. Wiss. Wien, Jahrgang 1946, Nr. 7 vom 6. April.
- Protoplasma **38/39** (1944/1948), in Druck.
- und Pecksieder E., Österr. Bot. Z. **94** (1947): 99.
- Irwin M., Journ. gen. phys. **5** (1922): 223 und 727.
- ebd. **10** (1926): 75.
- ebd. **11** (1927): 111.
- Küster E., Protoplasma **1** (1926a): 73.
- Z. wiss. Mikr. **43** (1926b): 378.
- Die Pflanzenzelle. G. Fischer, Jena 1935.
- Michaelis L., Die Wasserstoffionen-konzentration. 2. Aufl. Springer, Berlin 1922.
- Paltauf A., Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., Abt. I, **137** (1928): 691.
- Pfeffer W., Unters. bot. Inst. Tübingen **2** (1886): 179.
- Reichert, Fluoreszenzmikroskopie mit Fluorochromen. Rezepte und Tabellen. Reichert, Wien 1944.
- Ruhland W., Jahrb. wiss. Bot. **46** (1908): 1.
- Ruhland W. Z. Bot. **1** (1909): 747.
- Schaede R., Jahrb. wiss. Bot. **62** (1923): 65.
- Scheibe G., Kolloid-Z. **82** (1938):
- Ber. physik.-med. Ges. Würzburg, N. F. **63** (1939): 15.
- Sörensen, Ergebn. d. Physiologie **12** (1912) 393.
- Strugger S., Planta **18** (1932): 561.
- Protoplasma **26** (1936): 56.
- Flora **132** (1938a): 253.
- Protoplasma **30** (1938b): 85.
- Biol. Zbl. **59** (1939): 274.
- Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Aufnahme und Speicherung des Akridinorange durch lebende und tote Pflanzenzellen. Jenaische Z. f. Naturw. **73** (1940a): 97.
- Dtsch. tierärztl. Wschr. **48** (1940b): 645.
- Z. wiss. Mikr. **57** (1940c): 415.
- Protoplasma **44** (1940d): 601.
- Flora **135** (1941a): 101.
- Dtsch. tierärztl. Wschr. **49** (1941b): 525.
- ebd. **50** (1942): 51.
- Untersuchungen über die vitale Fluorochromierung der Hefezellen. Flora **137** (1943a): 73.
- Protoplasma **37** (1943b): 429.
- und Hilbrich P., Dtsch. tierärztl. Wschr. **50** (1942): 1.
- de Vries H., Arch. Neerl. **6** (1871): 117 (Opera e per. collata **1**, 86).
- Weber F., Protoplasma **9** (1930): 106.
- van Wisselingh C., Die Zellmembran. Linsbauers Handbuch der Pflanzen-anatomie, Abt. I, 1. Teil, Bd. III/2.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mikroskopie - Zentralblatt für Mikroskopische Forschung und Methodik](#)

Jahr/Year: 1947

Band/Volume: [2](#)

Autor(en)/Author(s): Höfler Karl

Artikel/Article: [Was lehrt die Fluoreszenzmikroskopie von der Plasmapermeabilität und Stoffspeicherung? 13-29](#)