Der Nukleolus von Spirogyra und die Chromosomen höherer Pflanzen.

Von

Arthur Tröndle.

Mit Tafel 9.

Einleitung.

Über den Nukleolus von Spirogyra ist schon viel geschrieben worden, ohne daß die verschiedenen Ansichten sich bis jetzt zu einer einheitlichen Auffassung verdichtet hätten. Allerdings läßt sich aus den neueren Arbeiten der Kernmorphologen als gemeinsamer Punkt herausschälen, daß der Spirogyrennukleolus an der Bildung der Chromosomen anteil nimmt. Die Arbeiten von Mitzkewitsch (1898) und Berghs (1906) kommen direkt zu dem Resultat, daß die Chromosomen direkt aus dem Nukleolus entstehen, was auch schon von früheren Autoren behauptet worden ist. Auf Grund der morphologischen Arbeiten darf man nun wohl als sicher annehmen, daß der Nukleolus von Spirogyra sich in morphologischer Hinsicht ganz anders verhält als die Nukleolen höherer Pflanzen: Dieser Gegensatz müßte noch verstärkt und vertieft werden, wenn auch in chemischer Hinsicht eine entsprechende Verschiedenheit vorhanden wäre. Die vorhandenen Arbeiten sind aber in dieser Frage noch zu keiner Übereinstimmung gekommen. Auf der einen Seite behauptet Zacharias (1885, 1888, 1910), daß die Nukleolen von Spirogyra chemisch sich genau so verhalten, wie die Nukleolen höherer Pflanzen. Dem ist gerade entgegengesetzt die Ansicht von Carnoy und Meunier (1884, 1887 (?)), die den Nukleolus von Spirogyra als den Sitz des Chromatins betrachten, ihn gewissermaßen als Kern im Kern ansehen. (Von Carnoy

als nucléole-noyau bezeichnet.) Es dürfte kaum möglich sein, diese beiden Ansichten zu vereinigen und wir wollen deshalb die Gründe, die dafür angeführt werden, etwas näher ansehen.

Erst wollen wir Zacharias hören. Er gibt an (1885, S. 273 und 1910, S. 217 und 240), daß der Nukleolus von Spirogyra in Salzsäure von 0,2% zu einem äußerst blassen Körper aufquillt, während nach seinen sonstigen Untersuchungen in den Kernen höherer Pflanzen bei gleicher Behandlung das Chromatin nicht quillt, sondern scharf begrenzt und eigentümlich glänzend erscheint. Hingegen soll außerhalb des Nukleolus im Spirogyrakern ein feines glänzendes Gerüst sichtbar sein. Nach Behandlung mit Magensaft war in den Nukleolen »keine Spur von Chromatinkörpern zu erkennen« (1888 und 1910). Wie die Prüfung auf Chromatin in diesem Fall ausgeführt wurde, wird nicht angegeben. Auf Zusatz einer Lösung von Glaubersalz — Essigsäure — Fuchsin S färbte sich der Nukleolus intensiv ohne zu quellen, während das Chromatin höherer Pflanzen nach Zacharias in Glaubersalz quillt, der Nukleolus hingegen nicht (1910). Carmin in Essigsäure färbte den Nukleolus von Spirogyra intensiv, den von Galanthus zuerst nicht, später aber doch, wenn auch schwächer (1885, 1910). In einer Mischung von Jodgrün — Diamantfuchsin wurde bei Galanthus der Nukleolus intensiv rot, das Kerngerüst rein grün. Bei Spirogyra färbte sich der Nukleolus ebenfalls rot und im übrigen Kern war ein blaues bis blaugrünes Netzwerk zu sehen. Das sind die Gründe, die Zacharias zur Stütze seiner Ansicht anführt, die er auch noch in seiner letzten Publikation beibehielt. Er schreibt da (1910, S. 216): »Auch die Nukleolen von Spirogyra unterscheiden sich in ihrem Verhalten gegen Reagentien, insoweit als bisher untersucht worden ist, nicht irgendwie wesentlich von den Galanthus-Nukleolen«.

Nun wollen wir sehen, auf was für Reaktionen Meunier (1887 (?)) sich stützt. Er findet Färbung des Nukleolus durch Methylgrün, neutrale, saure und alkalische Carminlösungen. Durch Behandlung mit starker Salpeter- und Salzsäure wurde der Nukleolus schnell fast völlig gelöst, wobei ein Rest, ein anscheinend netzförmiges Stroma zurück blieb. Alkoholmaterial bot dieser Behandlung größeren Widerstand als frisches. Ver-

dünnte Salpeter- und Salzsäure, 2—4%, wirkte auf frisches Material nicht wesentlich, auf solches, das mit Alkohol fixiert war, gar nicht. Mit Ammoniak konnte ein Teil des Nukleolus herausgelöst werden, ebenso mit Kalilauge, wenn ihre Konzentration nicht zu stark genommen wurde und die Objekte längere Zeit darin blieben. In Pepsinsalzsäure wurde der Nukleolus kaum angegriffen.

Wir wollen uns nun fragen, inwieweit die Reaktionen, die von den beiden Autoren angeführt werden, für den Nachweis des Nukleins (= Chromatin) brauchbar sind. Daß die Färbung mit Jodgrün — Diamantfuchsin nicht zum Nachweis des Nukleins dienen kann, hat schon Zimmermann betont (1896, S. 31) und nachdem Alfred Fischer (1899) eingehend die Wertlosigkeit der Färbung mit Farbgemischen für mikrochemische Zwecke dargelegt hat, erübrigt es sich, hier weiter darauf einzugehen. Das Gleiche gilt für die Färbungen mit Carminen (Meunier, S. 398, Zimmermann, 1896, S. 27). Da die Nukleolen höherer Pflanzen nach Zacharias durch Magensaft größtenteils gelöst werden, so würde das Verhalten der Spirogyranukleolen, die nicht wesentlich angegriffen werden, eher auf das Vorhandensein von Nuklein hinweisen. Als Stützen der Anschauung von Zacharias bleiben also bloß übrig das Fehlen des Glanzes in stark verdünnter Salzsäure und das Fehlen der Quellung in Glaubersalz. Man wird zugeben, daß das zwei sehr schwache Stützen sind.

Weit besser steht es mit den Gründen Meuniers. Von den Färbungen sehen wir natürlich ab. Die Löslichkeit in starken Säuren und in schwachen Alkalien sind Eigenschaften, die den Nukleinen zukommen, ebenso das Nichtwirken von Pepsin-Salzsäure. Wenn deshalb die Angaben von Meunier richtig sind, so muß man unzweifelhaft den Nukleolus von Spirogyra als den Sitz des Chromatins betrachten. Es frägt sich, ob diese Angaben durch spätere Untersucher widerlegt worden sind. Zacharias hat sich nach dem Erscheinen der Arbeit von Meunier veranlaßt gesehen, sich aufs neue mit Spirogyra zu befassen (1888, S. 90, vergl. auch 1910, S. 216 und 239—240). In keiner seiner Veröffentlichungen aber findet sich eine Angabe darüber, daß er die Versuche mit Alkalien

und starken Säuren nachgeprüft hat. Er glaubt mit den oben angeführten Reaktionen Meunier widerlegt zu haben. Auch die Arbeit von van Wisselingh geht nicht auf die Meunierschen Reaktionen ein, auch darf man seinen Ergebnissen mit einer berechtigten Skepsis gegenüberstehen, da seine Untersuchungsmethode darin bestand, auf Spirogyren, die mit Flemmingscher Lösung fixiert waren, 50% Chromsäure wirken zu lassen, worin die einzelnen Bestandteile des Kerns sich nach und nach lösten.

Um unsere Frage zu einer definitiven Entscheidung zu bringen, habe ich den Nukleolus von Spirogyra einer neuen mikrochemischen Untersuchung unterworfen, wobei natürlich die Angaben Meuniers revidiert wurden. Die gleichen Reaktionen wie an Spirogyra habe ich auch an Chromosomen und an Nukleolen höherer Pflanzen als Vergleichsobjekt angestellt. Die literarischen Angaben über das mikrochemische Verhalten der Chromosomen und Nukleolen sollen erst bei den einzelnen Versuchen angeführt werden. Soviel weiß man ja heute sicher, daß die Chromosomen aus Nukleinen bestehen.

Eigene Untersuchungen.

1. Untersuchungsmaterial.

Es wurden verschiedene Arten von Spirogyra zur Untersuchung verwendet, die nicht näher bestimmt werden konnten, da sie nur in sterilem Zustande vorlagen. Es sei deshalb bloß soviel bemerkt, daß es alles Arten von mittlerer Fadendicke waren, ganz dünne und ganz dicke Arten wurden nicht untersucht. Das Material wurde mit absolutem Alkohol fixiert, nur in ganz wenigen Fällen wurden die Reaktionen auch an frischen Fäden ausgeführt. Von höheren Pflanzen wurden Wurzelspitzen von Vicia faba und Hyacinthus und junge Blütenknospen von Lilium martagon verwendet. Die zwei ersten Objekte waren mit absolutem Alkohol fixiert, das letzte mit 70% Alkohol. Alle drei wurden in Paraffin eingebettet und in Schnitte von 10 μ zerlegt. In einigen Fällen wurde zur Ergänzung das Endosperm von Fritillaria und das Epithel der Harzgänge von Pinus herangezogen. Die Reaktionen wurden nicht an den ganzen Objekten, sondern erst an den Schnitten vorgenommen.

2. Farbreaktionen.

Millons Reagens. Spirogyren wurden mit Fließpapier etwas abgetrocknet (Alkoholmaterial) und direkt ohne mit Wasser in Berührung gebracht worden zu sein, in einen Tropfen Millons Reagens auf den Objektträger gebracht und leicht erwärmt. Der Nukleolus war schön ziegelrot, im übrigen Kern waren kleine rote Granula zu sehen, und ebenso waren die Pyrenoide schön rot, ihre Stärkehülle gelöst. In Schnitten von Pisum, die gleich behandelt wurden, waren Nukleolen und Chromosomen ebenfalls rot gefärbt.

Jodjodkali. Nach den Angaben in der Literatur färben sich Eiweißkörper gelb bis braun. Dementsprechend erhielt ich bei Lilium martagon eine gelbe bis bräunlichgelbe Färbung der Nukleolen, des Chromatinklumpen und der Chromosomen. Im Endosperm von Fritillaria waren Nukleolen und Chromatin rein braun gefärbt, der übrige Kern gelb, die Chromosomen wieder braun. Bei Pinus erhielt ich mehr gelbliche, bei Pisum mehr bräunliche Nukleolen.

Unterwirft man Spirogyra derselben Behandlung, so wird der Nukleolus typisch rotbraun, er nimmt eine Farbe an, die auffällig an die Färbung von Glykogen durch Jod erinnert. Im übrigen Kern sieht man rotbraune Punkte. Um diese Färbung in der geschilderten Weise zu bekommen, ist es nötig, eine starke Lösung von Jodjodkalium zu nehmen, damit die Stärke vollständig abgesättigt wird. Beobachtet man dann mit Ölimmersion, so sieht der Kern aus, wie nach einer Doppelfärbung: der Nukleolus rotbraun, der übrige Kern rein gelb mit kleinen roten Punkten. Auf diese eigentümliche rotbraune Färbung werde ich später noch einmal zurückkommen.

3. Verhalten zu heißem Wasser.

Über den Einfluß heißen Wassers von 96—99° auf die Kerne lebender und zum Teil auch fixierter Objekte hat kürzlich Němec (1909 und 1910) sehr interessante Beobachtungen veröffentlicht. Schon nach einer Behandlung die kürzer war als eine Minute, waren die Chromosomen im lebenden Material völlig gelöst, es blieben bloß ihre Hohlräume zurück. Nach Fixierung mit Alkohol war die Löslichkeit geringer. Die

ruhenden Kerne verhielten sich verschieden. In der meristematischen Zone der Wurzel erschienen die Kerne nach der Behandlung mit heißem Wasser fast homogen, ihr Chromatin war gelöst, der Nukleolus aber erhalten. In nicht mehr meristematischen Zellen hingegen wurden die Chromatinklumpen durch das heiße Wasser nicht verändert. Ich will noch beifügen, daß Němec insofern Ausnahmen von dem geschilderten Verhalten gefunden hat, als die Chromosomen bei Scolopendrium und Platanthera bifolia in heißem Wasser sich nicht lösten (1910, S. 346—347, 353). Als ich Schnitte von Hyacinthus, die sehr lange in Alkohol gelegen hatten, 15 Minuten in kochendes Wasser steckte, so wurden die Chromosomen nicht gelöst, sie waren vielmehr nach Färbung mit Hämalaun tiefblau, ebenso die Nukleolen. Dieses Resultat ist sicherlich durch die lange Alkoholbehandlung verursacht, denn als ich Schnitte von Vicia faba, die ebenfalls sehr lange im Alkohol verweilt hatten, eine $^1/_2$ Stunde lang in Wasser kochte und nachher mit Hämalaun färbte, so war deutlich zu sehen, daß die Chromosomen vielfach ganz herausgelöst waren, während sie in andern Fällen sehr stark vakuolisiert waren. Die Nukleolen waren völlig unversehrt geblieben.

Němec (1910, S. 355) hat auch bereits einige Versuche mit Spirogyra ausgeführt. Er tauchte lebende Fäden 30 Sekunden in heißes Wasser und konnte keine Veränderung des Nukleolus finden. Anderes Material wurde 1 Minute lang mit heißem Wasser behandelt, hierauf mit Flemmingscher Lösung fixiert, in Paraffin eingebettet und geschnitten. Nach Färbung mit Safranin-Säurealkohol erschienen einige Nukleolen fast homogen mit nur wenig kleinen Vakuolen, andere enthielten viel mehr Vakuolen, und einige waren gänzlich vakuolisiert. Man dürfte deshalb wohl geneigt sein anzunehmen, daß das heiße Wasser auf die Nukleolen von Spirogyra nicht ohne Einfluß ist. Ich habe einige Versuche mit Alkoholmaterial gemacht. Ich kochte es 8 Stunden lang in Wasser und färbte dann mit der gleichen starken Jodlösung, von der oben die Rede war. Die Nukleolen wurden nun nicht mehr typisch rotbraun, sondern hatten eine Mischfarbe zwischen gelb und rot, die bald etwas mehr gegen gelb, bald etwas mehr gegen rot neigte. Nach 12stündigem

Kochen war im wesentlichen alles gleich geblieben, nach 26stündigem Kochen hingegen waren die Nukleolen gelb mit mehr oder weniger deutlichem Stich ins rote. Daraus geht hervor, daß durch lange Behandlung mit heißem Wasser die Nukleolen im Alkoholmaterial von Spirogyra doch auch angegriffen werden, denn hält man die Jodfärbung für eine chemische Reaktion, so muß man schließen, daß der Nukleolus sich irgendwie chemisch verändert hat, hält man sie aber für eine reine Speicherung wie die Färbung mit Anilinfarben, so muß man schließen, daß die Dichte des Nukleolus geringer geworden, daß also wohl etwas Substanz herausgelöst worden ist. Zum Vergleich wurde noch frisches Material 30 Minuten lang in kochendes Wasser gesteckt, ohne daß dadurch eine wesentliche Veränderung des Nukleolus erzielt worden wäre.

Es ist also auf jeden Fall sicher, daß die Nukleolen von Spirogyra dem heißen Wasser einen äußerst großen Widerstand bieten. Darin braucht nun aber noch kein prinzipieller Gegensatz zum Verhalten der Chromosomen höherer Pflanzen zu liegen. Wie schon erwähnt, konnte Němec in zwei Fällen die Chromosomen nicht lösen, ebenso blieb das Chromatin der nicht mehr meristematischen ruhenden Kerne ungelöst. Bei der Diskussion dieser Verschiedenheiten hebt Němec hervor daß der Grund nicht in einer chemischen Differenz zwischen den Chromosomen und dem ruhenden Chromatin zu liegen braucht, sondern daß denkbar ist, daß in den Zellen mit ruhendem Kern irgendwelche chemischen Stoffe sind, die die Lösung des Chromatins durch heißes Wasser verhindern. Diese Annahme verliert aber an Wahrscheinlichkeit, da Němec in den Milchröhren der Wurzelspitzen von Euphorbia helioscopia, also in derselben Zelle die gleiche Verschiedenheit zwischen dem Chromatin der ruhenden Kerne und den Chromosomen fand.

4. Verhalten zu Säuren.

Über die Wirkung starker Säuren ist bis jetzt nicht viel bekannt geworden. Zacharias (1910, S. 229—230) teilt mit, daß in Alkoholmaterial von Hemerocallis flava die Chromosomen nach Behandlung mit 50% Salzsäure während 24 Stunden nicht mehr zu sehen waren, während die Nukleolen erhalten waren.

Bei Aloe subferox waren nach der gleichen Behandlung die Hohlräume der Chromosomen sichtbar, ebenso wurde eine Lösung beobachtet bei Helleborus foetidus. Auch Němec (1910) hat einige Versuche mit starker Salzsäure gemacht, da er aber die Objekte vor der Behandlung mit Säure kurze Zeit in heißes Wasser gesteckt hatte, so war die Lösung der Chromosomen keine reine Säurewirkung. Aus den vorliegenden Angaben läßt sich mit Sicherheit entnehmen, daß die Chromosomen in starker Salzsäure löslich sind. Von andern Säuren hat Němec (1910) noch Phosphorsäure geprüft und gibt an (S. 359—360), daß bei Lilium candidum und Vicia faba, die mit Alkohol fixiert waren, die Chromosomen nach 4stündigem Verweilen in konzentrierter Phosphorsäure gut erhalten waren, während die Nukleolen verschwunden waren. Ich werde auf diese Angaben bei den Versuchen mit Phosphorsäure zurückkommen. Über das Verhalten der Chromosomen zu starker Salpeter- und Schwefelsäure liegen bis jetzt keine Angaben vor.

Salpetersäure, konzentriert. Schnitte von Hyacinthus wurden 10 Minuten in konzentrierte Salpetersäure gebracht, hierauf anderthalb Stunden in fließendem Wasser ausgewaschen und zum Teil mit Eisenhämatoxylin, zum Teil mit Hämalaun gefärbt. Die Chromosomen waren völlig gelöst, ihre Negative waren sehr scharf, die Nukleolen hingegen waren unverändert. (Taf. IX, Fig. 2.) Man vergleiche damit Fig. 1, Taf. IX, die eine Zelle aus unbehandeltem Alkoholmaterial darstellt. Auch im Knäuelstadium wird das Chromatin völlig gelöst, wie ein Vergleich von Fig. 3a mit 3b zeigt, wovon die erstere einen Knäuel aus unbehandeltem Alkoholmaterial darstellt, während die zweite einen ähnlichen Knäuel nach der Säurebehandlung zeigt. Man beachte auch hier wieder, daß die Nukleolen durch die Säurebehandlung nicht gelöst worden sind.

Schnitte von Lilium martagon, die 10 Minuten in konzentrierter Salpetersäure verweilten, hierauf eine Stunde in fließendem Wasser ausgewaschen, und mit Hämalaun gefärbt wurden, gaben dasselbe Resultat. In den Archesporzellen der Antheren waren die Chromosomen völlig gelöst, man sah ihre typischen Negative. In den ruhenden Kernen waren die Chromatinklumpen ebenfalls gelöst, die Nukleolen hingegen blieben völlig erhalten. Auch

bei Fritillaria wurden die Nukleolen nicht gelöst bei derselben Behandlung, sie färbten sich vielmehr gelb und waren nach Färbung mit Eisenhämatoxylin intensiv gefärbt. Genau gleich verhielten sich die Nukleolen in den Epithelzellen der Harzgänge von Pinus.

Bringt man nun mit Alkohol fixierte Spirogyren 10 Minuten in konzentrierte Salpetersäure, so wird der Nukleolus vollständig herausgelöst. Man kann sich davon schon überzeugen, wenn man die Fäden nach der Behandlung in Wasser ansieht. Man bemerkt dann, daß der Nukleolus verschwunden ist, während der übrige Kern ebenso wie die Pyrenoide gelb gefärbt ist. Färbung mit Eisenhämatoxylin ergibt nichts Neues. In Fig. 5 sind einige mit Salpetersäure behandelte Kerne nach einem Präparat mit Eisenhämatoxylin gezeichnet, während zum Vergleich in Fig. 4 mit gleicher Färbung ein Kern aus unbehandeltem Material dargestellt ist. Salpetersäure 20 Minuten lang wirken zu lassen, ist nicht empfehlenswert, da der Zellinhalt dann sehr stark zusammenschrumpft, so daß der Kern vielfach nicht zu sehen ist. Wo er zu sehen ist, hat er nach Färbung mit Eisenhämatoxylin die Form eines Ringes. In einem Fall ließ ich die konzentrierte Salpetersäure etwas über 3 Stunden wirken, was zur Folge hatte, daß der Zellinhalt zu einem Klumpen zusammengeschrumpft war, worin der Kern nicht mehr zu sehen war. In frischem Material, das 10 Minuten in der konzentrierten Säure verblieb, schrumpfte der Zellinhalt nicht besonders stark. Der Nukleolus war herausgelöst, die Kerne hatten aber vielfach einen ziemlich unregelmäßigen Umriß bekommen.

Fassen wir das Ergebnis der Versuche mit konzentrierter Salpetersäure zusammen, so ergibt sich, daß die Nukleolen von Spirogyra sich gleich verhalten, nicht wie die Nukleolen höherer Pflanzen, sondern wie die Chromosomen höherer Pflanzen. Die Beobachtung Meuniers, daß die Nukleolen von Spirogyra in starker Salpetersäure fast völlig löslich sind, ist also richtig. Daß ich eine völlige Herauslösung bekam, dürfte darauf beruhen, daß ich konzentrierte Säure verwendete.

Salzsäure, konzentriert. Schnitte von Hyacinthus wurden 10 Minuten lang mit konzentrierter Salzsäure behandelt, hierauf

1 1/2 Stunden in fließendem Wasser ausgewaschen und mit Hämalaun gefärbt. Die Chromosomen waren vollständig gelöst, man sah ihre typischen Negative, die Nukleolen hingegen waren völlig erhalten (Fig. 6a und b). Wurden Schnitte aus dem Endosperm von Fritillaria nach derselben Säurebehandlung und nachfolgendem gründlichen Auswaschen mit Jodjodkali behandelt, so hoben sich die Nukleolen sehr scharf braun gefärbt ab. Die Chromatinmassen hingegen waren verschwunden. In Eisenhämatoxylin speicherten die Nukleolen das Hämatoxylin stark, während im übrigen Kern ein schwach gefärbtes, grobmaschiges Gerüst erschien.

Spirogyren, in Alkohol fixiert, kamen 10 Minuten in konzentrierte Salzsäure, und nach dem Auswaschen wurden die Fäden zum Teil ungefärbt, zum Teil nach Färbung mit Eisenhämatoxylin oder mit Jodjodkali untersucht. In manchen Kernen waren die Nukleolen vollständig herausgelöst (Fig. 7a), in andern Fällen war der Nukleolus noch sichtbar (Fig. 7b), aber sehr schwach gefärbt, so daß die Hauptmasse sicher herausgelöst war. Wurde die Einwirkung der Säure auf 20 Minuten verlängert, so war das Ergebnis im wesentlichen das gleiche. Damit sind also die Meunierschen Angaben bestätigt. Wie in Salpetersäure, so lösen sich die Nukleolen von Spirogyra und die Chromosomen höherer Pflanzen auch in konzentrierter Salzsäure, während die Nukleolen höherer Pflanzen ungelöst bleiben.

Schwefelsäure, konzentriert. Schnitte von Vicia faba kamen 2 Minuten in konzentrierte Schwefelsäure. Nach gründlichem Auswaschen Färbung mit Hämalaun. Ergebnis: Chromosomen gelöst, typische Negative, Protoplasma grob vakuolig, Zellwände gelöst. Läßt man die Schwefelsäure 10 Minuten lang einwirken, so lösen sich die Schnitte beim Auswaschen im Wasser vom Objektträger los. Lilium martagon wurde ebenfalls 2 Minuten in konzentrierte Schwefelsäure gesteckt, ausgewaschen und mit Hämalaun gefärbt. Ergebnis: Nukleolen dunkelblau, der übrige Kern grob gerüstig, die Zellwände gelöst. Mitosen waren in den Schnitten keine zu finden.

Um dieselben Versuche mit Spirogyra ausführen zu können, waren aus naheliegenden Gründen Mikrotomschnitte nötig.

Behandlung mit konzentrierter Schwefelsäure 5 Minuten, gründliches Auswaschen mit Wasser. Ergebnis: Nukleolen herausgelöst, Pyrenoide nicht gelöst, ihre Stärke gelöst. Wurde die Schwefelsäure nur 2 Minuten lang auf den Schnitten gelassen, so lösten sich die Nukleolen nicht, sie bieten also offenbar einen etwas größeren Widerstand als die Chromosomen.

Wir finden also im Verhalten gegen konzentrierte Schwefelsäure wieder Übereinstimmung zwischen den Chromosomen höherer Pflanzen und den Nukleolen von Spirogyra, während die Nukleolen höherer Pflanzen sich wieder abweichend verhalten.

Phosphorsäure (H_3PO_4). Ich verwendete zu diesen Versuchen eine von Merk bezogene Phosphorsäure von Syrupkonsistenz vom spezifischen Gewicht 1,7 = ca. 83 %. Schnitte von Vicia faba wurden 10 Minuten darin gelassen, $^1/_2$ Stunde in fließendem Wasser ausgewaschen und mit Hämalaun gefärbt. Die Chromosomen waren genau so wie nach Behandlung durch die vorher besprochenen Säuren völlig herausgelöst (Fig. 8). Ihre Negative waren genau so typisch scharf wie zum Beispiel in den Salpetersäurepräparaten. Die Nukleolen waren nicht gelöst, manchmal waren sie allerdings ringförmig. Da aber solche Ringe auch im unbehandelten Material vorkamen, so darf daraus nicht auf eine teilweise Lösung durch die Phosphorsäure geschlossen werden. Lilium martagon verhielt sich bei gleicher Behandlung gleich, die Chromosomen waren auch hier völlig gelöst, die Nukleolen unversehrt, nach Färbung mit Hämalaun schön blau.

Dieses Ergebnis ist auffällig, weil, wie schon erwähnt, Němec bei Phosphorsäure ein abweichendes Verhalten fand. Er gibt an, daß er Wurzelspitzen von Vicia faba und Lilium candidum eine Stunde lang in 96 % Alkohol fixierte, hierauf kamen sie 4 Stunden in konzentrierte Phosphorsäure. Nach dieser Behandlung waren Chromosomen und Kerngerüst durch Safranin intensiv rot gefärbt, während die Nukleolen völlig verschwunden waren, oder bloß noch unregelmäßig Reste davon erhalten waren. Daß die Chromosomen nach 4 Stunden durch konzentrierte Phosphorsäure nicht gelöst werden, scheint mir nach meinen Versuchen doch sehr fraglich, so daß ich eher

glauben möchte, daß sich Němec bei der Konzentration der Phosphorsäure ein Irrtum eingeschlichen hat.

Spirogyra bietet nach 10 Minuten langem Verweilen in der 83proz. Phosphorsäure nichts Neues. Die Nukleolen sind völlig gelöst, die Pyrenoide nicht, wohl aber ihre Stärke, wie man sich nach Färbung mit Eisenhämatoxylin überzeugen kann.

Die Wirkung der starken Phosphorsäure stimmt also mit der Wirkung der übrigen Mineralsäuren, wenn sie in starkem Zustand angewendet werden, überein.

Phosphorwolframsäure. Diese Säure wurde im festen Zustand von Merk bezogen. Zuerst wurde eine Lösung verwendet, die 20 g der Säure in 5 ccm Wasser enthielt. Schnitte von Vicia faba kamen 10 Minuten lang in diese Lösung, wurden hierauf tüchtig mit Wasser ausgewaschen und mit Hämalaun gefärbt. Eine Lösung der Chromosomen war nicht eingetreten, sie waren im Gegenteil intensiv blau gefärbt, wie im unbehandelten Material. Ebenso verhielt sich das Chromatin der ruhenden Kerne. Die Nukleolen waren nicht gelöst, vielmehr scharf umgrenzt, also auch nicht gequollen, vielfach in einem Schrumpfungshof liegend und schwach blau gefärbt. Dieses Ergebnis war so auffällig, daß ich nun eine gesättigte Lösung von Phosphorwolframsäure in Wasser herstellte und Schnitte von Vicia faba eine Stunde lang darin ließ. Nach Färbung mit Hämalaun war das Bild genau dasselbe, wie eben geschildert.

Spirogyra blieb 10 Minuten in der schwächeren Lösung der Säure, hierauf Färbung mit Eisenhämatoxylin. Der Zellinhalt war gar nicht geschrumpft, die Nukleolen intensiv blauschwarz, der übrige Kern reich an gerüstartigem Gerinnsel. Ließ ich die gesättigte Säurelösung eine Stunde lang einwirken, so änderte das nichts. Der Zellinhalt war ebensowenig geschrumpft, wie vorher und mit Eisenhämatoxylin erhielt ich wundervolle Kernfärbungen mit tief blauschwarzem Nukleolus. Es verhalten sich also in starker Phosphorwolframsäure die Chromosomen höherer Pflanzen und die Nukleolen von Spirogyra wieder gleich, aber im Gegensatz zu den früher besprochenen Säuren zeigen die Nukleolen der höhern Pflanzen diesmal kein abweichendes Verhalten.

Es war nun nötig, die Wirkung einiger der vorhin auf-

geführten Säuren auch in schwächer konzentriertem Zustand zu prüfen und zwar sowohl kalt als heiß.

Salpetersäure, verdünnt, kalt. Schnitte von Vicia faba blieben 24 Stunden in einer Lösung mit 2% Salpetersäure. Auswaschen mit Wasser, Färbung mit Hämalaun. Chromosomen und Nukleolen nicht angegriffen, sehen aus wie in unbehandeltem Material. Entsprechend diesem Versuch blieben Spirogyren 20 Stunden in 2proz. Salpetersäure. Auswaschen mit Wasser, Färbung mit starker Jodlösung. Die Nukleolen sind schmutzig orange gefärbt, sind also offenbar durch die Säure nicht wesentlich angegriffen worden. Ließ ich hingegen 3% Salpetersäure 50 Stunden lang einwirken, so färbten sich die Nukleolen mit der starken Jodlösung zum Teil rein gelb bis ocker, zum Teil mehr oder weniger hell rotbraun. Daraus dürfte hervorgehen, daß verdünnte Salpetersäure auch bei längerer Einwirkung nur sehr schwer angreift. Ein ähnliches Ergebnis wie das zuletzt genannte erhielt ich, wenn ich 5% Salpetersäure 24 Stunden lang einwirken ließ.

Wir können also sagen, daß 2% Salpetersäure in 24 Stunden weder die Nukleolen von Spirogyra, noch die Nukleolen und Chromosomen höherer Pflanzen wesentlich angreift.

Salzsäure, verdünnt, kalt. Das Ergebnis war dasselbe wie bei der verdünnten Salpetersäure. Vicia faba, 24 Stunden in 2% Salzsäure, Auswaschen mit Wasser, Färbung mit Hämalaun: Chromosomen und Nukleolen wie in unbehandeltem Material. Spirogyra, 24 Stunden in 2% Salzsäure, Auswaschen mit Wasser, Färbung mit Eisenhämatoxylin: Nukleolen intensiv blauschwarz.

Phosphorwolframsäure, verdünnt, kalt. Vicia faba und Lilium martagon, 24 Stunden in 2% Phosphorwolframsäure, Auswaschen mit Wasser, Färbung mit Hämalaun: Chromosomen tief blau, Nukleolen schwächer blau, nicht angegriffen. Spirogyra gleich behandelt, Färbung mit Eisenhämatoxylin: Nukleolen tief blauschwarz.

Salpetersäure, verdünnt, heiß. Schnitte von Vicia faba wurden 30 Minuten in 2% Salpetersäure gekocht. Nach dem Auswaschen Färbung mit Hämalaun. Der Zellinhalt ist stark geschrumpft, schwer färbbar, die Chromosomen sind gänzlich

gelöst, die Nukleolen unversehrt. Inwieweit bei dieser Lösung die Säure beteiligt war, läßt sich natürlich schwer entscheiden. Immerhin war die Lösung der Chromosomen bei $^1/_2$stündigem Kochen mit Wasser allein nicht so intensiv. Spirogyren wurden ebenfalls 30 Minuten in 2% Salpetersäure gekocht. Hierauf blieben sie 24 Stunden in Wasser, das mehrmals gewechselt wurde, und kamen dann 1 $^1/_2$ Stunden in die starke Jodlösung. Die Nukleolen waren orange, manchmal hell rotbraun, so daß also eine wesentliche Wirkung nicht zu konstatieren war. Wurde hingegen mit der gleichen Salpetersäurelösung eine Stunde lang gekocht, so waren die Nukleolen rein gelb nach Färbung mit Jodjodkalium. In manchen Fällen schien es auch, als ob sie völlig herausgelöst wären.

Salzsäure, verdünnt, heiß. Spirogyra wurde 30 Minuten in 2% Salzsäure gekocht und verblieb hierauf während 20 Stunden im Wasser, das mehrere Male gewechselt wurde. Nach Färbung mit Jod waren die Nukleolen rein gelb, nach Färbung mit Eisenhämatoxylin schwach blau, manchmal schienen sie ganz gelöst zu sein. Wurde das Kochen auf 1 Stunde ausgedehnt, so war das Ergebnis im wesentlichen dasselbe.

Es werden also die Nukleolen von Spirogyra durch Kochen mit verdünnten Säuren nur schwer angegriffen. Die Wirkung dürfte wohl nicht bloß allein auf Kosten der Säure, sondern auch auf Kosten des Wassers zu setzen sein, da, wie wir gesehen haben, kochendes Wasser allein auch etwas einwirkt.

5. Verhalten zu Alkalien.

Němec (1910, S. 360) hat einige Versuche mit Kalilauge mitgeteilt. Er brachte Wurzelspitzen von Lilium candidum 1 Stunde in 96% Alkohol, wusch $^1/_2$ Stunde in Wasser aus und behandelte dann 5 Stunden lang mit 3% Kalilauge. Die Chromosomen wurden dadurch völlig gelöst, die Nukleolen hatten in den meristematischen Zellen ihre normale Form beibehalten, in den nicht meristematischen waren sie meistens noch vorhanden. Vicia faba verhielt sich bei gleicher Behandlung ähnlich, bloß war in den Abdrücken der Chromosomen noch etwas Substanz vorhanden und in den älteren Zellen waren die Nukleolen blasenförmig und unregelmäßig geschrumpft. In

einem andern Fall (1910, S. 362) kamen Wurzeln von Vicia faba 15 Minuten in 96% Alkohol, hierauf 24 Stunden in 1% Kalilauge. Auch in dem Fall waren die Chromosomen gelöst, die Nukleolen aber waren vorhanden, allerdings etwas geschrumpft. Entsprechend diesen Versuchen legte ich Schnitte von Vicia faba 3 Tage in 1% Kalilauge, wusch mit Wasser aus und färbte mit Hämalaun. In der Wurzelhaube hatten die Kerne nach dieser Behandlung normalen Umriß, ihre Nukleolen waren schön blau und im übrigen Kern war wenig gefärbte Substanz vorhanden. Je weiter man aber in der Wurzel aufwärts rückte, desto unregelmäßiger wurde der Kernumriß und die Nukleolen wurden ringförmig. Vielfach sah der ganze Kern aus, wie wenn er in Lösung begriffen wäre. Das hat weiter nichts Auffälliges auf sich, denn es ist ja schon lange bekannt, daß man Schnitte nicht zu lange mit Kalilauge behandeln darf, weil sonst der ganze Zellinhalt schließlich zerstört wird. Aus den vorstehenden Angaben geht aber jedenfalls so viel hervor, daß die Nukleolen höherer Pflanzen in Kalilauge sich nur sehr schwer lösen, während im Gegensatz dazu die Chromosomen sich sehr leicht lösen.

Bereits Meunier gibt an, daß durch Kalilauge ein Teil der Substanz des Nukleolus von Spirogyra herausgelöst werde. Leider gibt er nichts Näheres an über die Konzentration und die Dauer der Einwirkung. Er sagt darüber bloß, es sei nötig, »que l'on prenne soin de la (sc. die Kalilauge) diluer suffisamment pour modérer son action, et d'y prolonger quelque temps l'immersion des objets (S. 367)«. Němec behandelte ebenfalls Spirogyra mit Kalilauge. In einem Fall (1910, S. 355) wurden die Fäden folgendermaßen behandelt: heißes Wasser 30 Sekunden, 96% Alkohol 24 Stunden, Wasser 30 Minuten, 1% Kalilauge 45 Stunden. Nach dieser Behandlung wurden die Fäden in 95% Alkohol gelegt und darin untersucht. Die Kerne erschienen fast ganz so strukturiert wie nach dem Erwärmen, sie waren körnig, der Nukleolus homogen. In einem andern Versuch (1910, S. 363) wurden die Spirogyren 30 Sekunden in heißes Wasser gesteckt, hierauf 1 Stunde 96% Alkohol und zum Schluß 3 Tage in 1% Kalilauge. Nun Untersuchung in 75% Alkohol, worin der Kern körnig, der Nukleolus stark licht-

brechend erschien. Nach diesen Angaben würde es also scheinen, als ob verdünnte Kalilauge auch bei längerer Einwirkung den Nukleolus von Spirogyra nicht angriffe. Ich habe deshalb Alkoholmaterial von Spirogyra 14 Stunden in 1% Kalilauge gelegt, hierauf Auswaschen mit Wasser und Färbung mit starker Jodlösung. Die Nukleolen waren rein gelb, oder gelb mit leicht rötlichem Ton. Wurde die Kalilauge 38 Stunden lang wirken gelassen, so war das Resultat nicht wesentlich anders. Man darf daraus wohl entnehmen, daß durch längere Behandlung mit 1% Kalilauge aus dem Nukleolus von Spirogyra Substanz herausgelöst wird, wie das Meunier angibt. Ich versuchte einen stärkeren Eingriff zu erzielen, indem ich 2% Kalilauge 38 Stunden lang wirken ließ. Das Ergebnis war aber betrübend, denn der Zellinhalt war so völlig verquollen, daß darin nichts mehr deutlich zu erkennen war. Dagegen kam ich auf andere Weise zum Ziel. Alkoholmaterial von Spirogyra wurde 5 Minuten in 1% Kalilauge gekocht, ausgewaschen und mit Eisenhämatoxylin gefärbt. Der Zellinhalt hatte ziemlich gelitten, die Kerne waren erhalten. Ihre Nukleolen waren herausgelöst, der Rand der so entstandenen Höhlung erschien im optischen Durchschnitt begrenzt von einem schmalen Ring, der stärker gefärbt war als der übrige Kern (Fig. 9a und b). Dieser Ring machte den Eindruck, wie wenn er der letzte Überrest des Nukleolus wäre, der der Lösung größeren Widerstand entgegensetzte, als der mittlere Teil. Öfters lagen innerhalb dieses Ringes, also in der Höhlung drin, einzelne unregelmäßige Klümpchen (Fig. 9b). In Schnitten von Lilium martagon waren nach derselben Behandlung die Kerne sehr inhaltsarm geworden, die Nukleolen aber mit Hämalaun schwach rotblau gefärbt.

Im weiteren machte ich dann Versuche mit Ammoniak. Schnitte von Vicia faba blieben 3 Tage in konzentriertem Ammoniak. Nach der Färbung mit Hämalaun waren die unversehrten Nukleolen intensiv blau, der übrige Kern gleichmäßig schwächer blau mit einem stärker blauen groben Gerüst (Fig. 10a). Die Chromosomen waren völlig gelöst, auch im Knäuelstadium und man sah wieder ihre typischen Negative (Fig. 10b). Lilium martagon blieb 5 Tage in konzentriertem Ammoniak und wurde mit Hämalaun gefärbt. Wie bei Vicia waren die Nukleolen

ungelöst, die Chromosomen hingegen der Mitosen der Antherenwand waren ebenfalls ungelöst (im Archespor selbst waren keine Mitosen). Alkoholmaterial von Spirogyra blieb 2 Tage in konzentriertem Ammoniak. Hierauf Färbung mit starker Jodlösung. Die Nukleolen waren meistens gelb. Andere Fäden blieben 5 Tage in konzentriertem Ammoniak, auswaschen mit Wasser, Färbung mit Eisenhämatoxylin. Der Zellinhalt war sehr gut erhalten. Die Kerne verhielten sich verschieden, es waren solche da mit unversehrtem Nukleolus, der aber lange nicht so intensiv gefärbt war wie die Pyrenoide der gleichen Zelle, während im unbehandelten Alkoholmaterial Nukleolen und Pyrenoide das Hämatoxylin gleich stark speichern. In anderen Kernen war der Nukleolus teilweise gelöst, er sah aus, wie wenn er vom Rande her vakuolisiert worden wäre (Fig. 11 b). Daneben kamen aber auch Kerne vor, in denen der Nukleolus vollständig gelöst war (Fig. 11 a).

Fassen wir zusammen, so können wir sagen, daß die Nukleolen von Spirogyra sich in ihrem Verhalten zu Ammoniak den Chromosomen höherer Pflanzen anschließen. Beide werden dadurch gelöst, die Nukleolen von Spirogyra schwerer als die Chromosomen höherer Pflanzen. Doch darf man darauf wohl keinen prinzipiellen Unterschied gründen, denn auch unter den Chromosomen scheinen Verschiedenheiten vorzukommen, wie das abweichende Verhalten von Fritillaria andeutet. Die Nukleolen höherer Pflanzen werden nicht gelöst.

Im Verhalten zu verdünnter Kalilauge ergibt sich kein so durchgreifender Unterschied, immerhin schließen sich auch hier die Nukleolen von Spirogyra eher den Chromosomen als den Nukleolen der höheren Pflanzen an.

6. Autolyse.

In den eingehenden Versuchen, die Oes (1908 und 1909) über die enzymatische Chromatolyse veröffentlicht hat, zeigte es sich, daß die Nukleolen im Gegensatz zu den Chromosomen ungelöst blieben (siehe z. B. Oes, 1908. Taf. V, Fig. 9—12 und Fig. 13, 14). Da Oes sich mit Spirogyra nicht befaßt hat, sondern nur mit höheren Pflanzen, so machte ich einen Autolyseversuch. Lebende Spirogyren blieben 3 Stunden bei ca. 40°

in einer Lösung von $^1/_2$% Chloroform + $^1/_2$% Kochsalz und wurden hierauf in absolutem Alkohol fixiert. Als die Fäden nun in Eisenalaun kamen, färbte sich ihr Inhalt blau (die in den Spirogyrazellen vorhandene Gerbsäure hatte offenbar den Zellinhalt imprägniert). Im gleichen Faden fanden sich nun Kerne mit dunkelblau gefärbtem Nukleolus, Kerne mit blaß gefärbtem Nukleolus, Kerne mit herausgelöstem Nukleolus und Kernklumpen, das heißt unregelmäßig umgrenzte, wie zerflossen aussehende, gleichmäßig dunkelblau gefärbte Kernmassen. Daß die Lösung des Nukleolus nicht auf Kosten des Chloroforms zu setzen ist, geht daraus hervor, daß die Nukleolen in Spirogyrafäden, die 7 Tage in Chloroform gelegen hatten, mit starker Jodlösung sich genau so rotbraun färbten, wie in unbehandeltem Material. Daß anderseits die sicherlich in den Zellen in sehr geringer Konzentration vorhandene Gerbsäure ebenfalls nicht die Ursache der Lösung sein kann, geht daraus hervor, daß 2% Mineralsäuren auch in 24 Stunden die Nukleolen nicht angreifen. Ich halte es deshalb für ausgemacht, daß die Lösung auf enzymatischem Wege erfolgt ist. Es ist in dem Fall auch gut verständlich, daß die Kerne im gleichen Faden sich verschieden verhielten. In den Zellen, die sich zur Teilung vorbereiten, ist gewiß der Enzymgehalt größer und infolgedessen wird der Nukleolus ganz oder teilweise gelöst. In den ruhenden Zellen hingegen reicht die Enzymmenge nicht aus, um in 3 Stunden den Nukleolus wesentlich anzugreifen.

Wir kommen also zum Schluß, daß in den Spirogyren ein Enzym vorhanden ist, das den Nukleolus löst, während umgekehrt in höheren Pflanzen kein solches Enzym vorhanden ist, vielmehr eines, daß die Chromosomen und das Chromatin löst.

7. Verdunkelung.

Wären die Nukleolen von Spirogyra irgendeine Reservesubstanz, wie es ja wahrscheinlich die Nukleolen der höheren Pflanzen sind, so könnte man erwarten, daß sie bei längerer Verdunkelung angegriffen werden. Ein Gefäß mit Spirogyra wurde deshalb 6 Tage lang völlig verdunkelt. Nach dieser Zeit war die große Mehrzahl der Zellen durch 0,4 Mol. Kochsalz noch plasmolysierbar, also noch lebend. Nach der Färbung mit

starker Jodlösung zeigte sich, daß die Stärke fast gänzlich verschwunden war, die Stromastärke war ganz aufgebraucht, die Pyrenoidstärke fast ganz. Die Nukleolen aber waren überall schön rotbraun. Nach 10tägiger Verdunkelung waren die meisten Zellen ebenfalls noch lebendig, die Stärke war gänzlich verschwunden, die Nukleolen aber zeigten unverändert die Rotbraunfärbung mit Jodjodkali. Auch nach 18tägiger Verdunkelung tritt diese Reaktion ungeschwächt ein. Damit wäre zu vergleichen, was Zacharias schreibt (1885, S. 293): »Das Verschwinden der Nukleolen läßt sich bei Galanthus durch Verdunkelung beschleunigen, während ich bei Spirogyra durch längere Kultur unter Lichtabschluß eine sicher zu konstatierende Verkleinerung der Nukleolen nicht erreichen konnte«. Dazu ist beizufügen, daß die Spirogyren 14 Tage im Dunkeln gehalten wurden.

8. Prüfung auf Glykogen.

Bekanntlich färbt sich Glykogen mit Jod in wässeriger Lösung rotbraun. Beim Erwärmen auf 50—60° verschwindet die Färbung, um beim Abkühlen wieder zu erscheinen. Die rotbraune Farbe, die die Nukleolen in der starken Jodlösung annehmen, ließ vermuten, daß das vielleicht dadurch bedingt sei, daß im Nukleolus Glykogen enthalten sei. Die Prüfung, ob diese Vermutung richtig sei, bereitete aber erhebliche Schwierigkeiten. Während man zum Beispiel an Schnitten von Morchella schon mit bloßem Auge beim Erwärmen das Verblassen der Färbung, und beim Abkühlen das Wiedererscheinen mit Leichtigkeit feststellen kann, so gelingt das bei Spirogyra auch nicht bei schneller Kontrolle mit schwacher Vergrößerung. Ich ging deshalb zuerst so vor, daß ich das Präparat, nachdem es mit starker Vergrößerung eingestellt war, mit dem ganzen Mikroskop in einen Wärmekasten brachte und darin auf die entsprechende Temperatur erwärmte. Dabei verschwand wirklich die rotbraune Farbe des Nukleolus, der mehr oder weniger rein gelb wurde, beim Abkühlen aber nicht mehr die rotbraune Farbe erhielt. Der Versuch wurde nun so wiederholt, daß zu den Spirogyren ein Jodkristall unter das Deckglas gelegt wurde, das mit einem Vaselinring umgeben war. Das Ergebnis war dasselbe wie das erstemal. Man könnte das darauf zurückführen, daß auch

in dem Fall während des Erwärmens die Lösung unter dem Deckglas zuviel Jod verloren hatte. Ich versuchte deshalb noch einen zweiten indirekten Weg, der vom folgenden Versuch ausging. In einem Reagenzglas wurden 10 ccm einer Glykogenlösung von 0,1° im Wasserbad auf 60° erwärmt. Dann wurde 1 ccm einer ebenfalls auf 60° erwärmten Jodlösung dazu gegeben. Die Folge war, daß die Lösung im Reagenzrohr rein jodgelbe Färbung annahm. Wurde nun unter der Wasserleitung rasch abgekühlt, so erschien die rotbraune Farbe. Diesem Versuche entsprechend wurde ein Reagenzglas mit Jodjodkalilösung auf 65° erwärmt, dann kamen einige Schnitte von Morchella hinein. Nach 15 Minuten wurde eine Probe herausgenommen, sehr rasch im Wasser abgespült und unters Mikroskop gebracht. Die glykogenreichen Asci waren gelb und hatten nur zum Teil einen leicht rötlichen Stich. Das Reagenzrohr wurde nun abgekühlt bis auf Zimmertemperatur, worauf einige der während der ganzen Zeit darin verbliebenen Schnitte herausgenommen, sehr rasch in Wasser abgespült und untersucht wurden. Das Glykogen, das die Asci reichlich erfüllte, war schön rotbraun. In gleicher Weise wurde etwas Spirogyramaterial in die auf 65° erwärmte Jodlösung gebracht, worin es ebenfalls 15 Minuten verblieb. Nun wurde eine kleine Probe herausgenommen und ohne Auswaschen direkt in einem Tropfen kalter Jodlösung untersucht. Die Nukleolen waren rein gelb oder schmutziggelb. Von den vielen durchgesehenen war kein einziger rotbraun. Währenddem wurde das Reagenzrohr abkühlen gelassen und dann eine Probe des während der ganzen Zeit darin verbliebenen Materials ohne Auswaschen direkt in einem Tropfen Jodlösung untersucht. Die Nukleolen waren rein bis schmutziggelb. Man könnte das darauf zurückführen, daß während des Erwärmens zuviel Jod aus der Lösung verdampft war. In der Tat zeigte ein Vergleich der erwärmten Jodlösung mit einer gleich hohen Schicht der ursprünglichen Lösung, daß die erste über weißem Papier jodgelb, die zweite schön rotbraun erschien. Zugleich wurden die gelben Nukleolen wieder schön rotbraun, sobald ich von der ursprünglichen Jodlösung kräftig durch das Präparat durchsaugte. Der Versuch wurde deshalb in folgender Weise wiederholt.

Die Jodlösung mit den Spirogyren wurde in ein Reagenzglas gegeben, das oben mit einem Wattepfropf geschlossen war. Nun wurde im Wasserbad 12 Minuten lang auf 65° erhitzt, wobei die Farbe der Jodlösung sich nicht veränderte. In einer Probe des Materials, die nun untersucht wurde, waren die Nukleolen gelb, zum Teil gelb mit rötlichem Ton, oder auch ganz hellrotbraun. Die Lösung wurde wieder abkühlen lassen und 15 Minuten, nachdem die Zimmertemperatur erreicht war, eine neue Probe untersucht. Die Färbung der Nukleolen war im wesentlichen dieselbe wie in der vorhergehenden Probe. Der Rest des Materials wurde nun in derselben Jodlösung gelassen und über Nacht stehen gelassen. Am nächsten Morgen waren die Nukleolen meistens rotbraun, es kamen aber auch gelbe vor mit rotem Ton. Eine zweite Probe wurde unter genau denselben Bedingungen 30 Minuten lang auf 65° erhitzt, hierauf abgekühlt und über Nacht stehen gelassen. Als die Fäden am nächsten Morgen untersucht wurden, so waren die Nukleolen rotbraun. Bei einer Wiederholung dieses Versuches hingegen, wo eine Probe 15 Minuten auf 70° erhitzt wurde und dann sofort in einem Tropfen kalter Jodlösung untersucht wurde, waren die Nukleolen nicht gelb, sondern rotbraun. Eine gleich behandelte Probe wurde in einem Tropfen destillierten Wassers von 70° auf den leicht angewärmten Objektträger gebracht, aber auch in dem Fall waren die Nukleolen rotbraun und nicht gelb. Wie man sieht, sind das wieder ganz abweichende Ergebnisse und es war somit unmöglich, mit Hilfe der Jodreaktion zu einer Entscheidung zu gelangen.

Aussichtsreicher schien eine von Alfred Fischer (1905) ausgearbeitete Methode zum Nachweis des Glykogens zu sein. Wie dieser Autor (1899) nachgewiesen hat, färben sich Eiweißkörper, die mit Tannin imprägniert sind, nicht mehr mit basischen Anilinfarben. Die Methode besteht nun darin, daß man mit Alkohol fixiert, worin das Glykogen unlöslich ist. Man behandelt dann die Mikrotomschnitte 5—10 Minuten lang mit 10% Tannin, das mit Glykogen eine Fällung gibt. Da diese Fällung in Wasser löslich ist, so spült man kurz mit 1% Kalibichromat ab. Hierauf behandelt man 5—10 Minuten mit 10% Kalibichromat, wodurch die Glykogentanninfällung un-

löslich gemacht wird. Hierauf Abspülung mit Wasser, Färbung mit Safranin-Anilinwasser oder mit einer anderen basischen Anilinfarbe 5—10 Minuten. Ich behandelte nun Schnitte von Spirogyra in der angegebenen Weise, wobei das Tannin und das 10proz. Kalibichromat 10 Minuten lang einwirkte. Hierauf Färbung mit Safranin und Methylenblau. Der Nukleolus hatte gar nichts von der Farbe aufgenommen, er zeigte bloß die Farbe des Kalibichromates. Im übrigen Kern hingegen waren zahlreiche kleine rot, beziehungsweise blau gefärbte Granula zu sehen. Wenn ich das Tannin und das 10proz. Kalibichromat bloß 5 Minuten lang wirken ließ, so waren nachher bei Färbung mit Safranin einzelne Nukleolen leicht rot, bei Färbung mit Methylenblau waren sie zum Teil etwas grünlich. Zur Kontrolle wurden Schnitte von Morchella nach der Fischerschen Methode behandelt (Wirkungsdauer 10 Minuten). Nach der Färbung mit Safranin-Anilinwasser und Einbettung in Balsam waren die Glykogenmassen in den Asci leuchtend rot, die Membranen schwach rot. In Schnitten aus dem Endosperm von Ricinus waren die Kristalloide nicht rot, sondern hatten bloß Kalibichromatfarbe. In ebenso behandelten Schnitten der Wurzel von Pisum hatten die Kerne (Nukleolen und Chromatin) bloß die Farbe des Kalibichromates. Ebenso verhielt sich das Protoplasma, während Stärke und Zellwände hellrot waren. Diese Farbe war aber sehr verschieden von dem leuchtenden Rot der Glykogenmassen bei Morchella.

Nach alledem scheint es mir doch zweifelhaft zu sein, daß die Nukleolen von Spirogyra Glykogen enthalten. Man muß nun anderseits allerdings berücksichtigen, daß das Glykogen im Nukleolus kaum frei vorkommen könnte, sondern sicherlich mehr oder weniger fest an irgendwelche Eiweißkörper gebunden wäre. Es könnte dann das mit Eiweiß imprägnierte Tannin die Glykogenkomponente an der Aufnahme des Safranins hindern. In dem Sinne wäre vielleicht zu deuten, daß bei nur 5 Minuten langer Behandlung mit Tannin die Nukleolen zum Teil etwas Farbe aufgenommen haben. Nach dem Mitgeteilten wird man ersehen, daß eine sichere Entscheidung, ob Glykogen im Nukleolus von Spirogyra vorhanden ist oder nicht, zurzeit nicht möglich ist.

9. Zusammenfassung der Ergebnisse.

In der folgenden Tabelle auf S. 744 sind die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zusammengefaßt. Es ist dazu nicht mehr viel zu bemerken. Schon ein Blick darauf genügt, um zu zeigen, daß eine auffällige Übereinstimmung zwischen den Nukleolen von Spirogyra und den Chromosomen höherer Pflanzen besteht, während die Nukleolen der höheren Pflanzen sich ganz abweichend verhalten. Es ist also die von Zacharias auch noch in seiner letzten Publikation verteidigte Anschauung, daß die Nukleolen von Spirogyra sich nicht von den Nukleolen höherer Pflanzen unterscheiden, unrichtig.

Wir wollen nun untersuchen, ob aus der geschilderten Übereinstimmung auch eine stoffliche Gleichheit zwischen den Chromosomen höherer Pflanzen und den Nukleolen von Spirogyra gefolgert werden darf. Die Unlöslichkeit in schwachen, die Löslichkeit in starken Säuren, ebenso die Löslichkeit in schwachen Alkalien sind Eigenschaften der Nukleoprotoide, deren ausgesprochen sauerer Charakter bekannt ist, ebenso auch der Nukleinsäuren. Um die letzteren in reinem Zustande kann es sich nicht handeln, da Chromosomen und Spirogyranukleolen sich auch mit sauren Anilinfarben färben, was nicht der Fall sein dürfte, wenn sie aus reiner Nukleinsäure bestehen würden. (Alfred Fischer, 1899.) Man würde deshalb zum Schluß kommen, daß die Nukleolen von Spirogyra aus einem Körper bestehen, der zur Klasse der Nukleoproteide gehört. Was die sehr geringe Löslichkeit der Spirogyranukleolen im heißen Wasser betrifft, so wäre zu bemerken, daß auch nicht bei allen höhern Pflanzen die Chromosomen in heißem Wasser sich lösen, und daß die schwächere, beziehungsweise stärkere Löslichkeit in heißem Wasser aller Wahrscheinlichkeit nach mit einem geringern, beziehungsweise stärkern Gehalt an Nukleinsäure zusammenhängt.

Es ist nun aber zu berücksichtigen, daß die Glykoproteide ähnliche Löslichkeitsverhältnisse aufweisen wie die Nukleoproteide. Durch Hitze werden aber die Glykoproteide nicht koaguliert, während der Nukleolus der Spirogyren durch kochendes Wasser wenig angegriffen wird. Zu erwähnen wäre hier ebenfalls, daß ein Kohlehydrat vorhanden sein müßte und zwar soviel man

Zusammenfassung der Reaktionen.

+ = geringe Lösung.
+ + = gute Lösung.
+ + + = sehr gute Lösung.
o = keine Lösung.

Fixierung: Alkohol absol., z. T. 70 %.

Reagens	Dauer der Einwirkung	Spirogyra	höhere Pflanzen	
		Nukleolus	Chromosomen	Nukleolus
Millons Reagens Jodjodkali		rot rotbraun	rot gelbbraun	rot gelbbraun
Wasser	30 Min. gekocht	o	+ +	o
	24 Std. gekocht	+		
Salpetersäure, konz.	10 Min.	+ + +	+ + +	o, gelb
Salzsäure, konz.	10 Min.	+ +	+ + +	o
Schwefelsäure, konz.	2—5 Min.	+ + +	+ + +	o
Phosphorsäure (H_3PO_4) konz.	10 Min.	+ + +	+ + +	o
Phosphorwolframsäure 20 g + 5 ccm H_2O	10 Min.	o	o	o
konz.	1 Std.	o	o	o
Salpetersäure 2 %	24 Std.	o (+?)	o	o
Salzsäure 2 %	24 Std.	o	o	o
Phosphorwolframsäure 2 %	24 Std.	o	o	o
Salpetersäure 2 %	30 Min. gekocht	+?	+ +	o
	1 Std. gekocht	+		
Salzsäure 2 %	30 Min. gekocht	+		
Kalilauge 1 %	14 Std.	+		
	24 Std.		+ + +[1]	o[1]
	38 Std.	+		
	3 Tage			o, +
	5 Min gekocht	+ + +		o
Ammoniak, konz.	2 Tage	+		
	3 Tage		+ + +, o	o
	5 Tage	+, + +		
Autolyse		+ + +, o	+ + +[2]	o[2]

bis jetzt weiß, ein amidiertes Polysaccharid, das nicht näher bekannt ist. Dabei ist natürlich die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß das ein Körper ist, der dem Glykogen nahe steht. Die Prüfung auf Glykogen aber hat zu keinem positiven Ergebnis geführt, was natürlich an und für sich noch kein Gegenbeweis ist.

Es gibt nun aber einen Unterschied zwischen Nukleo- und

[1]) Nach Němec (1910, S. 362). Zum Vergleich mit eingesetzt.

[2]) Nach Oes (1908).

Glykoproteiden, der zur Entscheidung der Frage beitragen könnte. Die ersteren enthalten bekanntlich Phosphor, die letzteren hingegen nicht. Der mikrochemische Nachweis des Phosphors liegt aber bis jetzt noch so im argen, daß damit nichts zu erreichen ist (man vergleiche die Zusammenstellung bei Zacharias, 1910, S. 103—124). Berücksichtigt man zu dem oben gesagten noch, daß nach Euler (1910, S. 188) bis jetzt über das Vorkommen der Glykoproteide im Pflanzenreich nur eine Angabe für die Knollen von Dioskorea vorliegt, so dürfte es doch so gut wie sicher sein, daß die Spirogyranukleolen in chemischer Hinsicht zu den Nukleoproteiden zu stellen sind.

Es ist also jedenfalls auch vom mikrochemischen Standpunkt aus die zuerst von Carnoy ausgesprochene und von Meunier experimentell gestützte Ansicht, daß bei Spirogyra der Nukleolus der Sitz des Chromatins sei, richtig. Damit ist auch die Übereinstimmung hergestellt mit den neueren morphologischen Arbeiten, die angeben, daß bei Spirogyra die Chromosomen aus dem Nukleolus entstehen.

Literaturverzeichnis.

Berghs, J., Le noyau et la cinèse chez le Spirogyra. La Cellule. 1906. **23**, 55.

Carnoy, La biologie cellulaire 1884 (war mir leider im Original nicht zugänglich).

Clautriau, G., Étude chimique du glycogène chez les champignons et les levures. Recueil d. l'Inst. bot., Univ. de Bruxelles. **1**, 201. Auch: Mémoires couronnés etc. de l'acad. r. de Belgique. 1895. **53**.

Cohnheim, O., 1904. Chemie der Eiweißkörper. 2. Aufl. Braunschweig. 1904.

Czapek, F., 1905. Biochemie der Pflanzen. Jena. 1905. **2**.

Errera, Leo, 1882. L'épiplasme des Ascomycètes et la Glycogène des végétaux. Recueil de l'Inst. bot., Univ. de Bruxelles. **1**, 1.

Euler, H., 1908. Grundlagen und Ergebnisse der Pflanzenchemie. 1. Teil. Braunschweig. 1908.

Fischer, A., 1899. Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas. Jena. 1899.

—, 1905. Die Zelle der Cyanophyceen. Bot. Zeitg. 1905. **63**, 51.

Heine, L., Die Mikrochemie der Mitose, zugleich eine Kritik mikrochemischer Methoden. Zeitschr. f. physiol. Chemie (Hoppe Seyler). 1895—1896. **21**, 494.

Mann, G., Physiological Histology. Oxford. 1902.

Martius, Mano, Th., Nucléole et Chromosomes dans le méristème radiculaire de Solanum tuberosum et Phaseolus vulgaris. La Cellule. 1905. **22**, 57.

Meunier, A., Le nucléole des Spirogyra. Ebenda. **3**, 333.

Meyer, A., 1904. Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie und Chemie des Volutins. Bot. Zeitg. 1904. **62**, 112.

Mitzkewitsch, Über die Kernteilung von Spirogyra. Flora. 1898. **85.**
Němec, B., 1909. Zur Mikrochemie der Chromosomen. Ber. d. d. bot. Ges. 1909. **27,** 43.
—, 1910. Das Problem der Befruchtungsvorgänge und andere zytologische Fragen. Berlin. 1910.
Oes, A., 1908. Über die Autolyse der Mitosen. Bot. Zeitg. 1908. **66,** 89ff. Taf. V.
—, 1909. Neue Mitteilungen über enzymatische Chromatolyse. Zeitschr. f. Bot. 1909. **2,** 39ff.
Richter, O., Die Fortschritte der botanischen Mikrochemie seit Zimmermanns »Botanischer Mikrotechnik« (Sammelreferat). Zeitschr. f. wiss. Mikrosk. 1905. **22,** 194.
Schwarz, F., Die morphologische und chemische Zusammensetzung des Protoplasmas. Beitr. z. Biol. d. Pflanz. 1892. **5,** 1.
Wager, H., The Nucleolus and Nuclear Division in the Root-apex of Phaseolus. Ann. of bot. 1904. **18,** 29.
Wisselingh, C. van, Über den Nukleolus von Spirogyra. Bot. Zeitg. 1898. **56,** 195.
Zacharias, E., 1881. Über die chemische Beschaffenheit des Zellkerns. Ebenda. 1881. **39,** 169.
—, 1882. Über den Zellkern. Ebenda. 1882. **40,** 611.
—, 1883. Über Eiweiß, Nuklein und Plastin. Ebenda. 1883. **41,** 209.
—, 1885. Über den Nukleolus. Ebenda. 1885. **43,** 257.
—, 1888. Erwiderung. Ebenda. 1888. **46,** 90.
—, 1893. Über die chemische Beschaffenheit von Cytoplasma und Zellkern. Ber. d. d. bot. Ges. 1893. **11,** 293.
—, 1893. Über Chromatophilie. Ebenda. 188.
—, 1896. Über einige mikrochemische Untersuchungsmethoden. Ebenda. 1896. **14,** 270.
—, 1898. Über Nachweis und Vorkommen von Nuklein. Ebenda. 1898. **16,** 185.
—, 1902. Über die achromatischen Bestandteile des Zellkerns. Ebenda. 1902. **20.**
—, 1910. Die chemische Beschaffenheit von Protoplasma und Zellkern. Progr. rei botanicae. 1910. **3,** 67—257.
Zimmermann, A., 1896. Die Morphologie und Physiologie des pflanzlichen Zellkerns. Jena. 1896.

Figurenerklärung.

Alle Fig. sind mit Zeiß Im. $^1/_{12}$ und Okul. 3 gezeichnet. Fixierung in allen Fällen mit absolutem Alkohol.

Fig. 1. Hyacinthus. Zelle mit Mitose aus einer unbehandelten Wurzelspitze. Färbung mit Hämalaun.

Fig. 2. Hyacinthus. Wurzelspitze 10 Min. in HNo_3 konz., nach dem Auswaschen gef. mit Hämatoxylin-Eisenalaun. In der rechten Zelle scharfe Chromosomennegative, in der linken ruhender Kern mit unveränderten Nukleolen.

Fig. 3. a) Hyacinthus. Unbehandelte Wurzelspitze. Zelle mit Kernknäuel. Hämalaun.

b) Der vorigen entsprechende Zelle, 10 Min. in HNo_3, Hämalaun. Der Knäuel ist gelöst, der Nukleolus erhalten.

Fig. 4. Spirogyra. Kern aus unbehandeltem Material. Hämatoxylin-Eisenalaun.

Fig. 5. Spirogyra. 10 Min. in HNo_3 konz. a, b, c, d, e verschiedene Formen der Kerne, überall die Nukleolen herausgelöst. Hämatoxylin-Eisenalaun.

Fig. 6. Hyacinthus. 10 Min. in H Cl konz. Hämalaun. a) Zellen mit Chromosomennegativen, b) Zelle mit ruhendem Kern, dessen Nukleolus unverändert ist.

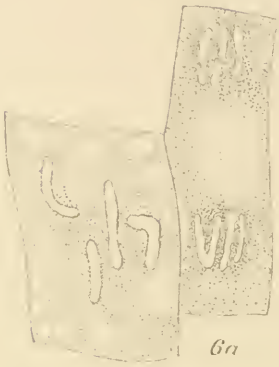
Fig. 7. Spirogyra. H Cl konz. 10 Min. Hämatoxylin-Eisenalaun. a) Nukleolus völlig gelöst, b) ein schwach gefärbter Nukleolarrest ist noch zurückgeblieben.

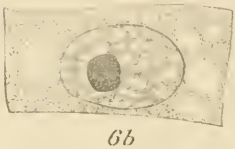
Fig. 8. Vicia Faba. Wurzelspitze. 10 Min. in Phosphorsäure ca. 83%. Hämalaun. Zelle mit typischen Chromosomennegativen.

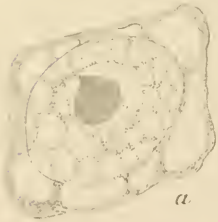
Fig. 9. Spirogyra. KOH 1% 5 Min. kochend. a) Kern mit völlig gelöstem Nukleolus, der Rand stärker gefärbt. b) Kern mit Gerinnsel in der Nukleolushöhle. Hämatoxylin-Eisenalaun.

Fig. 10. Vicia Faba. Wurzelspitze. 3 Tage in Ammoniak konz. Hämalaun. a) Zelle mit ruhendem Kern, dessen Nukleolus ungelöst ist. b) Zelle mit Chromosomennegativen.

Fig. 11. Spirogyra. Ammoniak konz. 5 Tage. Hämatoxylin-Eisenalaun. a) Kern mit völlig gelöstem Nukleolus. b) Kern mit teilweise gelöstem, vom Rande her vakuolisierten Nukleolus.







Fronde gez. E. Laue, Lith. Inst. Berlin

Verlag von Gustav Fischer in Jena

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Zeitschrift für Botanik

Jahr/Year: 1912

Band/Volume: 4

Autor(en)/Author(s): Tröndle Arthur

Artikel/Article: Der Nukleolus von Spirogyra und die Chromosomen höherer Pflanzen. 721-747