

tiva L.). Der Züchter 14, 201—213 (1942). — 13. BREDEMANN, G.: Untersuchungen über die Nährstoffaufnahme und den Nährstoffbedarf des Hanfes (*Cannabis sativa* L.). Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 36, 167—204 (1945). — 14. BREDEMANN, G.: Verdreifachung des Fasergehalts bei Hanf (*Cannabis sativa* L.) durch fortgesetzte Männchen- und Weibchen-Auslese. *Materiae vegetabilis*, Den Haag (im Druck). — 15. BREDEMANN, G., GARBER, K., HARTECK, P. und SUHR, KL.: Die Temperaturabhängigkeit der Lebensdauer von Blütenpollen. Die Naturwissenschaften 34, 279—280 (1947). — 16. ČAJLAHJAN, M.: Transport von Blühhormonen in verschiedenen Pflanzenteilen. I. Im Blatt. Ber. (Doklady) Akad. Wiss. UdSSR. N. F. 27, 160 bis 163 (1940); II. Transport im Sproß. Ebenda 253

bis 256; III. Transport in der Wurzel. Ebenda 374 bis 375; rf. Bot. Zbl. 34, 360 (1941). — 17. FLEISCHMANN, R.: Der Einfluß der Tageslänge auf den Entwicklungsrhythmus von Hanf und Ramie. Faserforschung 13, 93—99 (1938). — 18. HITZEMANN, W.: Untersuchungen auf „Haschisch“ bei verschiedenen Hanfsorten eigenen Anbaus in Deutschland. Arch. d. Pharmazie 279, 353 bis 387 (1941). — 19. HUHNKE, W., JORDAN, CHR., NEUER, H. und v. SENGBUSCH, R.: Grundlagen für die Züchtung eines monözischen Hanfes. Ztschr. f. Pflanzenzüchtung 29, 55—75 (1950). — 20. RUDORF, W.: Untersuchungen über den Einfluß veränderter Tageslängen auf Sorten von Sojabohnen und Buschbohnen. Z. Züchtg. A. Pflanzenzüchtung 20, 251—267 (1935).

(Aus dem botanischen Institut der Techn. Hochschule Darmstadt.)

Die Verwendung von Chloralhydrat oder Phenol zur Aufhellung und von Phenol-Balsam als Einschlußmittel für Essigkarminpräparate.

VON HANS ADOLF VON STOSCH.

Mit 6 Textabbildungen.

Das von BELLING und HEITZ vor etwa 30 Jahren wieder eingeführte Karminessigsäure-Verfahren hat sich in der Folgezeit zu einer der wichtigsten Methoden der Zytologie entwickelt. Das dürfte nicht nur in der Schnelligkeit der Arbeitsweise und der guten Erhaltung der Chromatinkonfigurationen, sondern vor allem in einigen für diese und weitere neuere Essigsäuremethoden spezifischen Vorteilen begründet sein. Der erste dieser entscheidenden Vorzüge gegenüber Schnittpreparaten ist das Ausbleiben merklicher Schrumpfungen des Zellinhaltes, so daß beträchtliche Gewinne an Größe und damit optischer Auflösbarkeit der zu beobachteten Strukturen erzielt werden; ein anderer die Erhaltung der höheren Brechkraft der Thymonukleinsäure-beladenen Kernteile, die ebenfalls eine Verdeutlichung bedeutet. Weiter handelt es sich um eine genügend kontrastreich arbeitende progressive Färbung, die gegenüber regressiven Methoden (Eisenhämatoxilin!) die Gefahr, wichtige Details wegzudifferenzieren, nicht enthält, und die dazu Chromatin- und Nukleolen-Material zu unterscheiden vermag. Schließlich besteht die Möglichkeit, unübersichtliche Stadien durch Ausquetschen in eine Ebene zu bringen und damit zu entwirren. Diesen Vorteilen steht in manchen Fällen ein hier interessierender Mangel entgegen: Stark lichtbrechende oder absorbierende Einschlüsse der Zelle, also Reservestoffe, Ungleichmäßigkeiten des fixierten Plasmas oder Assimilationspigmente können in einem Medium von so geringem Brechungsindex, wie es 45proz. Essigsäure darstellt, erheblich stören, oder kräftig ausgebildete Membranstrukturen den Einblick in die Zelle selbst erschweren. Der Ausweg, hochbrechende Untersuchungsmedien zu benutzen, wurde bisher meist im Sinne der Verwendung von Harzen, also der Herstellung von Dauerpräparaten, beschritten. Das ist aber ziemlich zeitraubend und daher, wenn sofortige Untersuchung notwendig, nicht zugänglich, hebt auch einige der Vorzüge der Essigsäuremethoden mehr oder weniger auf; die Schwierigkeit, nach ihrer Anwendung gute Dauerpräparate zu erhalten, ist ja bekannt.

Wir suchten daher schon vor Jahren nach Methoden, die schnell zu Dauerpräparat-ähnlichen Eigenschaften von Karminessigsäure-gefärbtem Material führen, d. h.

nach Medien mit der Fähigkeit, auf optischem und chemischem Wege aufzuhellen, ohne Schrumpfungen zu bewirken und ohne möglichst die hohe Eigenbrechung des Chromatins zum Verschwinden zu bringen. Die Lösung lag in der Anwendung zweier altbekannter Untersuchungsmittel wäßriger Chloralhydratlösung und der „Karbolsäure“. Die letztere bietet, wie sich später herausstellte, außerdem die Möglichkeit, auf einfachstem Wege das quasi-Dauerpräparat in ein wirkliches zu verwandeln. Da sich uns die beiden Methoden seit längerem gut bewährten und nun in einem speziellen Fall, beim Studium der Zytologie der Sexualprozesse zentrischer Meeresdiatomeen (v. STOSCH 1951) ziemlich unentbehrlich waren, seien sie im folgenden beschrieben. Aus der Literatur wurden sie uns nicht bekannt.

Fixierung und Färbung.

Die Fixierung und Färbung der Objekte findet in der üblichen, etwa bei GEITLER oder LA COUR (1947) dargestellten Weise statt. Also Einlegen in Karminessigsäure (KE) direkt oder nach vorheriger Fixierung im Alkohol-Eisessig. Im letzten Falle kann Hydrolyse mit Säuren zur Entfernung störender Ribonukleinsäure folgen. Färben in KE oder Eisenkarminessigsäure (EKE), kalt oder heiß.

Um einige konkrete Arbeitsvorschriften zu geben, werden unten Beispiele der Anwendung unserer Methode illustriert und in der Legende der Abbildungen näher erläutert. Wenn dabei z. T. Objekte Verwendung finden, die dem Leser dieser Zeitschrift ferner stehen mögen, so kennzeichnen sie doch die Anpassungsfähigkeit, besonders des Phenolverfahrens, am besten.

Die Chloralhydrat-Methode.

Ältere Chloralhydrat-Lösungen reagieren durch teilweise Oxydation zu Trichloressigsäure so stark sauer (Dissoziationskonstante der letzteren $2 \cdot 10^{-1}$, von Essigsäure $1,76 \cdot 10^{-5}$), daß Karminessigsäure-Material durch sie momentan entfärbt wird. Neutralisiert man aber, so kann die Lösung zum Aufhellen der Präparate verwendet werden. „Neutrales Chloralhydrat“: Zu 50 ccm wäßriger Chloralhydratlösung (etwa 4:1) wird eine Messerspitze von Calcium carbonicum präcipi-

tatum gegeben, darauf kräftig durchgeschüttelt. Nach einigen Tagen hat sich das überschüssige Karbonat als ziemlich festliegender Bodensatz abgelagert. Die überstehende neutrale Lösung wird über dem Satz belassen und kann laufend entnommen werden. Ihre Verwendung ist indiziert, wenn zur Verdeutlichung oder Sichtbarmachung gefärbter Kerne Chlorophyll oder Stärke — nicht aber Fette — entfernt oder störende Struktur optisch ausgeschaltet werden soll. Insbesondere kann also auch frisches, sogar grünes Material direkt in KE eingelegt und nachher aufgehellt werden. Man wird den in KE unter dem Deckglas liegenden Objekten von der einen Seite einen Tropfen der neutralisierten Chloralhydratlösung zusetzen und die Farbe von der anderen absaugen. Unter Umständen kann auch der schnelleren Verdunstung der Essigsäure das Nachziehen des Aufhellungsmittels überlassen werden. Man beobachtet Lösen des Blattgrüns, Verquellen der Stärke und Verschwinden von Plasma und Membranstrukturen; die Kerne treten scharf hervor. Dabei wirkt das eingesaugte Medium gleichzeitig etwas differenzierend, überschüssige Farbe geht also in Lösung. Nur wenn man die KE nicht absaugt,

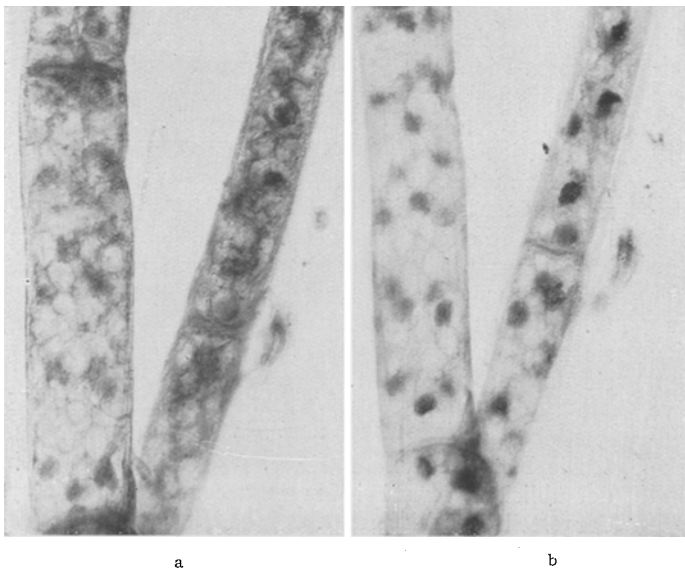


Abb. 1. Lebende Fäden von *Rhizoclonium* sp. in EKE eingebracht und nach der Kochmethode behandelt (a), die Reste der Plastiden verdecken durch Färbung und Struktur die Kerne. (b) zeigt die gleichen Fäden in neutralisierter Chloralhydratlösung.

sondern die Essigsäure, wie erwähnt wurde, verdunsten läßt, bekommt man an den freien Deckgläserändern starke Farbflocken, die aber häufig an diesen Stellen nicht schaden. Die Färbung schlägt in einen tieferen Ton um, bei KE ohne Eisen von rot nach blaviolett. Schrumpfungen treten nicht ein, eher quellen Plasma und Kernstrukturen etwas, allerdings kann das Aufquellen reichlich vorhandener Stärkekörner die Kerne in unzulässiger Weise deformieren; in diesem Fall wird man Phenol als Intermedium vorziehen. Das Chromatin der Ruhekerne und Chromosomen zeigt deutlich höhere Eigenbrechung als die Umgebung, bekanntlich treten auch ungefärbte Kerne in Chloralhydrat gut hervor. Abb. 1 demonstriert die Wirkung der Chloralhydratlösung auf direkt in Karminessigsäure gefärbte Fäden einer Grünalge.

Die Chloralhydratpräparate sind einige Tage haltbar. Umwandlung in Dauerpräparate kann, da die

Hauptschwierigkeit, die Entfernung des überschüssigen Karmins, überwunden ist, leicht geschehen. Am einfachsten wird man das Deckglas mit einer Drahtklammer aufklemmen und das ganze Präparat auf 24—48 Stunden in Alkohol stellen. Danach wird das Deckglas allseitig mit Euparal oder Venezianischem Terpentin umrandet. Die Klammer sollte erst nach dem Trocknen des Balsams entfernt werden. Das Harz dringt allmählich durch Diffusion ein, während der Alkohol auf dem gegenläufigen Wege verschwindet. Nach einigen Tagen kann man im Thermostaten nachtrocknen. Auf diese Weise wird für einen schonenden Wechsel der Medien im Präparat gesorgt und die gegenseitige Lage der Zellen ungestört erhalten. Für Dauerpräparate ist jedoch die sogleich zu schildernde Phenol-Methode wesentlich geeigneter.

Es dürfte zweckmäßig sein, die Herstellung der erwähnten Drahtklammern, die bei vielen mikrotechnischen Arbeiten zu verwenden sind, zu schildern:



Abb. 2. Drahtklammer zum Andrücken des Deckglases (nat. Größe). Der Ring kommt unter den Objektträger, das Häkchen auf das Deckglas.

Federnder, nicht rostender Stahldraht¹ von 0,5 mm, oder, wenn stärkerer Druck ausgeübt werden soll, 0,7 mm Dicke, wird nach Abb. 2 gebogen. Werkzeug: Rundzange und Seitenschneider.

Die Phenol-Methode.

Wesentlich vielseitiger und meist auch schonender ist die Aufhellung in Phenol, das durch Zusatz von etwa 15% Wasser verflüssigt wurde, der Karbolsäure der älteren Mikrotechnik. Diese hat einen höheren Brechungsindex als Chloralhydrat, steht in dieser Eigenschaft etwa dem Kanadabalsam nahe und mischt sich mit 45proz. Essigsäure in jedem Verhältnis. Allerdings kann KE nicht direkt mit Phenol verdrängt werden, da Farbniederschläge auftreten. Daher muß — ein gewisser Nachteil gegenüber der eben geschilderten Methode — das Präparat nach dem Färben in 45proz. Essigsäure ausgewaschen werden, ehe Phenol durchgesaugt werden kann. Dazu wird an das Deckglas des in Essigsäure liegenden Präparats ein Tropfen der Flüssigkeit gegeben und die Essigsäure abgesaugt. Muß man in besonderen Fällen schonender vorgehen, so kann man auch auf das natürliche Abdunsten der Essigsäure warten. Da das Phenol schwerer, aber noch merklich flüchtig ist, wird auch auf diese Weise die Essigsäure nach und nach völlig aus dem Präparat verdrängt, wenn der Phenoltropfen nur hin und wieder erneuert wird. Allerdings wirkt Phenol, besonders auf Zellmaterial, das in Karmin ohne Eisen und das kalt gefärbt wurde, stark, oft zu stark differenzierend. Man muß gegebenenfalls entsprechend kräftiger färben oder statt mit 45proz. Essigsäure mit Mischungen von Phenol und 45proz. — oder auch höher konzentrierter — Essigsäure (1:1, 3:1 u. ä. Gemische) auswaschen und diese nachher durch reines Phenol ersetzen. Etwas länger, besonders in EKE, erhitztes Material wird nicht übermäßig ausgezogen. Natürlich kann der Medienwechsel auch durch einfaches Übertragen der

¹ Bezugsquelle: Handlungen für zahnärztlichen Bedarf.

Objekte in Salznäpfchen oder auf der Zentrifuge gesehen.

Phenolpräparate sind optisch kaum von Dauerpräparaten zu unterscheiden. Farbstoffe und Fette werden gelöst, Brechungssprünge an der Grenze von Plasma- und Membranstrukturen optisch weitgehend ausgeschaltet. Die Brillanz der Färbung ist daher ausgezeichnet, auch die Eigenbrechung des Chromatins bleibt deutlich. Schrumpfungen durch Entquellung treten nur in sehr geringem Maße auf; Kollabieren von Membranen kommt allenfalls bei sehr zartem Material vor, läßt sich aber durch vorsichtiges Arbeiten z. B. auch bei *Spirogyra* vermeiden. Einen besonderen Vorteil sehen wir in der Schnelligkeit der ganzen Prozedur,

die sich von frischem Material aus oft in wenigen Minuten abwickeln läßt. Die Präparate halten sich in Karbolsäure beliebig lange, wenn das verdunstende Medium von Zeit zu Zeit ersetzt oder eine entsprechende (Phenol-) Feuchte Kammer verwendet wird.

Von besonderer Wichtigkeit ist nun eine — zunächst überraschende — Eigenschaft von Phenol, die sich zur Herstellung von Dauerpräparaten ausnützen läßt. Die wasserfreie, kristallisierte Substanz kann mit trockenen Harzen zusammengeschmolzen werden und gibt dann zähflüssige, stabile Balsame. Wir benützen vor allem Phenol-Caedax und Phenol-Kanadabalsam, aber auch die Mischungen mit Rhenohistol¹ und Koniferenbalsam (Merck) lassen sich verwenden, wurden nur zufällig weniger erprobt. Man schmilzt 3—4 Gewichtsteile der trockenen Harze mit 1 Teil kristallisiertem Phenol bei etwa 70° zusammen. Dabei ist die Dauer der Wärmebehandlung möglichst niedrig zu halten und die Durchmischung durch kräftiges und häufiges Rühren zu erreichen; besonders die natürlichen Harze geben sonst leicht sehr dunkle, (aber noch brauchbare) Balsame. Caedax muß entweder trocken bezogen² oder das handelsübliche in Xylol gelöste Kunstharz einige Tage in einer flachen Metallschachtel in niedriger Schicht bei 60—70° getrocknet werden. Phenol-Caedax gibt gelegentlich — auch in Präparaten — Kristallausscheidungen, die aber durch leichtes Erwärmen zu beseitigen sind.

Die Herstellung von Dauerpräparaten geschieht in sehr einfacher Weise durch Umranden des unter dem Deckglas in Phenol liegenden Materials mit der Phenol-Harz-Mischung³. Das kann bei empfindlichen Objekten allseitig erfolgen; meist aber wird man an zwei oder drei Seiten des Deckglases einen Strich Harz anbringen und das Phenol an den freien Kanten verdunsten lassen, der Balsam wird dann nachgesaugt.

¹ Den Rheinpreußen-Werken in Homberg/Niederrhein möchte ich für die freundliche Überlassung einer Probe des Harzes meinen Dank sagen.

² Der serobakteriologischen Abteilung der Bayer-Werke, Leverkusen sei für die bereitwillige Herstellung des trockenen Harzes vielmals gedankt.

³ Ähnlich mit Phenol angesetzten Balsam verwenden FAIRCHILD und HERBIG sowie COLLESS zum Einschließen von Insekten.

Der Wassergehalt des verflüssigten Phenols stört nicht! Das Trocknen der gewonnenen Dauerpräparate geht bei Zimmertemperatur langsam vor sich, es kann aber nach einigen Tagen im Paraffinschrank zu Ende geführt werden. Die Präparate sind, soweit unsere Erfahrungen

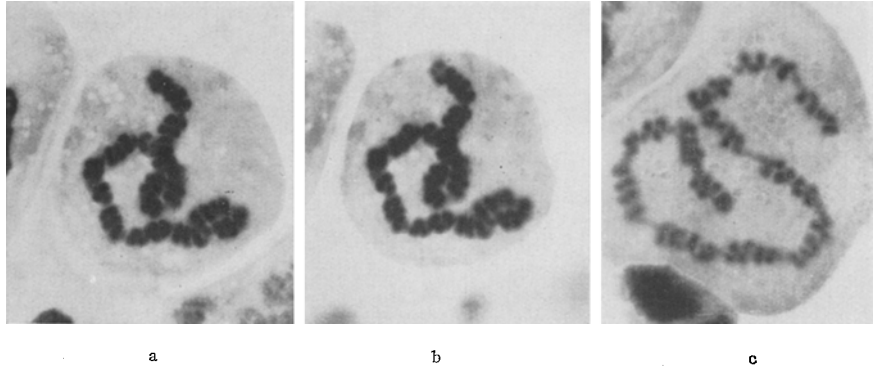


Abb. 3. Spiralstruktur an Diakineseschromosomen von *Rhoeo discolor* (Ringbindung!). Die ausgedrückten PMZ wurden zum Entspiralisieren 4 Minuten mit Leitungswasser behandelt, das Wasser abgesaugt, EKE zugesetzt, nach einigen Minuten Deckglas; erwärmt und dann gequetscht. a: in der Farbe; b: in Phenol; c: (andere Zelle des gleichen Präparats) in Phenol-Caedax.

reichen, haltbar. Doch ist darauf hinzuweisen, daß die Behandlung mit Phenol ein Präparat nicht notwendig verbessert. Wenn auch in KE ohne Störungen beobachtet werden kann, werden in ihr meist die besten Bilder erhalten. Nur in den oben charakterisierten Fällen ist die Phenolaufhellung im allgemeinen von Nutzen. Eine spezifisch die Präparate verbessernde Wirkung besteht also nicht. In Phenolbalsam liegende Dauerpräparate unterscheiden sich wohl auch nicht grundsätzlich von mit anderen Methoden hergestellten, stellen also wie diese meist die für die Untersuchung ungünstigste Stufe der Präparation dar, doch sind sie mindestens nicht schlechter und vielfach leichter und schneller anzufertigen.

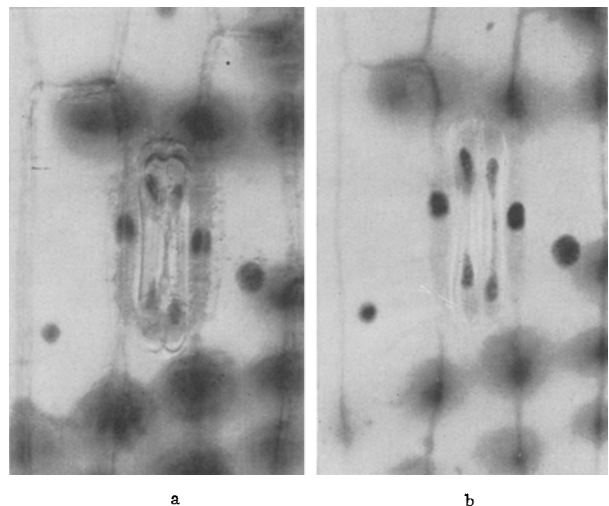


Abb. 4. *Poa pratensis*, Hantelkerne in den Schließzellen der Spalten. Ganzes Blatt in Alkoholeisessig fixiert, Handschnitte in EKE erwärmt; a: in Essigsäure; b: gleiche Stelle in Phenol.

Daher wurde die Phenol-Methode von uns in vielen Fällen auch da angewendet, wo aus KE-Material lediglich Dauerpräparate angefertigt werden sollten, das Stadium des in Phenol liegenden „quasi-Dauerpräparats“, also nicht von besonderem Interesse war. So lassen sich auch Quetschpräparate in Phenolbalsam einschließen, wenn man dafür sorgt, daß das Deckglas durch eine entsprechend starke Klammer angepreßt

bleibt. An derart dünnen Präparaten ist der Wechsel der Flüssigkeiten ziemlich zeitraubend, doch läßt er sich durch festes Anlegen der gerade geschnittenen und beschwerten Kanten eines Streifens dicken Löschpapiers an die „Saugseite“ des Deckglases automatisieren. So wurden für Kurszwecke Dauerpräparate z. B. von Pachytänchromosomen der Pollenmutterzellen vom

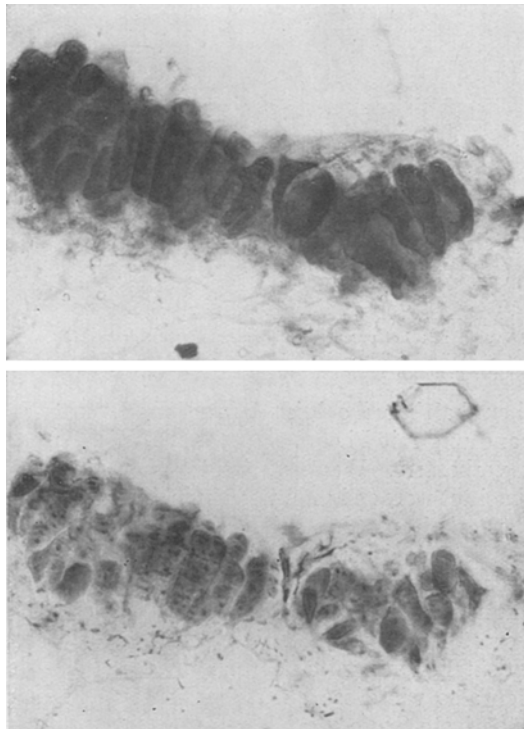


Abb. 5. Teleutolager von *Coleosporium tusilaginis* auf der Unterseite von Huflattichblättern. Handschnitte aus frischem Material in EKE erwärmt und in Essigsäure ausgewaschen (a), die Sporen enthalten massenhaft gelbes, störendes Öl; b: in Phenol, man beachte die vorher unsichtbaren Paarkerne im basalen Hyphengeflecht.

Mais in größerer Menge und genügend rationell hergestellt. Ein Beispiel dieser Anwendung der Phenol-Methode illustriert Abb. 3. Es zeigt, daß es möglich ist, auf diesem Wege brauchbare Dauerpräparate zu erhalten, und daß sich Schrumpfungen kaum bemerkbar machen. Unsere weiteren Abbildungen demonstrieren die Methode in Fällen, in denen die aufhellende Wirkung des Phenols deutlich wird, nämlich bei störenden Membranstrukturen (Abb. 4), starkem Fettgehalt (Abb. 5) und an plasmareichen Zellen, bei denen übrigens das schwächer brechende Euparal schon recht ungünstig ist (Abb. 6).

Schließlich soll kurz auf die Verwendbarkeit der Phenol-Methode nach anderen Färbungen eingegangen

werden. Auf Orzein-Essigsäure (LA COUR 1942) folgend ist sie nicht zu brauchen. Der Farbstoff wird sehr schnell ausgezogen, Lakmoid (DARLINGTON und LA COUR) wurde nicht geprüft, da eine geeignete Farbstoffprobe fehlte. Nach Feulgen-Färbung kann sie zur Aufhellung benutzt werden, doch beobachteten wir bei Einschluß in Phenol-Caedax manchmal ein Ausbleichen, so daß die Methode in diesem Falle nicht ohne erneute Prüfung empfohlen werden kann. Dagegen scheinen Hämatoxilin-Präparate (Hämalaun und Eisenhämatoxilin nach HANSEN) in Phenolbalsam haltbar zu sein (bisher 1½ Jahre bzw. 2½ Jahre). Die Überführung geschah aus 70proz. Alkohol in Phenol, dann wurde mit Phenolbalsam umrandet.

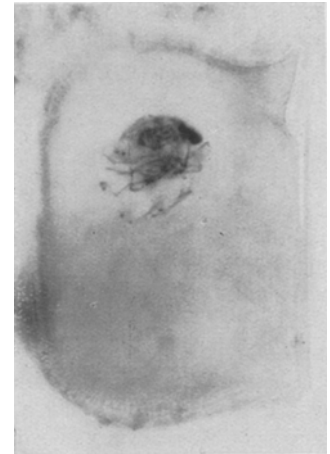


Abb. 6. Spätes Leptotän der Meiosis in der Auxosporen-mutterzelle der zentrischen Diatomee *Biddulphia rhombus*. Alkohol-Eisessig, dann EKE heiß; auf der Zentrifuge in 45proz. Essigsäure, dann in Phenol überführt. In diesem aufbewahrt und einige Wochen später zu Präparaten verarbeitet, die mit Phenol-Kanadabalsam umrandet wurden. Das Dauerpräparat ist 1½ Jahre alt.

Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, daß Karminessigsäurefärbungen in vielen Fällen mit Vorteil in neutralisiertem Chloralhydrat oder in verflüssigtem Phenol aufgehellt werden können. Die in Phenol liegenden Präparate lassen sich durch Umrandung mit Phenol-Harz-Mischungen in einfacher Weise dauerhaft machen.

Literatur.

1. BELLING, J.: On counting chromosomes in pollen mother cells. *Americ. Natural.* **55** (1921).
2. COLLESS, D. H.: An improved method for mounting mosquito larvae. *Nature* **166**, S. 486 (1950).
3. DARLINGTON, C. D. und L. F. LA COUR: The handling of chromosomes. London 1950 (Dritter Druck, zweite Aufl.).
4. FAIRCHILD, G. B. und M. HERBIG: An improved method for mounting small insects. *Science* **108**, S. 20 (1948).
5. GEITLER, L.: Schnellmethoden der Kern- und Chromosomenuntersuchung. Wien 1949.
6. HEITZ, E.: Beitrag zur Cytologie von Melandrium. *Planta* **1**, S. 241 (1925).
7. LA COUR, L. F.: Acetic orcein. *Stain Techn.* **16**, S. 73 (1942); Improvements in plant cytological technique II. *Botanic. Rev.* **13**, S. 216 (1947).
8. STOSCH, H. A. v.: Zur Entwicklungsgeschichte zentrischer Meeresdiatomeen. *Naturwiss.* **38**, S. 191 (1951).