



LUND UNIVERSITY

Zur Physiologie des Pflanzlichen Zellkernes

Lidforss, Bengt

Published in:
Lunds Universitets årsskrift

1897

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):
Lidforss, B. (1897). Zur Physiologie des Pflanzlichen Zellkernes. *Lunds Universitets årsskrift*, 33(Afd 2), 1-29.

Total number of authors:
1

General rights

Unless other specific re-use rights are stated the following general rights apply:
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Read more about Creative commons licenses: <https://creativecommons.org/licenses/>

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

LUND UNIVERSITY

PO Box 117
221 00 Lund
+46 46-222 00 00

ZUR PHYSIOLOGIE DES PFLANZLICHEN ZELLKERNES

VON

BENGT LIDFORSS.

- I. ÜBER DAS SICHELSTADIUM DES NUCLEOLUS.
- II. ÜBER DIE CHROMATOPHILIE DER SEXUALKERNE.

LUND 1897.

E. MALMSTRÖMS BUCHDRUCKEREI

Über das Sichelstadium des Nucleolus.

Schon HOFMEISTER, dem wir eine grundlegende Untersuchung ¹⁾ über die Entwicklung des Pollens verdanken, war es aufgefallen, dass in den Pollenmutterzellen von *Tradescantia* die Nucleolen auf gewissen Entwicklungsstufen die kreisrunde Form verlieren und als länglich runde Massen eines sehr dichten Schleimes erscheinen. Derartige Nucleolen sind dann später von TANGL ²⁾ bei den Pollenmutterzellen von *Hemerocallis fulva* aufgefunden worden. Ausser dem fast konstanten Vorkommen von Vacuolen konstatierte TANGEL bei den betreffenden Nucleolen noch eine zweite Eigenthümlichkeit, in sofern als sie im Gegensatz zu ihrem früheren Verhalten nicht mehr mit Methylgrün zu tingiren waren ³⁾. TANGEL findet dies Verhalten der Nucleolen um so auffälliger, als sie die Fähigkeit, sich mit Carmin zu färben, in diesem Stadium nicht verloren haben.

Fast gleichzeitig mit TANGEL hat STRASBURGER seine Aufmerksamkeit auf die fraglichen Körperchen gelenkt ⁴⁾. Der Umstand, dass die von TANGEL als Nucleolen aufgefassten Gebilde sich in tinctioneller Hinsicht anders als gewöhnliche Nucleolen verhalten, ferner die Entwicklungsgeschichte der betreffenden Körperchen bestimmten STRASBURGER für die Ansicht, dass es sich hier überhaupt nicht um Nucleolen handelte, sondern dass die fraglichen Gebilde einen bis dahin überschenen Bestandtheil des Kerns der Pollenmutterzellen repräsentirten, für welchen STRASBURGER den Namen Secretkörperchen einführt ⁵⁾. Es stellte sich heraus, dass derartige Secretkörperchen nicht nur bei den untersuchten Monocotylen, sondern auch bei den Dikotylen, den Gymnospermen und den Pteridophyten (*Equisetum*) nachge-

¹⁾ HOFMEISTER, Über die Entwicklung des Pollens, *Botan. Zeit* 1848 Sp. 425.

²⁾ TANGEL, Die Kern- und Zelltheilungen bei der Bildung des Pollens von *Hemerocallis fulva*, *Denkschriften d. kaiserl. Ak. d. Wissensch. Mathem. naturw. Classe.* Bd. 45. Abth II, pag. 65.

³⁾ l. c. pag. 67.

⁴⁾ STRASBURGER, Ueber den Theilungsvorgang der Zellkerne und das Verhältniss der Kerntheilung, *Arch. f. mikroskop. Anatomie*, Bd XXI, pag. 476—590.

⁵⁾ l. c. pag. 482.

wiesen werden konnten¹⁾. Bei den Equiseten waren sie in den Sporenmutterzellen zu sehen, bei den Samenpflanzen dagegen ausschliesslich in den Pollenmutterzellen. Der Umstand, dass in den sich zur Theilung anschickenden Pollenmutterzellen das Secretkörperchen angeblich in's Cytoplasma hinausgestossen wird, giebt STRASBURGER Veranlassung, die Frage aufzuwerfen, ob nicht das Secretkörperchen mit denjenigen Aussonderungen, die mit dem Reifender Geschlechtsprodukte verbunden sind, äquivalent wäre²⁾, ohne jedoch in diesem zu einer bestimmten Ansicht zu gelangen.

Zwei Jahre später hat STRASBURGER wieder dem Secretkörperchen seine Aufmerksamkeit gewidmet³⁾. Er giebt jetzt zu, dass das Secretkörperchen doch möglicherweise in irgend einem Verhältniss zur Nucleolarsubstanz stehe, allein da die betreffenden Gebilde durch die Zeit ihrer Bildung, den Ort ihres Auftretens und zum Theil auch durch ihre Reactionen von den gewöhnlichen Nucleolen abweichen, werden sie als Gebilde *sui generis* aufgeführt und mit dem Namen Nebenkernkörperchen, Paranucleolus belegt⁴⁾.

Die Richtigkeit der STRASBURGERSCHEN Auffassung wurde indessen bald von verschiedenen Seiten bestritten. So behauptete GUIGNARD⁵⁾, gestützt auf die Reactionen und das sonstige Verhalten des Paranucleolus, dass derselbe nichts anderes sei, als das in Auflösung begriffene Kernkörperchen. Zu derselben Ansicht gelangte auch ZACHARIAS⁶⁾, der in überzeugender Weise die nucleolare Natur der als Secretkörperchen und Paranucleolus aufgeführten Gebilde nachwies. Die von STRASBURGER beobachtete Ausstossung des Paranucleolus in's Cytoplasma ist nach ZACHARIAS darauf zurückzuführen, dass bei der Fixirung oft ein Platzen des Zellkerns stattfindet, wobei der Nucleolus und der übrige Inhalt ausgeschleudert wird⁷⁾.

In der That hat STRASBURGER auch später seine Ansicht über die spezifische Natur des Paranucleolus fallen lassen und denselben als echten Nucleolus anerkannt⁸⁾. Unbeantastet blieb dagegen die von ihm, TANGL und HOFMEISTER konstatierte Thatsache, dass allgemein in den Pollenmutterzellen die Nucleolen auf gewissen Entwicklungsstufen an die Peripherie des Kernes rücken und sich hier als linsförmige Massen dicht an der Kernwandung ausbreiten. Diese Erscheinung erhielt ein ganz neues Interesse, als von ZIMMERMANN⁹⁾ die Entdeckung gemacht wurde, dass sich auch in den weiblichen Sexualanlagen und zwar zu ganz entsprechender Zeit analoge Vorgänge abspielen. In dem primären Embryosackkern

¹⁾ l. c. pag. 501—504.

²⁾ l. c. pag. 506.

³⁾ STRASBURGER Die Kontroversen der indirekten Kerntheilung, Arch. f. mikroskopische Anatomie, Bd XXIII pag. 246—305.

⁴⁾ Die Kontrov. d. indir. Theil. pag. 270.

⁵⁾ GUIGNARD, Recherches sur la structure et la division du noyau cellulaire chez les végétaux. Ann. des scienc. nat. Bot. Sér. 6. T. XVII N:o 1, pag.

⁶⁾ ZACHARIAS, Über den Nucleolus, Botanische Zeit. 1885.

⁷⁾ Über den Nucleolus, Bot. Ztg. 1885 Sp. 262 und Sp. 282.

⁸⁾ Histologische Beiträge, Heft 1, pag. 88.

⁹⁾ ZIMMERMANN, Über das Verhalten der Nucleolen während der Karyokinese (Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle, Bd II, Heft 1.)

rückt nämlich, unmittelbar vor der ersten Theilung, der Nucleolus an die Peripherie des Kernes, wo er als lins- oder vielmehr calottenförmiger Körper eine Zeit lang liegen bleibt. Von ZIMMERMANN wurde darauf hingewiesen¹⁾, dass sich dieser Vorgang, der in ganz analoger Weise in den männlichen und den weiblichen Sexualanlagen verläuft, gerade zu der Zeit abspielt, wo nach den Untersuchungen von OVERTON²⁾ und GUIGNARD³⁾ die Reduktion der Chromosomen stattfindet. Von ZIMMERMANN wird daher die Vermuthung ausgesprochen, dass diesem Vorgange irgend welche tiefere Bedeutung zukomme, ohne dass es doch gegenwärtig möglich wäre, diese Bedeutung genau anzugeben⁴⁾. Da die Nucleolen in diesem Stadium auf dem Querschnitte eine gewisse Ähnlichkeit mit einer Mondsichel besitzen, wird dasselbe von ZIMMERMANN als Sichelstadium bezeichnet⁵⁾.

Die Berechtigung der soeben referirten Ausführungen von ZIMMERMANN sind von STRASBURGER und seinen Schülern energisch bestritten worden. Ein Paar Monate nach der Veröffentlichung der ZIMMERMANN'SCHEN Arbeit erschien aus dem Bonner Institute eine vorläufige Mittheilung «Über Nucleolen und Centrosomen», deren Autor, H. J. HUMPHREY⁶⁾, die von ZIMMERMANN beschriebenen sichelförmigen Gebilde einfach auf durch ungenügende Fixirung erzeugte Kunstprodukte zurückführen will. HUMPHREY gründet diese Auffassung darauf, dass an Alkoholmaterial von *Ceratozonia* sowohl die Kerne der Antherenwandung wie die des sporogenen Gewebes derartige Substanzansammlungen aufzeigten, und zwar fanden sich die sichelförmigen Körperchen immer auf der von der Oberfläche des Pollenfaches abgewandten Seite, der Richtung entsprechend, in welcher die fixirende Flüssigkeit vordrang. Die an der Kernwandung angesammelte Substanz soll sich nach HUMPHREY gegen Tinctionsmitteln anders als Nucleolarsubstanz verhalten, in dem sie mit Fuchsinjodgrün einen rothvioletten Farbenton annimmt. Aus diesen Umständen schliesst Humphrey, dass die fraglichen Substanzansammlungen, die mit den Sichelkörperchen ZIMMERMANN'S identisch sein sollen, nicht aus Nucleolarsubstanz bestehen, sondern dass hier ein durch schlechte Fixirung entstandenes Gemisch von Chromatin und Nucleolarsubstanz vorliege⁷⁾.

Der HUMPHREYSCHEN Mittheilung folgte dann bald eine Arbeit von STRASBURGER selbst⁸⁾, worin der Autor zu verschiedenen Tagesfragen der Zellkernforschung Stellung nimmt. In Bezug auf das sogenannte Sichelstadium des Nucleolus behauptet

¹⁾ l. c.

²⁾ On the reduction of the Chromosomes in the Nuclei of Plants (Annals of Botany, 1893, Vol. VII N:o 25).

³⁾ Nouvelles études sur la fécondation (Annales d. sc. nat. Bot. Sér. 7. T. 14, p. 163.

⁴⁾ l. c. p. 8.

⁵⁾ l. c. p. 9.

⁶⁾ H. J. HUMPHREY, Über Nucleolen und Centrosomen, Berichte der deutsch. botanischen Gesellsch. 1884, p. 108.

⁷⁾ l. c. pag. 112.

⁸⁾ Karyokinetische Probleme, Jahrbücher für wissenschaftl. Botanik, BdXXVIII, Heft 1, p. 151.

tet STRASBURGER¹⁾, dass auf diesem Gebiete verschiedene Erscheinungen nicht hinlänglich aus einander gehalten wurden, und dass sich aus diesem Umstande der Widerspruch der Angaben zum Theil erklärt. Einerseits soll es nämlich in den Pollenmutterzellen zur Zeit der Prophasen gar nicht selten vorkommen, dass unter dem Einfluss des Fixierungsmittels der Nucleolus gegen die Wandung getrieben wird, sich an derselben abflacht und dann mehr oder weniger sichelförmig erscheint. Dasselbe geschah nach STRASBURGER in den von ZIMMERMANN beobachteten Embryosackkernen; der durch das Fixierungsmittel erzeugte Druck soll unter Umständen so stark werden können, dass ein Theil oder die gesammte Substanz des Nucleolus nach aussen gepresst wird. Dies erklärt nach STRASBURGER, warum der Nucleolus in solchen Präparaten als ganz schmale Sichel sich zeigen, in manchen Kernen auch ganz fehlen kann. — Andererseits findet man oft — ich referire fortwährend die Ausführungen von STRASBURGER — Substanzansammlungen, die durch ihre konstante Lage zu der Richtung, in welcher die fixirende Flüssigkeit vordrang, sich als durch ungenügende Fixirung entstandene Artefacte kundgeben. Solche sichelförmigen Substanzansammlungen findet man nach STRASBURGER nicht nur in den Pollenmutterzellen, sondern auch in den jugendlichen Geweben der Antherenwandung und in anderen jungen Geweben, deren Kerne gegen Reagentien besonders empfindlich sind. Die grosse Empfindlichkeit dieser Kerne soll durch den Chromatinreichtum ihres Kernsaftes bedingt sein; hieraus soll sich auch die tinctionellen Eigenthümlichkeiten der sichelförmigen Körperchen erklären.

In einer späteren Abhandlung²⁾ hat HUMPHREY seine frühere Ansicht dahin modificirt, dass die sichelförmigen Gebilde wohl ausschliesslich aus Nucleolarsubstanz bestehen, dass sie aber ihre Form und Lage einer ungleichmässigen Fixirung verdanken. In gut fixirtem Material von verschiedenen Pflanzen konnte HUMPHREY niemals derartige Gebilde auffinden, demgemäss werden sie von HUMPHREY als Kunstproducte ohne jede Bedeutung betrachtet³⁾.

Im Frühjahr 1895 unternahm ich, auf den Vorschlag des Herrn Prof. Zimmermann, eine Untersuchung über den primären Embryosackkern mit besonderer rücksicht auf das Sichelstadium des Nucleolus, das bei den weiblichen Sexualanlagen von ZIMMERMANN nur bei *Lilium Martagon* beobachtet war. Es gelang mir bald, das typische Sichelstadium bei einigen Liliaceen nachzuweisen, und zwar unter solchen Umständen, dass mir der Verdacht auf Artefacte irgend welcher Art völlig ausgeschlossen schien. Indessen wurde die Untersuchung durch andere Arbeiten unterbrochen und erst in diesem Jahre (1897) wieder aufgenommen im botanischen Institute der Universität Lund, dessen Chef, Prof. Dr. F. Areschoug mir mit grösster Liberalität die für die Untersuchung nöthigen Hilfsmittel zur Verfügung stellte. Wenn ich jetzt meine diesbezügliche Beobachtungen publicire, erlaube ich mir die Be-

¹⁾ Karyok. Probleme, pag. 158.

²⁾ On some constituents of the Cell, Annals of Botany, Vol IX (1895) pag. 561.

³⁾ Annals of Botany, vol. IX, pag. 569.

merkung, dass für die in diese Arbeit niedergelegten Ansichten ich allein die Verantwortung trage.

In Bezug auf die Litteratur habe ich nur hinzufügen, dass ZIMMERMANN in seiner letzten Arbeit¹⁾ STRASBURGER und HUMPHREY gegenüber seine früheren Angaben aufrecht hält.

Methodisches.

Der Umstand, dass die sichelförmigen Nucleolarausbreitungen von STRASBURGER und HUMPHREY als Kunstproducte erklärt worden sind, machte es wünschenwerth, völlig gleichartige Objecte einer grossen Anzahl verschiedener Fixierungsmittel auszusetzen. Von HUMPHREY war ausserdem behauptet worden²⁾, dass das von ZIMMERMANN vorzugsweise angewandte MERKELSche Gemisch und überhaupt die wässerigen Fixierungsflüssigkeiten unbefriedigende Resultate liefern, während dagegen Alcohol, alcoholische Sublimatlösung, alcoholische Pikrinsäurelösung u. dergl. sehr schöne Fixirung geben sollen. Es kamen deshalb die meisten von den in der botanischen Mikrotechnik empfohlenen Gemischen zur Verwendung und zwar

- 1) Die MERKELSche Chromsäure-Platinchloridlösung
- 2) KEISERS Sublimat-Essig-Gemisch³⁾
- 3) FLEMMINGS Chrom-Osmium-Essigsäure⁴⁾
- 4) HERMANN'S Platinchlorid-Osmium-Essigsäure
- 5) Pikrinschwefelsäure n. KLEINENBERG
- 6) Alcohol absolutus
- 7) Conc. alcoholische Sublimatlösung
- 8) Conc. alcoholische Pikrinsäurelösung
- 9) MANN'S Fixierungsflüssigkeit⁵⁾
- 10) CARNOY'S Fixierungsflüssigkeit⁶⁾.

Die besten Resultate erhielt ich mit der MERKELSchen, der FLEMMINGSchen und der KEISERSchen Flüssigkeit; besonders das letzte lieferte mir, den Angaben

¹⁾ Die Morphologie und Physiologie des pflanzlichen Zellkernes, pag. 70 (Jena, Gustav. Fischer 1896).

²⁾ Annals of Botany, XI, p. 568.

³⁾ Das KEISERSche Gemisch besteht aus Aqua. dest. 300 ccm., Sublimat 10 gr. und Eisessig 3 ccm. — Die Angabe STRASBURGERS, dass das Reagenz aus 50 g. Sublimat, 300 g. Wasser und 3 g. Eisessig besteht, beruht offenbar auf einem Druckfehler, da sich bei gewöhnlicher Temperatur in 300 g. Wasser nur 22, 17 g. Sublimat auflösen.

⁴⁾ Das FLEMMINGSche Gemisch kam in folgender Concentration zur Verwendung:

1 % Chromsäurelösung	— 16 ccm.
2 % Osmiumsäurelösung	— 3 ccm.
Eisessig	— 1 ccm.

⁵⁾ Das MANN'Sche Gemisch kam in der von HUMPHREY (Annals of Botany, XI, p. 568) angegebenen Concentration zur Verwendung (auf 100 ccm. abs. Alcohol 4 gr. Pikrinsäure, 15 gr. Sublimat und 7 gr. Tannin.) RAWITZ, Leitfaden etc., pag. 26 giebt eine andere Zusammensetzung an.

⁶⁾ Cfr. ROSEN, COHNS Beiträge zur Biologie der Pflanzen, Bd. VII, pag. 232.

ROSENS entsprechend, durchgängig sehr gute Resultate. Von den alkoholischen Gemischen erwies sich die Sublimatlösung unter Umständen sehr vorthellhaft, im Allgemeinen zeigte sich aber, dass die alkoholischen Flüssigkeiten auf die hier in Frage kommenden Objecte einen recht ungünstigen Einfluss ausüben, indem der Embryosack durch die wasserentziehende Wirkung des Alcohols gewaltsam kontrahirt wird. Besonders lästig war dieser Umstand bei den von HUMPRHEY empfohlenen MANN'schen Gemisch, das obendrein unter Umständen eine recht schlechte Fixirung der Kerne des Nucellargewebes herbeiführte, und demgemäss im besten Falle eine nur beschränkte Anwendung in der botanischen Mikrotechnik beanspruchen kann. Auch das CARNOYSche Gemisch, das von ROSEN mit gutem Erfolg für das sporogene Gewebe der Farne verwendet wurde, erwies sich hier wenig geeignet. Die Pikrinschwefelsäure bewirkte ähnlich wie Alcohol eine starke Contraction des Embryosacks, und schien ausserdem eine destruirende Wirkung auf die Nucleolen auszuüben.

Die Ausführungen von STRASBURGER und HUMPHREY liessen es auch erwünscht sein, eine Coagulation der Protoplasten ohne chemische Fixirungsflüssigkeiten herbeizuführen. Es wurden zu diesem Zwecke ganze Fruchtknoten mit *heissem Wasserdampf* fixirt. Dies geschah meistens derart, dass der entblösste und von der Narbe befreite, aber noch im Verbande mit dem Blüthenschafte befindliche Fruchtknoten während einer bis zwei Minuten den heissen Dämpfen von kochendem Wasser ausgesetzt wurde. Die so behandelten Objecte kamen dann theils direct in absoluten Alcohol, theils in 10-procentigen Alcohol, und aus diesen erst allmählich in Alcohol absolutus. In solchen Präparaten waren die Chromosomen der in Theilung begriffenen Kerne meistens gut erhalten, dagegen liess sich in den ruhenden Kernen des Nucellargewebes kaum eine Differenzirung nachweisen. Auffallender Weise war aber der Kern des Embryosacks in diesen Präparaten immer gut erhalten und liess das Chromatingerüst und den Nucleolus mit grösster Deutlichkeit hervortreten, so dass auf diese Weise sehr instructive Präparate erhalten wurden.

Die in alkoholischen Flüssigkeiten fixirten Objecte wurden, wenn nöthig, in Jodalcohol resp. Lithiumcarbonathaltigem Alcohol ausgewaschen, dann nach dem von ZIMMERMANN¹⁾ zusammengestellten Verfahren in Xylol-Alcohol, Xylol, Xylol-Paraffin und reines Paraffin (von Schmelzpunkt 58° C) überführt und schliesslich auf einem JUNGSchen Mikrotom in Schnitte von 5—10 μ zerlegt. Dünnere Schnitte waren in Anbetracht der relativen Grösse des Embryosacks nicht erwünscht. Die Schnitte wurden mit Eiweiss-Glycerin aufgeklebt und nach Entfernung des Paraffins durch Xylol in die Färbflüssigkeit gebracht,

Die in wässrigen Gemischen fixirten Objecte wurden in einem ZIMMERMANN'schen Auswasch-apparat²⁾ während 12—24 Stunden mit fliessendem Wasser ausgewaschen und dann durch steigenden Alcohol in Xylol und Paraffin übertragen. Zum Vergleich kam auch in einigen Fällen anstatt des Xylols Chloroform zur

¹⁾ Botanische Mikrotechnik 1892.

²⁾ Cfr. Mikrotechnik, pag. 24.

Verwendung¹⁾, ohne dass doch bei dem in Frage stehenden Materiale irgendwelche erhebliche Vortheile durch diese Verfahrungsweise erzielt wurden.

Gefärbt wurde hauptsächlich mit Fuchsin, Jodgrün, Safranin, Gentianaviolett und Orange G.

Die schönste Färbung erhielt ich in ruhenden Kernen durchgängig mit Fuchsin-Jodgrünfärbung nach der von ZIMMERMANN angegebenen Methode²⁾. Die aufgeklebten und von Xylol und Paraffin befreiten Mikrotomsschnitte kommen hierbei in ein Farbstoffgemisch, das aus 1 Theil conc. wässriger Fuchsinlösung und 9 Theile 0,1-procentiger Jodgrünlösung zusammengesetzt ist, verweilen 8 Minuten in der Färbeflüssigkeit und werden dann mit abs. Alcohol, dem auf 100 cem. 0,1 gr. Jod und 1 cem. Eisessig zugesetzt ist, ausgewaschen und *direct* in Xylol und Canadabalsam überführt. Von ZIMMERMANN wurde diese Methode hauptsächlich für mit MERKEL'Scher Flüssigkeit fixirtes Material empfohlen, indessen eignet sie sich wie ROSEN gefunden³⁾ und ZIMMERMANN auch bestätigt hat⁴⁾, noch besser für Material, das mit dem KEISERSchen Sublimat-Essiggemisch fixirt wurde. Ich erhielt sehr schöne Resultate nicht nur mit Material von dieser Beschaffenheit, sondern überhaupt bei allen Arten von Fixirung mit Ausnahme für Chromsäurefixirungen. Besonders das FLEMMING'Sche Gemisch erwies sich in dieser Hinsicht sehr ungünstig⁵⁾, so dass an derartigen Präparaten die Färbung nur ausnahmsweise gelang. Aber an Material, das mit Alcohol, Sublimatalcohol oder Pikrinsäurealcohol fixirt war, gelang die Färbung immer sehr gut, nur musste hier die Zeit der Einwirkung des Farbstoffgemischs unter Umständen auf 3—4 Minuten herabgesetzt werden.

Befriedigende Resultate erhielt ich auch mit einer Combination von Fuchsin und Hämatoxylin. In diesem Falle wurden die Schnitte zuerst nach den Angaben von ZIMMERMANN⁶⁾ mit einer conc. wässrigen Fuchsinlösung behandelt, dann mit einer Lösung von Pikrinsäure in 50% Alcohol begossen, bis sie völlig schwarz erschienen, dann mit 90% Alcohol ausgewaschen, mit Wasser abgespült und mit Delafield'scher Hämatyloxinlösung behandelt. Nach Auswaschen mit Wasser und Überführung in Canadabalsam war das Chromatingerüst meistens violett, die Nucleolen leuchtend roth.

Das mit FLEMMING'Scher oder HERRMANN'Scher Flüssigkeit fixirte Material wurde meistens mit Safranin-Gentianaviolett-Orange gefärbt. Ich verfuhr dabei gewöhnlich nach der von ZIMMERMANN angegebenen Methode⁶⁾ und erhielt so recht befriedigende Resultate.

¹⁾ Cfr. RAWITZ, Leitfaden etc., pag. 33, wo die Chloroformüberführung besonders warm empfohlen wird.

²⁾ Üb. das Verh. der Nucleolen während der Karyokinese, pag. 5.

³⁾ COHNS Beiträge, Bd. VII, pag. 233.

⁴⁾ Zeitschr. f. wissenschaftl. Mikroskopie. Bd 12, pag. 458.

⁵⁾ Diese Beschaffenheit der Präparate liess sich durch nachträgliche Behandlung mit Wasserstoffsperoxid und schwefeliger Säure nicht abhelfen. Cfr. OVERTON, Zeitschr. f. wissensch. Mikroskopie, Bd. VII, pag. 1.

⁶⁾ Botan. Mikrotechnik, pag.

Specielle Beobachtungen.

Der Zweck der vorliegenden Arbeit machte es wünschenswerth, Repräsentanten aus verschiedenen Pflanzenfamilien in den Bereich der Untersuchung herein-zuziehen. Bei näherer Umschau stellte es sich indessen heraus, dass eine relativ kleine Anzahl Arten für die hier zu entscheidenden Fragen günstiges Untersuchungsmaterial abgeben. Bei den meisten mir zu Gebot stehenden Dicotylen erwies sich schon die geringe Grösse des Embryosacks als ein lästiger Umstand, der durch die schlechte Tingirbarkeit der betreffenden Kerne noch erhöht wurde. Brauchbares Material lieferten indessen die Papaveraceen und ganz besonders die Onagrariaceen, von denen einige *Oenothera*-, *Epilobium*- und *Fuchsia*-Arten eingehend untersucht wurden.

Von den Monocotylen wurden in ersten Linie die Liliaceen untersucht (*Lilium*, *Fritillaria*, *Tulipa*, *Ornithogalum*, *Anthericum*, *Gagea*). In Bezug auf die Amaryllideen (*Narcissus*, *Galanthus* u. s. w.), die in Anbetracht der erheblichen Grösse ihrer Nucleolen ein wahrscheinlich sehr gutes Material hätten liefern können, ergab die im Februar und März unternommene Untersuchung, dass in den zu dieser Zeit noch in der Erde befindlichen Blütenknospen der Embryosackkern sich schon getheilt hatte.

Liliaceæ.

Tulipa silvestris.

In dem ganz jungen Embryosack, der hier unmittelbar aus der Archesporzelle hervorgeht¹⁾, bemerkt man innerhalb der deutlich ausgebildeten Kernmembran mehrere kleine Nucleolen, die in einer körnigen, streckenweise gerüstförmig angeordneten Substanz eingebettet liegen. Die Nucleolen färben sich mit dem Fuchsin-jodgrüngemisch intensiv roth, die körnigen Differenzirungen, die offenbar Chromatinkörner darstellen, nehmen bei Behandlung mit der erwähnten Färbeflüssigkeit einen röthlichen oder röthlich-blauen Farbenton an. Die Bilder, die man in diesem Stadium bekommt, zeigen ein vollkommen übereinstimmendes Aussehen, gleichgültig ob mit alcoholischen oder chromsauren Gemischen fixirt wurde. (Fig. 1.)

In einem etwas späteren Stadium haben innerhalb des Kernes bemerkenswerthe Metamorphosen stattgefunden. Das früher fast erythrophile Chromatingerüst ist nun kyanophil geworden und erscheint bei Behandlung mit der ZIMMERMANN'schen Färbeflüssigkeit blau oder grün. Die kleinen Nucleolen haben sich zu einem

¹⁾ Cfr. TREUB und MELLINK, Notice sur le developpement du sac. embryonnaire etc., Arch. ner landaiser d. sc. exact. 1880, T. 15, p. 452.

grossen Nucleolus vereinigt, der meistens eine centrale Lage einnimmt und in welchem geöhnlich mehrere kleine Vacuolen sichtbar sind.

In einem etwas weiter vorgeschrittenen Stadium, aber noch bevor die eigentliche Längsstreckung des Embryosacks stattgefunden hat, rückt der Nucleolus aus dem Centrum nach der Peripherie des Kerns. Hier legt er sich der Kernwandung dicht an und breitet sich zu einem calottenförmigen Körper aus. War die Verschmelzung der Nucleolen vorher nicht vollständig, findet man neben dem grossen Nucleolus noch ganz kleine Nucleolen, die ebenfalls der Kernwandung dicht anliegen und eine auf dem Querschnitt halbmondförmige Gestalt besitzen. (Fig. 2.)

Es mag hier gleich hervorgehoben werden, dass man in diesem Punkte übereinstimmende Bilder mit den verschiedensten Fixierungsmitteln erhält. Fig. 2 ist einem mit FLEMMING'scher Flüssigkeit fixirten Präparate entnommen, Fig. 3, stammt aus einem mit KEISER'scher Flüssigkeit fixirten Präparate, Fig. 4 aus einem mit KEISER's Flüssigkeit fixirten Objecte. Dies ist besonders deshalb wichtig, weil die verschiedenen Fixierungsmittel in anderen Beziehungen eine verschiedene Wirkung ausüben. So fällt es in erster Linie auf, dass mit alcoholischen Flüssigkeiten fixirte Objecte gewöhnlich einen stark kontrahirten Embryosack besitzen, während dagegen in mit MERKEL'scher oder KEISER'scher Flüssigkeit fixirten Objecten der Embryosack seine normale Form behält. Die Konservirung der Kernmembran ist bei Chromsäure-Fixirung eine erheblich bessere wie mit z. B. alcoholischer Pikrinsäure. Dagegen besitzt letztere Flüssigkeit die bemerkenswerthe Eigenschaft, den Kernsaft erstarren zu lassen, so dass an derartigen Präparaten das Chromatingerüst und der Nucleolus in einem granulirtem Masse eingebettet liegen, während bei Chromsäure-Fixirung das Chromatingerüst (und der Nucleolus) in der sonst leeren Kernhöhle ausgespannt erscheint. Bei Fixirung mit MERKEL'scher oder FLEMMING'scher Flüssigkeit beobachtet man oft im Cytoplasma des Embryosacks kleine, fast spiralig gewundene Körperchen, die sich mit Fuchsin und besonders mit Hämotoxylin stark färben. Sie können unter Umständen an Centrosomen erinnern, waren aber offenbar nur Mikrosomen von etwa derselben Art wie die von HUMPHREY¹⁾ abgebildeten Körperchen.

An Schnitten, die aus den mit heissem Wasserdampf fixirten Fruchtknoten herrührten, waren im Cytoplasma grosse Vacuolen entstanden, so dass das Plasma in Folge der Wasserentziehung strang- oder netzförmig angeordnet war. Die Kernwandung des primären Embryosackkerns war indessen erhalten, und dicht an diese gedrückt lag der calottenförmig ausgebreitete Nucleolus, während das Chromatingerüst als ein zartes Fadenwerk in der Kernhöhle ausgespannt war. (Fig. 5.)

Während also die mit den verschiedenen Fixierungsmitteln in diesem Stadium erhaltenen Bilder in wesentlichen Punkten von einander differiren, stimmen sie alle darin überein, dass die excentrische Lage und die calottenförmige Gestalt des Nucleolus vorhanden war. Schon diese Thatsache spricht sehr dafür, dass es sich hier nicht um Kunstprodukte handeln kann.

¹⁾ Annals of Botany vol. IX, Pl. XX, Fig. 12.

In einem etwas weiter vorgeschrittenem Stadium findet die Längsstreckung des Embryosacks statt. Zu dieser Zeit bleibt der Nucleolus noch an der Kernwandung liegen, während der Kern selbst sein Volumen etwas vergrössert. Die Chromatinsubstanz fängt zu dieser Zeit an, die Knäuelform anzunehmen.

Unmittelbar hiernach beginnt im Cytoplasma eine bemerkenswerthe Differenzierung. Rings um den Kern sondert sich eine dunkle Schicht ab, die an Safranin-Gentianaviolett-Orange-Präparaten und auch an Fuchsinjodgrünpräparaten sich deutlich gegen das übrige Cytoplasma abhebt. In dieser dunkleren Schicht, das offenbar mit dem STRASBURGERSCHEN Kinoplasma identisch ist¹⁾, wird bald eine mit der Kernwandung concentrisch verlaufende, filzartige Structur sichtbar, während gleichzeitig im Innern des Kerns das Chromatingerüst in ziemlich schmale Chromosomen zu zerfallen beginnt. Noch in diesem Stadium ist der Nucleolus als sichelförmige Ausbreitung an der Kernwandung zu sehen. (Fig. 6).

In dem aber der Kern sich noch weiter zur Karyokinese anschickt, rückt der Nucleolus wieder in das Centrum hinein. Ob er hier aufgelöst wird, oder vielmehr bei der Karyokinese nach Auflösung der Kernmembran in das Cytoplasma ausgestossen wird, habe ich bei *Tulipa* nicht entscheiden können.

Tulipa Gesneriana.

Wie bei der vorigen Art entsteht auch hier der Embryosack unmittelbar aus der subepidermoidal gelegenen Archesporzelle. Der primäre Embryosackkern besitzt anfangs einen Kern, der sich durch grosse Armuth an kyanophile Substanz auszeichnet, dafür aber mehrere grosse, stark erythrophile Nucleolen aufweist. Die weitere Entwicklung des Embryosacks verläuft hier in allen wesentlichen Punkten auf dieselbe Weise wie bei der vorigen Art, so dass eine detaillirte Beschreibung überflüssig erscheint. Ein Unterschied liegt allerdings darin, dass bei *Tulipa Gesneriana* der Embryosack ungefähr um die Hälfte kleiner ist wie bei *Tulipa silvestris*. Auch hier wurde das Sichelstadium bei Anwendung von den verschiedensten Fixierungsmitteln — auch kochendem Wasser — constatirt.

Fritillaria imperialis.

Die Entwicklung des Embryosacks verläuft auch hier nach demselben Schema wie bei den *Tulipa*-arten, indem sich die subepidermoidal gelegene Archesporzelle unmittelbar zum Embryosack entwickelt. Schon in einem sehr zeitigen Stadium hebt sich auf Fuchsinjodgrünpräparaten die Archesporzelle durch ihre intensive Erythrophilie ab von den umgebenden Kernen des Nucellargewebes, die ausser erythrophiler Nucleolen auch reichliche Mengen kyanophiler Chromatin-

¹⁾ Cfr. Strasburger, Histologische Beiträge, Heft IV; ferner Karyokinetische Probleme, pag. 195.

substanz führen. Neben den deutlich erythrophilen Nucleolen finden sich im ganz jungen Embryosackern auch kleinere Körperchen, die mit Fuchsinjodgrün eine röthlichviolette Farbe annehmen und offenbar mit den ROSENSCHEN Pseudonucleolen¹⁾ identisch sind. Allmählich vorschmelzen die erythrophilen Nucleolen, so dass schliesslich ein grosser, central gelegener Nucleolus entsteht, während die Pseudonucleolen einstweilen unverändert bleiben. Der Gehalt des Embryosacks an kyanophiler Substanz ist in diesem Stadium noch sehr gering. Bald fängt doch die Chromatinsubstanz an eine grünblaue Farbe anzunehmen, und in diesem Stadium rückt der Nucleolus an die Kernwand, wo er sich calottenförmig abplattet. Er ist jetzt auffallend erythrophil, so dass er bei Behandlung mit dem Fuchsinjodgrünmisch sehr schnell in leuchtendem Roth tingirt wird, während das Chromatingerüst schwach blau erscheint. Später rückt aber der Nucleolus wieder in das Centrum zurück, so dass er zu der Zeit, wo im Cytoplasma sich eine Differenzierung in Kinoplasma und Trophoplasma geltend macht, eine annähernd centrale Lage einnimmt.

In einem Embryosack mit stattfindender Karyokinese sah ich im Cytoplasma erythrophile Elemente auftreten, die wohl nur als ausgetretene Nucleolen gedeutet werden können. In Embryosäcken mit ruhenden Kernen fanden sich, besonders an mit MERKELSCHER Flüssigkeit fixirtem Material, im Cytoplasma kleine Differenzierungen, die mit Centrosomen eine gewisse Ähnlichkeit aufwiesen. In Fig. 7 habe ich einige dieser Gebilde, die offenbar mit den echten Centrosomen nichts zu thun haben, abgebildet.

Fritillaria Meleagris.

In der Hauptsache stimmt diese Art mit der vorigen überein, so dass eine detaillirte Beschreibung der einschlägigen Verhältnisse überflüssig sein dürfte. Die Entwicklung der uns hier interessirenden Gebilde verläuft bis zum Sichelstadium, das bei dieser Art gewöhnlich sehr charakteristisch und leicht auffindbar ist, in ganz analoger Weise wie bei *Fritillaria imperialis*. In Bezug auf das Sichelstadium ist es bemerkenswerth, dass man hier relativ oft Bilder antrifft wie sie in Figur 7 wiedergegeben sind; ausser dem grossen Nucleolus liegen hier an der Kernwandung auch kleinere Nucleolen, welche die typische Sichelform angenommen haben. Bei dieser Art habe ich wiederholt beobachten können, wie der Nucleolus beim Schneiden entweder ganz oder nur theilweise durch das Messer aus seiner normalen Lage verrückt worden ist. Fig. 8 stellt einen derartigen Fall dar, wo der Nucleolus an seiner Mitte abgesprungen ist, und die eine Hälfte sich ausserhalb des Kerns befindet. Dies Verhalten beweist offenbar, dass der Nucleolus im fixirten Zustande einen ziemlich grosse Härte besitzt, allein einige Schlüsse auf seine Konsistenz *intra vitam* sind natürlich daraus nicht zu ziehen²⁾.

¹⁾ ROSEN. Beiträge zur Kenntniss der Pflanzenzellen, Cohns Beiträge, Bd. V, pag. 448.

²⁾ Auffallender Weise gelingt bei dieser Art die Fuchsinjodgrünfärbung ziemlich schlecht, und zwar auch an Material, das mit der Keiserschen Flüssigkeit fixirt wurde.

Als besondere Eigenthümlichkeit kann hervorgehoben werden, dass man bei *Fritillaria Meleagris* nicht selten zwei neben einander liegende, völlig ausgebildete Embryosäcke vorfindet. (Fig. 9). Ähnliches haben TREUB und MELLINCH¹⁾ für *Narcissus Tazetta* und A. FISCHER²⁾ für *Triglochin* constatirt.

Mit *Fritillaria Meleagris* stimmen in allen wesentlichen Punkten *Fritillaria pyrenaica*, *Fr. persica* und eine nicht näher bestimmte *Fritillariasppecies* überein.

Anthericum Liliago.

Die Verhältnisse sind bei dieser Pflanze denen bei *Fritillaria* sehr ähnlich, nur sind sowohl Zellen wie Kerne bei *Anthericum* bedeutend kleiner. Der Embryosack entwickelt sich hier ganz in derselben Weise wie bei *Fritillaria* und bekommt kurz vor seiner Längsstreckung einen sichelförmigen, peripher gelagerten Nucleolus. Ob der Nucleolus bis zu seiner Auflösung in dieser Lage verharrt oder wieder in das Centrum hereinzieht, habe ich bei dieser Art nicht entscheiden können.

Gagea stenopetala.

In dem ganz jungen Embryosackkern findet man auch hier mehrere kleine, stark erythrophile Nucleolen und ein fast erythrophiles Kerngerüst. Die Nucleolen verschmelzen allmählich zu einem grossen, central gelegenen Nucleolus, während das Kerngerüst kyanophile Eigenschaften bekommt. Vor der ersten Theilung rückt der Nucleolus an die Kernwandung, behält aber meistens eine annähernd kreisrunde Form, so dass es bei dieser Art kaum zu einem typischen Sichelstadium kommt. Allerdings waren die der Kernwandung anliegenden Nucleolen nicht selten deutlich abgeplattet, aber von einem typischen Sichelstadium, wie es z. B. bei *Fritillaria Meleagris* auftritt, konnte hier kaum die Rede sein. Möglich wäre ja, dass das Sichelstadium bei dieser Art sehr schnell durchlaufen wird, und demgemäss die entsprechenden Stadien sich leichter der Beobachtung entziehen. Sowie steht aber fest, dass auch hier vor der ersten Theilung der grosse Nucleolus an die Kernwandung rückt; wenn das Kinoplasma sich um den Kern zu differenziren anfängt, befindet er sich wieder gewöhnlich im Centrum.

Ornithogalum nutans.

Diese Art schliesst sich in allen wesentlichen Punkten der vorigen an. Auch hier rückt der Nucleolus zu einer bestimmten Zeit an die Peripherie, scheint aber meistens seine rundovale Form zu behalten. Als Curiosum kann angeführt werden, dass sich bei dieser Art ganz ähnliche Gebilde fanden wie diejenigen, die von

¹⁾ l. c. pag. 454.

²⁾ Zur Kenntniss der Embryosackentwicklung einiger Angiospermen (Jen. Zeitschr. f. Naturwiss. 1880, Bd 16.)

HUMPHREY¹⁾ an Alkoholmaterial von *Ceratozamia* gesehen und von ihm (irrtümlicherweise) mit dem ZIMMERMANN'SCHEN Sichelstadium identificirt worden sind. Das betreffende Material war mit alcoholischer Sublimatlösung fixirt.

An *Ornithogalum nutans* schliessen sich *Ornithogalum Kotschyamum* und *Gagea lutea*, bei denen wohl eine Wanderung des Nucleolus nach der Peripherie des Kerns, aber nur selten eine sichelförmige Abplattung desselben constatirt wurde. Da indessen von diesen Arten nur eine beschränkte Anzahl Fruchtknoten untersucht wurde, ist es gar nicht ausgeschlossen, dass ein typisches, aber rasch schwindendes Sichelstadium hier übersehen wurde.

Lilium tigrinum.

Von dieser Art stand mir Material zur Verfügung, das in Alcohol abs. so wie in FLEMMING'SCHER, MERKEL'SCHER und KEISER'SCHER Flüssigkeit fixirt war.

Die uns interessirenden Verhältnisse sind bei dieser Art fast ganz derselben Natur wie bei den vorher erwähnten *Tulipa*- und *Fritillaria*-Arten. Der ganz junge Embryosack führt mehrere Nucleolen, die allmählich zu einem grossen, central gelegenen Nucleolus zusammenschmelzen, und dieser rückt dann kurz vor der Längsstreckung des Embryosacks an die Peripherie des Kerns, wo er die bekannte Sichelform annimmt. (Fig. 10). In dieser Lage verharrt er eine ganz geraume Zeit, während inzwischen der Embryosack sich in die Länge streckt und rings um den Kern sich das Kinoplasma zu differenziren anfängt²⁾. (Fig. 11). Später, als in der Kernhöhle das Chromatingerüst die Fadenform angenommen hat, rückt er wieder in das Centrum hinein. (Fig. 12). Die weiteren Schicksale des Nucleolus der Karyokinese habe ich bei dieser Art nicht verfolgt.

Lilium croceum, L. maculatum, L. mulliflorum, L. tauricum, L. testaceum, L. umbellatum

stimmen in allen wesentlichen Punkten mit *L. tigrinum* überein. Bei allen diesen Arten wurde das Sichelstadium in seiner typischen Ausbildung constatirt, und zwar an Material, das mit den verschiedensten Fixierungsmitteln fixirt wurde.

Onagrariaceæ.

Oenothera biennis.

Die Entwicklung des Embryosacks verläuft hier anscheinend in derselben Weise wie bei *Oenothera tetraptera*, deren Embryosackentwicklung von GUGNARD³⁾ ein-

¹⁾ Über Nucleolen und Centrosomen, Ber. d. d. bot. Ges. 1894, pag. 260.

²⁾ Das Kinoplasma war bei dieser Art nur an mit FLEMMING'SCHER Flüssigkeit fixirtem Materiale (hier aber sehr deutlich) zu sehen; bei Alcoholfixirung war jede Spur einer derartigen Differenzirung verwischt.

³⁾ GUGNARD, Recherch. sur le sac. embr., pag. 157.

gehend untersucht worden ist. Der ganz junge, noch wenig gestreckte Embryosack besitzt einen Kern, dessen rundliche, central gelegene Nucleolus intensiv erythrophil ist, während das schwach entwickelte Chromatingerüst deutlich kyanophile Eigenschaften besitzt. In einem späteren Stadium, nach dem der Embryosack eine bedeutende Längsstreckung erfahren, findet man den Nucleolus der Kernwandung angeschmiegt, und zwar hat er jetzt eine nicht zu verkennende Calottenform angenommen, sodass er auf dem Querschnitte sichelförmig erscheint. (Fig. 13). In einem noch späteren Stadium findet man den Nucleolus wieder im Centrum des Kerns, wo er die kreisrunde Form angenommen hat.

Von dieser Art stand mir nur Alcoholmaterial zur Verfügung. — Ganz ähnliche Verhältnisse wie bei *Oenoth. biennis* konstatierte ich an Alcoholmaterial von *Epilobium angustifolium* und *Fuchsia coccinea*.

Bei allen untersuchten Onagrariaceen gelingt, wenigstens an Alcoholmaterial, die ZIMMERMANNsche Fuchsinjodgrünfärbung sehr schön.

Papaveraceæ.

Papaver bracteatum.

Zu der Zeit, wo nach den bei anderen Arten gemachten Erfahrungen das Sichelstadium erwartet werden konnte, fand sich auch bei dieser Art der Nucleolus als lins- oder sichelförmige Masse der Kernwandung angelagert. (Fig. 14). Bei *P. bracteatum*, — die einzige Papaveracé, die näher untersucht wurde — konstatierte ich das typische Sichelstadium sowohl an mit Alcohol wie an mit FLEMMINGScher und KEISERScher Flüssigkeit fixirtem Material. Auch hier bewährte sich an Alcoholmaterial die ZIMMERMANNsche Fuchsinjodgrünfärbung ganz vorzüglich.

Uebersicht der Resultate. Theoretisches.

Aus den im Vorigen mitgetheilten Beobachtungen geht hervor, dass der von ZIMMERMANN als Sichelstadium berechnete Zustand des Nucleolus in dem primären Embryosackkern eine bei den Angiospermen sehr verbreitete Erscheinung ist. Unter 21 untersuchten Arten aus drei verschiedenen Familien konnte das Sichelstadium in völlig typischer Ausbildung bei 17 nachgewiesen werden, während bei 4 Arten in den entsprechenden Stadien nur eine Auswanderung des Nucleolus nach der Peripherie konstatiert wurde. Ohne Zweifel würden ausgedehntere Untersuchungen das Vorhandensein des Sichelstadiums bei vielen anderen Familien ergeben.

Eine Discussion über die Bedeutung der betreffenden Metamorphosen des Nucleolus kann aber selbstverständlich nur dann einen Sinn haben, wenn es sich herausgestellt hat, dass die von ZIMMERMANN als Sichelstadium bezeichneten Struc-

turverhältnisse nicht, wie es STRASBURGER und HUMPHREY behaupten auf Kunstproducte zurückzuführen sind. Die Entscheidung dieser Frage ist, in sofern es sich um den Embryosack handelt, nicht so ganz leicht, weil die Beschaffenheit des Materials eine Untersuchung *intra vitam* nicht erlaubt. Es giebt indessen andere Anhaltspunkte, die in dieser Frage bestimmte Fingerzeige geben.

In erster Linie ist dann zu notiren, dass die sichelförmigen Nucleolen keineswegs, wie an Artefacten zu erwarten wäre, regellos — sporadisch auftreten, sondern immer ganz regelmässig, derart, dass in einem bestimmten Fruchtknoten entweder alle oder keine Embryosackkerne die fraglichen Strukturverhältnisse zeigen. Dies Verhalten harmonirt völlig mit der bekannten Thatsache, dass in einem bestimmten Fruchtknoten die Entwicklung der Samenknochen meistens sehr gleichmässig verläuft. Ferner ist es sehr bemerkenswerth, dass ich Strukturverhältnisse, die an das Sichelstadium erinnern könnten, ausserhalb des primären Embryosackkerns gar nicht beobachtet habe. Weder in dem ganz jungen Embryosackkern noch in seinen Tochterkernen oder in den Kernen des umliegenden Nucellargewebes habe ich Strukturverhältnisse gesehen, die an das wirkliche Sichelstadium erinnern könnten.

Zweitens spricht gegen die Natur der fraglichen Gebilde als Artefacte ganz entschieden die Thatsache, dass die betreffenden Bilder mit den verschiedensten Fixirungsmitteln erhalten werden. Ein jeder, der sich mit cytologischen Untersuchungen abgegeben hat, weiss ja ganz gut, dass die mit verschiedenen Fixirungsmitteln erhaltenen Präparate nicht nur in tinctioneller sondern oft genug auch in structureller Hinsicht von einander differiren; ich verweise hier spec. auf das, was in dieser Hinsicht in Bezug auf den Embryosack (pag. 9) erwähnt wurde. Trotz dem haben ich bei den untersuchten *Tulipa*-, *Fritillaria*- und *Lilium*-Arten in allen Fällen, wo das Entwicklungsstadium des Embryosacks das Sichelstadium erwarten liess, auch dasselbe gefunden, und zwar gleichgültig, ob mit Alcohol, Chromsäuregemischen oder Sublimat fixirt worden war. Dieser Umstand schliesst den Verdacht auf Kunstprodukte mit einem hohen Grad von Wahrscheinlichkeit aus.

Noch misslicher erscheint der Versuch, die fraglichen Erscheinungen als Kunstprodukte erklären zu wollen, wenn man die Beweisführung von HUMPHREY und STRASBURGER etwas näher in's Auge fasst.

In seiner ersten Publikation¹⁾ identificirt HUMPHREY das ZIMMERMANNsche Sichelstadium mit einigen Gebilden, die er an schlecht fixirtem Alcoholmaterial von den Pollensäcken der *Ceratozamia* gesehen hat. Die von HUMPHREY beobachteten Körper waren sichelförmig und lagen an der Peripherie des Kernes; mit dem ZIMMERMANNschen Fuchsinjodgrüngemisch behandelt nahmen sie weder wie die Nucleolen eine rein rothe noch wie die Chromatinsubstanz eine blaugrüne Farbe an, sondern wurden in einer Zwischennüance rothblau tingirt. Die Orientirung der Körperchen zeigte eine gewisse Regelmässigkeit, derart, dass sie von der Seite, wo die Fixirungsflüssigkeit vorgedrungen, abgewandt waren. Es kann somit kein Zweifel darüber bestehen, dass diese Körper wirklich durch ungenügende Fixirung

¹⁾ Ber. d. deutsch. botan. Ges. 1894, p. 260.

entstanden sind; allein mit den ZIMMERMANN'SCHEN Sichel-nucleolen, die mit Fuchsin-jodgrün immer eine sehr reine und intensiv rothe Farbe annehmen, und die ich wenigstens immer in gut fixirtem Material am besten ausgebildet beobachtete, haben diese von HUMPHREY beschriebenen Gebilde absolut nichts zu thun.

In seiner letzten Publikation¹⁾ scheint Humphrey, offenbar unter dem Ein-drucke der inzwischen erschienenen Arbeit von STRASBURGER, seine diesbezügliche Ansicht dahin modificirt zu haben, dass die ZIMMERMANN'SCHEN Sichelkörpern wirkliche Nucleolen darstellen, die aber nur in Folge ungleichmässiger Fixirung ihre auffallende Form bekommen haben. Da indessen aus der HUMPHREY'SCHEN Darstellung klar hervorgeht, dass er das echte Sichelstadium des Nucleolus niemals gesehen hat²⁾, dürfte eine Kritik seiner letzten Ansicht überflüssig sein.

Eine besondere Beachtung verdienen dagegen die Ausführungen STRASBURGERS³⁾. Dieser Forscher meint gefunden zu haben, dass auf dem fraglichen Gebiete verschiedene Erscheinungen nicht hinlänglich aus einander gehalten wurden und bespricht dann ausführlich sowohl das echte Sichelstadium wie die von HUMPHREY irrthümlicher Weise als Sichelstadium gedeuteten Gebilde⁴⁾. Letztere werden auch von STRASBURGER als durch schlechte Fixirung erzeugte Kunstprodukte aufgefasst. In Bezug auf des ZIMMERMANN'SCHE Sichelstadium äusserst sich STRASBURGER folgendermassen⁵⁾.

»Zur Zeit der Prophasen kommt es in den Sporen- und Pollenmutterzellen auch nicht eben selten vor, dass unter dem Einfluss des Fixirungsmittels der Nucleolus gegen die Wandung getrieben wird, sich an derselben abflacht und dann mehr oder weniger sichelförmig erscheint. Dasselbe geschah auch in den von ZIMMERMANN beobachteten Embryosackmutterzellen. Der Druck kann so stark werden, dass ein Theil oder auch die gesammte Substanz des Nucleolus durch die Kernwandung nach aussen gepresst wird. Daher der Nucleolus in solchen Präparaten als ganz schmale Sichel sich zeigen, in manchen Kernen auch ganz fehlen kann».

Die Form und Lage des im Sichelstadium sich befindenden Nucleolus soll also nach STRASBURGER hervorgerufen sein durch einen vom Fixirungsmittel auf jenen ausgeübten Druck, der unter Umständen den Nucleolus durch die Kernwandung pressen soll. Allein man fragt sich vergebens, wie das Zustandekommen eines solchen Druckes physikalisch zu erklären sei. Der mit Kernsaft gefüllte, blasenförmig aufgetriebene Embryosackkern kann mit vollem Recht aufgefasst werden als eine Vacuole, innerhalb welcher ein osmotischer Druck von einer gewissen Höhe herrscht. Bei Einwirkung eines Fixirungsmittels werden die osmotischen Gleichgewichtsverhältnisse im Zellkern wie im ganzen Protoplasten destruiert, aber

¹⁾ Annals of Botany, 1895, vol. IX, pag. 561.

²⁾ l. c. pag. 568.

³⁾ Karyokinetische Probleme, pag. 158.

⁴⁾ Der Vorwurf in Bezug auf Confusion trifft also nur Herrn Humphrey.

⁵⁾ Karyokin. Probleme, pag. 159.

ein Flüssigkeitsdruck, der den Nucleolus gegen die Kernwandung pressen und abflachen sollte, lässt sich mit besten Willen nicht herauskonstruieren.

Es ist übrigens nicht gerade schwer zu sehen, wodurch STRASBURGER in diesem Punkte irre geführt worden ist. Wie schon vor Jahren ZACHARIAS¹⁾ betont hat, kommt es nicht selten vor, dass der Kern unter dem Einflusse des Fixirungsmittels platzt, und eben dies Platzen hat STRASBURGER seiner Zeit zu der irrigen Annahme geführt, sein Paranucleolus werde in's Cytoplasma hinausgestossen. Dies Platzen des Zellkerns beruht aber keineswegs auf eine Drucksteigerung innerhalb des Kernes, sondern erklärt sich daraus, dass der im Plasma herrschende Gegendruck aufgehoben wird¹⁾. Unter normalen Umständen lastet nämlich auf die Kernwandung sowohl der innere Druck des Kernsaftes wie auch ein äusserer, vom Cytoplasma (resp. dessen Vacuolen) ausgehender Druck. Bei Einwirkung des Fixirungsmittels auf den Protoplasten wird nun in erster Linie der cytoplasmatische Druck aufgehoben, während der innere Druck des Kernes noch eine Zeit lang persistiren kann, und die Kernwandung, die nunmehr einem einseitigen Drucke ausgesetzt ist, zerplatzt, wobei der Inhalt bisweilen herausgeschleudert wird. Die letztere Erscheinung, die auch ich an fixirtem Material constatirt habe, beruht also keineswegs auf eine durch das Fixirungsmittel hervorgerufene Drucksteigerung, da eine solche überhaupt nicht zustande kommt, sondern einfach auf die Aufhebung des äusseren Druckes²⁾. Die STRASBURGERSCHE Erklärung des Sichelstadium muss demgemäss mit Bestimmtheit zurückgewiesen werden.

Die Unzulänglichkeit des STRASBURGERSCHEN Erklärungsversuches geht vielleicht in noch schlagender Weise daraus hervor, dass wie schon pag. 6 erwähnt wurde, auch Fruchtknoten, die unter Ausschluss chemischer Agentien durch heissen Wasserdampf fixirt wurden, ganz analoge Strukturverhältnisse aufwiesen (Cfr. Fig. 5).

Indessen giebt es noch ein drittes Alternativ, wonach das Sichelstadium allerdings kein Kunstprodukt wäre, aber doch eine nur nebensächliche Bedeutung besitzen würde. Es wäre ja denkbar, dass der anfangs im Kernsaft schwebende resp. im Chromatingerüst aufgehängte Nucleolus in Folge einer Änderung seines specifischen Gewichtes sich nach unten senken und sich dann, als schleimige resp. zähflüssige Substanz unter dem Einflusse der Schwerkraft abflachen würde. Eine derartige Erscheinung würde auch dann zu Stande kommen, wenn anstatt einer Vermehrung des specifischen Gewichtes des Nucleolus eine Abnahme des spec. Gew. der Vacuolenflüssigkeit einträte. Das letztere Alternativ erscheint nicht ganz ausge-

¹⁾ Wie PFEFFER hervorgehoben hat, ist für das Zustandekommen osmotischer Druckkräfte innerhalb des Plasmas das Vorhandensein von Vacuolen keineswegs nothwendig. Cfr. Pfeffer, Zur Kenntniss der Plasmahaut und der Vacuolen, Abhandl. d. math. phys. der. K. Sächs. Ges. d. Wissensch. Bd. 16.

²⁾ Eine ganz analoge Erscheinung findet man bei den Gerbstoffvacuolen, die oft momentan platzen, wenn der Protoplast beschädigt wird. Wenn man vorher durch sehr verdünnte Methylenblaulösung einen Niederschlag von gerbsaurem Methylenblau innerhalb der Vacuole erzeugt, sieht man nicht selten, wie die blauen Körner ins Plasma hinausgestossen werden. Cfr. KLERCKER Studien über die Gerbstoffvacuolen, Bihang till K. Vet. Akad. handlingar, Bd. 13, No: 3.

schlossen, wenn man sich vergegenwärtigt, dass das Eintreten des Sichelstadiums gewöhnlich mit einer Vergrösserung des Zellkerns, möglicher Weise also auch mit einer Verdünnung des Kernsaftes verbunden ist. Das Zurückwandern des Nucleolus gegen das Centrum hin konnte wiederum durch eine der Karyokinese vorangehende Zunahme der gelösten Bestandtheile des Kernsaftes erklärt werden.

In der That liessen sich für diese Erklärung des Sichelstadiums einige Beobachtungen anführen. Beim Durchmustern der Präparate von *Tulipa*, die das Sichelstadium enthalten, ist es mir aufgefallen, dass die calottenförmigen Nucleolen meistens den mit der Längsaxe des Fruchtknotens parallelen Kernwandungen anliegen; an Querschnitten, die vertikal gegen die Längsaxe des Fruchtknotens geführt werden, werden also die Nucleolen in sichelförmige Theilstücke zerlegt. Da die cylinderrförmigen Fruchtknoten von *Tulipa*, *Fritillaria* und *Lilium* anfangs mit horizontal gerichteter Längsaxe auf der Fixirungsflüssigkeit schwimmen, würden die Nucleolen, falls sie in der erwähnten Weise durch die Schwerkraft beeinflusst würden, eben diese Orientirung zeigen.

Gegen eine derartige Erklärung des Zustandekommens des Sichelstadiums sprechen nun allerdings solche Bilder, wo ausser dem grossen Nucleolus auch kleinere sichelförmige Nucleolen an der Kernwandung ausgebreitet liegen. Allein da die Gefässe mit den zu fixirenden Objecten auf nicht zitterfreien Tischen placirt waren, könnten diese Bilder möglicherweise dadurch zustande kommen, dass während der Fixirung eine rollende Bewegung der in der Fixirungsflüssigkeit horizontal schwebenden Fruchtknoten eingetreten wäre. Um in diesem Punkte Klarheit zu bekommen, wurden Fruchtknoten von *Tulipa silvestris*, in denen das Sichelstadium vermuthet werden konnte, vertikal befestigt und in dieser Lage der Fixirungsflüssigkeit ausgesetzt. Aber auch in den so behandelten Fruchtknoten lagen die sichelförmigen Nucleolen meistens den mit der Längsaxe des Organs parallelen Kernwandungen an. Diese Thatsache beweist also unwiderlegbar, dass der Schwerkraft keine Rolle beim Zustandekommen der fraglichen Erscheinung zugeschrieben werden kann.

Was für Kräfte aber in dieser Hinsicht thätig sind, lässt sich gegenwärtig gar nicht bestimmen. Ob die Nucleolen selbst vielleicht amöboide Bewegungen ausführen, oder ob sie passiv durch andere Kernelemente an die Peripherie geführt werden, das ist eine Frage, auf welche hier nicht näher eingegangen werden soll.

Werfen wir einen Rückblick auf die im Vorigen mitgetheilten Beobachtungen, so finden wir, dass die als Sichelstadium bezeichnete Erscheinung eine in den primären Embryosackkernen sehr verbreitete, wahrscheinlich normale Erscheinung ist. Denn auch in den Fällen, wo eine Abplattung des Nucleolus nicht wahrgenommen wurde, konnte doch immer eine Auswanderung desselben an die Peripherie des Kernes constatirt werden.

Von grossem Interesse ist nun die Thatsache, dass sich auch in den männlichen Sexualanlagen ganz analoge Vorgänge abspielen. Nach den zur Zeit

vorliegenden Untersuchungen kann es gar nicht bezweifelt werden, dass in den Pollenmutterzellen das Sichelstadium eine sehr häufige, wahrscheinlich normale Erscheinung ist ¹⁾.

Bedeutungsvoll erscheint es auch, dass die betreffenden Metamorphosen in den weiblichen und männlichen Geschlechtsanlagen zu ganz korrespondirender Zeit stattfinden. Wie ZIMMERMANN betont hat, fällt dieser Moment gerade mit dem Zeitraum zusammen, in welchem nach den Untersuchungen von GUIGNARD und OVERTON die Reduction der Chromosomen stattfindet. ZIMMERMANN vermuthet deshalb, und wohl auch mit vollem Recht, dass dieser Erscheinung eine tiefere Bedeutung zukomme, doch meint er nicht, gegenwärtig diese Bedeutung näher präcisiren zu können.

In der That wird eine Deutung des Sichelstadiums gerade dadurch erschwert, dass sich die nämlichen Processe sowohl in den männlichen wie in den weiblichen Geschlechtsanlagen abspielen. Bekanntlich differiren die ausgebildeten Sexualzellen besonders darin, dass die Eizellen immer grosse erythrophile Nucleolen führen, während die generativen Kerne des Pollenschlauchs gar keine Nucleolen besitzen ²⁾, und es scheint demnach unzulässig, die betreffende Erscheinung mit dem specifischen Sexualcharakter in Beziehung zu bringen. Wenn man dazu bedenkt, dass der Nucleolus zuletzt immer in das Centrum des Kernes zurückwandert, erscheint die Sache noch räthselhafter.

Deshalb ist es wohl möglich, dass das Sichelstadium als solches nur eine korrelative Erscheinung ist zu anderen, vorläufig unaufgeklärten Processen, die sich zu der betreffenden Zeit innerhalb der Sexualorgane abspielen. Wenn wir die thatsächlich nicht zutreffende Annahme machen würden, dass das Sichelstadium ein bei der Fixirung entstandenes Artefact wäre, so würden wir doch auf gewisse, diesem Artefacte zugrundeliegenden Structureigenthümlichkeiten schliessen müssen, denn da die betreffenden Bilder nur in den Sexualanlagen, und in diesen nur zu einer ganz bestimmten Zeit, dann aber mit grösster Regelmässigkeit constatirt werden, so ist es einleuchtend, dass sie jedenfalls ihre Entstehung ganz bestimmten Qualitäten der fraglichen Kerne verdanken. Dasselbe gilt auch für den hier realisirten Fall, dass nämlich die sichelförmigen Nucleolen präformirt sind, in sofern als die fraglichen Nucleolarmetamorphosen als Begleiterscheinung anderer, innerhalb der Kernsubstanz sich abspielender Vorgänge aufgefasst werden können.

Indessen bleiben vorläufig alle Speculationen über die Bedeutung des Sichelstadiums von problematischem Werth, schon aus dem Grunde, weil die Frage nach der Bedeutung der Nucleolen überhaupt noch eine offene ist. Die mikroskopischen Befunde auf dem Gebiete der Cytologie geben ja nur in vereinzelten Fällen eindeutige Aufschlüsse über die nucleo-physiologischen Probleme, und gerade in Bezug

¹⁾ In den Pollenmutterzellen wurde bisjetzt das Sichelstadium beobachtet bei *Tradescantia* (HOFMEISTER), *Hemerocallis* (TANGL), *Fritillaria*, *Glaucium*, *Aconitum*, *Pinus*, (STRASBURGER), *Helleborus*, *Lilium* (ZIMMERMANN).

²⁾ Cfr. Zacharias, Ueber den Nucleolus, pag. 290.

auf die Nucleolen stehen sich noch die Ansichten gegenüber¹⁾. Trotz dem, oder vielmehr gerade deshalb, scheinen mir Untersuchungen wie die vorliegende ihre Berechtigung zu besitzen. Denn auf dem Gebiete der Cytologie wird es sich wohl noch eine geraume Zeit in erster Linie darum handeln, ein festes Fundament von sicher konstatierten Thatsachen herbeizuschaffen. Von diesem Gesichtspunkte aus möchte ich wenigstens die vorstehenden Zeilen beurtheilt wissen.

II.

Über die Chromatophilie der Sexualkerne.

I. Litteratur und Fragestellung.

Vor einigen Jahren (1890) machte der Zoologe AUERBACH die interessante Entdeckung²⁾, dass in den ruhenden Zellkernen der Amphibien sich zweierlei Nucleolen unterscheiden lassen, die von diesem Forscher als *erythrophile* und *kyanophile* bezeichnet wurden. AUERBACH gründete diese Unterscheidung darauf, dass die beiden Arten von Nucleolen in tinctioneller Hinsicht eine bestimmte Differenz zeigten und zwar derart, dass wenn ihnen gleichzeitig ein rother und ein blauer Farbstoff geboten wurde, gewisse Nucleolen sich roth, andere blau färbten. Dies Wahlvermögen der zweierlei Nucleolen erschien um so merkwürdiger, als die chemische Constitution des Farbstoffs bei der fraglichen Erscheinung sich von untergeordneter Bedeutung erwies, in dem zwei chemisch so verschiedene Körper wie Carmin

¹⁾ Nach dem die vorliegende Untersuchung schon abgeschlossen war, und das Manuskript bereits druckfertig vorlag, erhielt sich die soeben erschienenen »Cytologische Studien aus dem Bonner botanischen Institut« (Jahrb. f. wissenschaftl. Botanik, Bd. XXX, Heft. 2 und 3) von denen für mich besonders die verdienstvollen Arbeiten von MOTTIER (Beiträge zur Kenntniss der Kernteilung in den Pollenmutterzellen einiger Dikotylen und Monokotylen) und JUEL (Die Kernteilungen in den Pollenmutterzellen von *Hemerocallis fulva* etc.) von grossem Interesse waren. Diese beiden Autoren haben indessen nur beiläufig den Nucleolen ihre Aufmerksamkeit gewidmet, so dass irgend welche Angaben über das Fehlen oder Auftreten des Sichelstadiums in den Pollenmutterzellen der untersuchten Arten nicht vorhanden sind.

²⁾ AUERBACH, Zur Kenntniss der thierischen Zellen, Sitzungsber. d. Kgl. Preuss. Akad. d. Wiss., 26 Juni 1890.

und Fuchsin¹⁾ von den selben Nucleolen gespeichert werden, während das dem Fuchsin in constitutioneller Hinsicht verwandte Methylgrün nur die kyanophilen Nucleolen tingirt.

Noch grösser wurde das sich an diese Fragen anknüpfende Interesse als von AUERBACH (1891) gezeigt wurde, dass die chromatophile Gegenätzlichkeit der beiden Kernsubstanzen in einer bestimmten Relation zur Sexualität steht, indem bei den untersuchten Vertebraten alle ovarialen Formationen überwiegend erythrophil, die Spermatozoen aber (wenigstens der Kopf) ausschliesslich kyanophil²⁾ sind. Bei der Klarstellung dieser Verhältnisse verfuhr AUERBACH, um völlig einwurfsfreie Resultate zu erhalten, folgendermassen³⁾. Nach dem zwei, je einer männlichen Geschlechtsdrüse der betreffenden Species entnommene Stückchen gemeinschaftlich gehärtet und dann in Paraffin eingebettet waren, wurden Schnitte nebeneinander auf ein und dasselbe Objectglas geklebt und auf diesem zusammen allen weiteren Proceduren einschliesslich der tinctionellen unterworfen. Wurde nun als Färbeflüssigkeit z. B. ein violette Gemisch von Eosin und Methylgrün (oder Fuchsin und Anilinblau) angewandt, so erschienen schon dem unbewaffneten Auge die Schnitte des Ovariums ganz roth, die des Hodens dagegen ganz blau oder blaugrün⁴⁾. Die mikroskopische Untersuchung ergab, dass an den Spermatozoen der Kopf sich immer blau färbte; an den Eiern erwies sich die Substanz des Keimbläschens und im besonders hohem Grade die seiner Nucleoli durchgängig erythrophil. Nach diesen Befunden schien es also in hohem Grade wahrscheinlich, dass der sexuelle Gegensatz sich auf zwei Substanzen gründet, die sich qualitativ unter Anderem dadurch unterscheiden, dass die männliche kyanophiler, die weibliche erythrophiler Natur ist.

AUERBACH betont selbst, dass zu einer weiteren Verallgemeinerung des von ihm aufgestellten Gesetzes noch entsprechende Beobachtungen an wirbellosen Thieren und an Pflanzen nöthig wären. Auf botanischem Gebiete ist dann auch diese Lücke durch die interessanten Untersuchungen von ROSEN⁵⁾ und SCHOTTLÄNDER⁶⁾ ausgefüllt worden. Von ROSEN wurde die bedeutungsvolle Thatsache konstatiert, dass in Bezug auf die Chromatophilie eine vollkommene Übereinstimmung besteht

¹⁾ Die von AUERBACH benutzten Farbstoffe vertheilen sich demgewiss auf zwei Gruppen:

Blaue Reihe:	Rothe Reihe:
Methylgrün	Carmin
Smaragdgrün	Eosin
Victoriablau	Echthroth
Methylenblau	Orange
(Hämatoxylin)	Rosanilin (schwefelsaures).

²⁾ AUERBACH. Ueber einen sexuellen Gegensatz in der Chromatophilie der Keimsubstanzen Sitzber. der Kgl. preuss. Ak. d. Wissensch. 25 Juni 1891.

³⁾ l. c. p. 714.

⁴⁾ l. c. p. 719.

⁵⁾ ROSEN, Beiträge zur Kenntniss der Pflanzenzellen, Cohn's Beiträge, Bd. V, p. 443.

⁶⁾ Beiträge zur Kenntniss des Zellkerns und der Sexualzellen bei Kryptogamen, Cohn's Beiträge, Bd. 6 (1892), p. 267.

zwischen den Sexualkernen der untersuchten Pflanzen ¹⁾ und denen der von AVERBACH studirten Wirbelthiere. Der generative Kern des Pollenkorns erwies sich nemlich stets als kyanophil, während dagegen der Eikern sowie sämtliche Kerne des Embryosacks der erythrophilen Gruppe anhören. Besonders prägnante Resultate erhielt ROSEN bei Doppelfärbungen mit Fuchsin-Methylenblau; bei Anwendung von diesem Farbstoffgemisch stellte es sich auch heraus, dass der vegetative Kern des Pollenkorns stark erythrophil ist, und dass im weiblichen Geschlechtsapparat die Erythrophilie sich schon in der Embryosackmutterzelle geltend macht. — Analoge Beobachtungen wurden auch von SCHOTTLÄNDER für die Kryptogamen gemacht: bei den *Marchantiaceen* und *Characaceen* besteht die Eizelle ausschliesslich aus erythrophiler Substanz, die reifen Spermatozoiden vorwiegend, wenn auch nicht ausschliesslich aus kyanophilen Stoffen.

Eine wichtige Erweiterung unserer Kenntnisse in Bezug auf die Chromatophilie lieferte dann ZACHARIAS durch den Nachweis ²⁾, dass einerseits künstliche Nucleinpräparate aus einem geeigneten rothblauen Farbstoffgemisch nur den blauen Farbstoff aufnehmen resp. festhalten, andererseits auch die verschiedensten den Pflanzen- und Thierreich anhörigen Zellen sich in ihren nucleinhaltigen Theilen blau färben, im übrigen aber roth. Die tinctionelle Differenz zwischen den Kernen der beiderlei Sexual Zellen wurde also auf die schon früher von ZACHARIAS betonte Thatsache einer stofflichen Verschiedenheit zurückgeführt.

Im scharfen Gegensatz zu diesen Anschauungen macht STRASBURGER ³⁾ geltend, dass die Ursache der chemischen und chromatischen Differenz der Sexualkerne nicht in dem Sexualcharakter als solchem liegt, sondern dass die kyanophilen und erythrophilen Eigenschaften der Zellkerne lediglich von Ernährungsverhältnissen abhängen. Demgemäss soll bei der Karyokinese das Kerngerüst der Tochterkerne erythrophil werden, wenn demselben viel Cytoplasma als Nährmaterial zur Verfügung steht, kyanophil dagegen, wenn deren entstandene Tochterkerne sich unter Bedingungen befindet, welche eine Nahrungsaufnahme aus dem Cytoplasma einschränken oder ausschliessen. Diese Ansicht stützt STRASBURGER hauptsächlich darauf dass bei den *Gymnospermen* der Pollenschlauchkern sich um so ausgeprägter erythrophil zeigte, je grösser die Menge des in der Pollenschlauchbildenden Zelle enthaltenen Cytoplasmas war. Ebenso werden von STRASBURGER die stark erythrophilen Anlagen von Adventivkeimen bei *Funkia ovata* als Belege für die Richtigkeit seiner Ansicht angeführt.

Gegen die STRASBURGERSche Erklärung der Chromatophilie haben sowohl ZACHARIAS ⁴⁾ wie ROSEN ⁵⁾ theoretische Bedenken geäussert und besonders hervorgehoben, dass wir über die Ernährung des Kerns vorläufig gar zu wenig wissen, um an

¹⁾ ROSEN untersuchte nur *Liliaceen*.

²⁾ ZACHARIAS, Ueber Chromatophilie, Ber. d. deutsch. botan. Ges. XI, pag. 188.

³⁾ STRASBURGER, Über das Verhalten des Pollens etc. Jena 1892.

⁴⁾ Ueber Chromatophilie, pag. 194.

⁵⁾ Beiträge zur Kenntniss der Pflanzenzellen III, Cohn's Beiträge, Bd. VII, pag. 231.

diese Verhältnisse irgendwelche Speculationen anzuknüpfen. Es schien mir indessen wahrscheinlich, dass diese Frage einer experimentellen Lösung zugänglich sei, und zwar gerade in Bezug auf die Kerne der Pollenschläuche. Wie ich an anderem Orte gezeigt habe ¹⁾, giebt es eine beträchtliche Anzahl Pollenkörner, die in destillirtem Wasser gut entwickelte Schläuche treiben, wobei die im Pollenkorn aufgespeicherten Reservstoffe allmählich verbraucht werden, so dass sich die Kerne des Pollenschlauches unter sehr ungünstigen Ernährungsverhältnissen befinden. Ähnliches gilt auch in Bezug auf diejenigen Pollenschläuche, die in dampfgesättigter Luft keimen ²⁾. Würde man nun derartige Pollenkörner theils in destillirtem Wasser (resp. dampfgesättigter Luft), theils in einer zur Eiweissbildung befähigenden Culturflüssigkeit zur Keimung veranlassen können, wären offenbar die Bedingungen für eine experimentelle Prüfung der STRASBURGERSchen Ansicht gegeben, insofern als die Theilung des generativen Kerns einerseits in einem verhältnissmässig schlecht ernährtem, andererseits in einem sehr wohlgenährten Cytoplasma stattfinden würde. Es ist mir auch gelungen, diese Bedingungen herzustellen und auf diese Weise einen Beitrag zur Klarstellung der oben erwähnten Verhältnisse zu liefern.

II. Versuchsanordnung und Methodik.

Für die Entscheidung der uns hier intressirenden Frage würde es vielleicht genügen, Culturen in *stickstofffreien* und in *stickstoffhaltigen* Flüssigkeiten mit einander zu vergleichen. Um aber bei den Versuchen die möglichst grossen Differenzen bezüglich der Ernährungsverhältnisse zu realisiren, wurden in erster Linie als Untersuchungsmaterial solche Pollenkörner gewählt, die in destillirtem Wasser ³⁾, resp. in dampfgesättigter Luft Schläuche treiben. Leider zeigte es sich bald, dass eine beträchtliche Anzahl der so beschaffenen Pollenkörner in den später zu besprechenden Nährflüssigkeiten rasch zugrunde gehen. Eine zweite Schwierigkeit lag darin, dass in den stickstoffhaltigen Flüssigkeiten viele Pollenkörner sehr schön keimten, ohne dass eine sichere Zunahme der im Schlauche befindlichen Eiweissstoffe constatirt werden konnte. Ferner stellte es sich heraus, dass in vielen Schläuchen, die sehr gut entwickelt waren, und in denen offenbar eine reichliche Eiweissbildung stattgefunden, sich der generative Kern nicht mehr theilte. Aber auch abgesehen von diesen Umständen, erwies sich schon die ungleichmässige Ausbildung des benutzten Materials sehr lästig, indem der Pollen aus den verschiedenen Antheren

¹⁾ LIDFORSS, Zur Biologie des Pollens, Jahrb. f. wissensch. Botanik, Bd. XXIX, Heft 1.

²⁾ MOLISCH, Zur Physiologie des Pollens, Sitz. ber. d. kais. Ak. d. Wiss. in Wien, math.-naturw. Cl., Bd. CII, Abth. I Juli 1893, pag. 6.

³⁾ Aus leicht ersichtlichen Gründen konnten für diese Versuche nur solche Pollenarten Verwendung finden, die in Wasser gar keine Platzungen aufwiesen.

derselben Blüthe oft genug in ganz verschiedener Weise gegenüber den benutzten Culturflüssigkeiten reagirte.

Thatsächlich gelang es doch, Pollenkörner herauszufinden, welche die nöthigen Qualificationen besaßen. Die so beschaffenen Pollenkörner kamen theils in einen aus dest. Wasser bestehenden, auf den Objectträger ausgebreiteten Culturtropfen, theils wurde ein anderer, in derselben Weise placirter, aber aus stickstoffhaltiger Nährlösung bestehender Tropfen mit Pollen aus derselben Blüthe beschickt. Als Nährflüssigkeit kam meistens eine Pepton-Zuckerlösung (von 1 % Pepton und 1–5 % Rohrzucker) zur Verwendung. In diesem Medium trieben die benutzten Pollenkörner in einigen Stunden sehr gut entwickelte, oft spiralig gewundene Schläuche. Dagegen erwies sich das Asparagin recht schädlich, selbst wenn es in Zuckerlösung geboten wurde; Harnstoff, der nach den interessanten Untersuchungen von HANSTEEN¹⁾ bei Gegenwart von Zucker eine sehr reichliche Eiweissbildung in den *Lemna* wurzeln hervorruft, wirkte auch zu schädlich um hier Verwendung finden zu können.²⁾

Nach Ablauf einiger Stunden wurde der nunmehr mit gekeimten Pollenkörnern beschickte Objectträger aus der feuchten Kammer herausgenommen, und der Tropfen während einer Minute den Dämpfen einer 2-procentigen Osmiumsäurelösung ausgesetzt. Dann wurde das dest. Wasser, resp. die Zucker-Peptonlösung vorsichtig mit Fliesspapier abgesogen, die meistens zu einer filzartigen Decke verflochtenen Schläuche mit dest. Wasser ausgewaschen und mit ein Paar Tropfen der KEISERSCHEN Sublimatessiglösung begossen. Nach Ablauf einiger Stunden wurde die Sublimatlösung entfernt, die Schläuche noch einmal mit dest. Wasser gewaschen, und dann auf dem Objectträger mit der Färbeflüssigkeit tingirt.

Als Färbemittel benutzte ich vorreigend ein rothblaues Gemisch von Fuchsin und Jodgrün, das gewöhnlich nach der ZIMMERMANN'SCHEN Vorschrift³⁾ zusammengesetzt war, oder unter Umständen auch etwas verdünnt wurde. Im Allgemeinen wurde die Einwirkung der Farbstoffe direkt unter dem Mikroskope verfolgt, und nach erzielter Färbung mit Wasser ausgewaschen. Wenn eine Überfärbung stattgefunden hatte, wurde mit dem von ZIMMERMANN empfohlenen essigsäurehaltigen Alcohol differenzirt, doch musste dies sehr vorsichtig geschehen, weil sich sonst fast sämtliche Inhaltsbestandtheile der Schläuche entfärbten.

III. Beobachtungen und Resultate.

Agapanthus umbellatus. Die Pollenkörner dieser Pflanze keimen sehr schön in dest. Wasser und treiben in 3–5 Stunden lange Schläuche, die noch eine geraume Zeit

¹⁾ HANSTEEN, Beiträge zur Kenntniss der Eiweissbildung etc., Ber. d. deutsch. bot. Ges. 1896, pag. 362.

²⁾ Cfr. LIDFORSS, Zur Biologie des Pollens, pag. 33.

³⁾ Cfr. pag. 7.

lebendig bleiben. In den ausgewachsenen Schläuchen bildet das Plasma streckenweise nur eine dünne, der Membran anliegende Schicht; höchstens die vordere Hälfte des Schlauches wird von Plasma vollständig ausgefüllt, und auch hier sind meistens beträchtliche Vacuolen vorhanden. In den ausgewachsenen Schläuchen lässt sich meistens nur ein Kern nachweisen; dieser ist entschieden kyanophil und hebt sich bei Behandlung mit Fuchsinjodgrün sehr deutlich als ein fast homogener, blauer, ziemlich stark lichtbrechender Körper im dem granulirten, intensiv rothgefärbten Cytoplasma ab. Er repräsentirt offenbar den generativen Kern, während dagegen der vegetative Kern in diesem Stadium meistens nicht mehr nachweisbar ist. Selten hatte sich der generative Kern getheilt, sodass zwei kyanophile Kerne vorhanden waren.

In 4 % Rohrzuckerlösungen fanden sich ungefähr dieselben Verhältnisse, nur warer in diesem Falle die Schläuche etwas länger wie in den H₂O-Culturen. Die Kerne verhalten sich ganz in derselben Weise wie in der vorigen Cultur.

In Zuckerpeptonlösungen keimen die Pollenkörner von *Agapanthus* auch ziemlich rasch und treiben sehr schön entwickelte Schläuche. Diese sind von der Basis bis zur Spitze von einem dicken, aus Eiweisstoffen bestehenden Schleim ausgefüllt; Vacuolen sind überhaupt nicht innerhalb des Cytoplasmas zu sehen. Der vegetative Kern wird in diesen Schläuchen auffallend lange erhalten; bei Behandlung mit Fuchsin-jodgrün reagirt er deutlich erythrophil. Sehr stark erythrophil ist auch das Cytoplasma. Der generative Kern ist aber auch in diesen Culturen entschieden kyanophil, und schimmert durch das intensiv rothgefärbte Cytoplasma als ein linsförmiger, sehr deutlich im Blau tingirter Körper. Hatte das Cytoplasma allzuviel Fuchsin gespeichert, so war die blaue Färbung zuweilen verdeckt, sie konnte dann aber durch Auswaschen mit essigsäurem Jodalkohol wieder sichtbar gemacht werden; durch kräftiges Auswaschen wurde leicht ein Stadium erreicht, wo sowohl das Cytoplasma wie der vegetative Kern vollständig entfärbt waren, während dagegen der generative Kern intensiv blaugrün tingirt war. Nucleolen waren in dem generativen Kerne nicht zu sehen.

In den meisten Schläuchen der Zucker-Pepton-Culturen konnte nur ein generativer Kern konstatiert werden, allein es fanden sich auch Schläuche, in denen der betreffende Kern sich in zwei getheilt hatte. In diesen Schläuchen, die im Allgemeinen sehr kräftig und von Eiweisstoffen gefüllt waren, verhielten sich die entstandenen Tochterkerne durchaus kyanophil. Auch bei den stärksten mir zugänglichen Vergrößerungen konnten in diesen Kernen keine Nucleolen entdeckt werden; sie bestanden, soweit die mikroskopische Beobachtung ergeben konnte, ausschliesslich aus kyanophil reagirender Chromatinsubstanz.

Imanthophyllum sp. Die Pollenkörner einer in den Gewächshäusern des bot. Gartens zu Lund cultivirten *Imanthophyllum*-Art keimen sehr schön in dest. Wasser, und treiben auch in Zuckerpeptonlösungen gut entwickelte Schläuche. Von den H₂O-Culturen gilt ungefähr dasselbe, was bezüglich der vorigen Art erwähnt

wurde. In den Schläuchen der Zuckerpepton-Culturen hat offenbar eine sehr reichliche Eiweissbildung stattgefunden, da dieselben in ihrer ganzen Länge von einer stark lichtbrechenden, mit Fixierungsmitteln gerinnenden Substanz ausgefüllt sind. In diesen Schläuchen findet man recht häufig sowohl Karyokinesen des generativen Kernes wie auch völlig ausgebildete Tochterkerne. Letztere zeigen sich bei Behandlung mit Fuchsinjodgrün entschieden kyanophil; von Nucleolen ist keine Spur zu entdecken. In einigen Schläuchen konnten drei oder sogar vier kyanophile Substanzansammlungen wahrgenommen werden, und es hatte demnach den Anschein, als ob sich der eine resp. die beiden generativen Kerne ein zweites Mal getheilt hatten. Soviel ich habe finden können, war dies aber nie der Fall, sondern die betreffende Erscheinung beruhte darauf, dass sich bei der Karyokinese einzelne Chromosomen oder gruppen von Chromosomen aus ihren normalen Bahnen abgelenkt worden waren und dann im Cytoplasma als selbständige, kyanophile Centra erschienen.

Von den übrigen untersuchten Arten lieferten hauptsächlich einige *Tulipa*- und *Narcissus*-Arten brauchbares Material. Da die näheren Details aber vollständig mit den soeben geschilderten Verhältnissen bei *Agapanthus* und *Imanthophyllum* übereinstimmen, dürfte eine nähere Beschreibung überflüssig sein.

Das theoretische Interesse der jetzt referirten Thatfachen liegt darin, dass die kyanophile Reaction der männlichen Sexualzellen bei den untersuchten Angiospermen nicht auf Ernährungsverhältnisse zurückzuführen ist.

Eine Abänderung in der Chromatophilie des männlichen Sexual-Kerns hätte sich auf zweierlei Weise kundgeben können: entweder hätte die Chromatinsubstanz erythrophile Eigenschaften bekommen ¹⁾ (etwa wie das Chromatingerüst der Archespor- und Ei-Zellen), oder es hätten sich innerhalb des Kerns Nucleolen ausbilden können. Von diesen beiden Alternativen wurde keines realisiert. Obgleich in den Zuckerpepton-Culturen eine sehr reichliche Eiweissbildung innerhalb der Schläuche statt fand, so dass sich die Theilung des generativen Kernes in einem an Eiweisstoffen überreichen Cytoplasma abspielte, wurde die chromatische Reaction der Tochterkerne gar nicht verändert.

Die Ansicht STRASBURGERS, dass die verschiedenartige Chromatophilie der männlichen und weiblichen Sexualkerne in den Ernährungsverhältnissen begründet sei, hat sich demnach bezüglich der von mir untersuchten Angiospermen als unhaltbar erwiesen. Ob dieser Ansicht sonst irgend welche Gültigkeit zukommt, darüber müssen künftige Untersuchungen entscheiden.

¹⁾ Eine derartige Abänderung der Chromatophilie hätte bezüglich der Chromatinsubstanz sehr wohl nur auf physikalischen Verschiedenheiten beruhen können, ohne dass die chemische Beschaffenheit der fraglichen Gebilde verändert wäre; cfr. A. FISCHER, Untersuchungen über den Bau der Cyanophyceen und Bacterien, p. 4—14. Anders verhält es sich in Bezug auf die chromatische Differenz zwischen Chromatingerüst und Nucleolen, deren chemische und morphologische Ungleichwerthigkeit zu jeder Zeit am lebenden Material constatirt werden kann.

Litteraturverzeichnis.

- AUERBACH, Zur Kenntniss der thierischen Zellen, Sitzungsber. d. Kgl. Preuss. Akad. d. Viss., 26 Juni 1890.
 — —, Ueber einen Sexuellen Gegensatz in der Chromatophilie der Keimsubstanzen, ibidem, 25 Juni 1891.
 FISCHER, ALFRED, Zur Kenntniss der Embryosackentwicklung einiger Angiospermen, Jenaische Zeitschr. f. Naturw. 1880, Bd. 16.
 — —, Untersuchungen über den Bau der Cyanophyceen und Bacterien, Jena 1897.
 GUIGNARD, Recherches sur la structure et la division du noyau cellulaire, Ann. d. sc. nat. Bot. Sér. 6. T. 17, pag. 1.
 — —, Recherches sur le sac embryonnaire des phanerogames angiospermes, ibidem, T. 13, pag. 136.
 — —, Nouvelles études sur la fécondation, ibidem, Sér. 7, T. 14, pag. 163.
 HANSTEEN, Beiträge zur Kenntniss der Eiweissbildung etc. Ber. d. deutsch. botan. Ges. 1896, pag. 362.
 HOFMEISTER, Über die Entwicklung des Pollens, Botan. Zeit. 1848, Sp. 425.
 HUMPHREY, Über Nucleolen und Centrosomen, Ber. d. deutsch. botan. Gesellsch. 1894, pag. 108.
 — —, On some constituent of the cell, Annals of Botany, Vol. IX (1895), p. 561.
 KLECKER, Studien über die Gerbstoffvacuolen, Bih. till K. Vet. Akademiens handlingar, Bd. 13, N:o 3.
 LIDFORSS, Zur Biologie des Pollens, Jahrbücher f. wissenschaftl. Botanik, Bd. XXIX, Heft. 1.
 MOLISCH, Zur Physiologie des Pollens, Sitz.-ber. d. kaiserl. Ak. d. Wiss. in Wien, Mathem.-naturw. Classe, Bd. C II, Abth. I. Juli 1893.
 OVERTON, On the reduction of the chromosomes in the nuclei of plant, Annals of Botany, 1893, Vol. VII, N:o 25.
 — —, Mikrotechnische Mittheilungen, Zeitschr. f. wissensch. Mikroskopie, Bd. VII, p. 1.
 PFEFFER, Zur Kenntniss der Plasmahaut und der Vacuolen, Abhandl. d. mathem. phys. Cl. d. K. Sächs. Ges. d. Wiss. Bd. 16.
 RAWITZ, Leitfaden für histologische Untersuchungen, Jena 1895.
 ROSEN, Beiträge zur Kenntniss der Pflanzenzellen, Cohn's Beiträge, Bd. V, p. 443.
 — —, Beiträge zur Kenntniss der Pflanzenzellen III, ibidem, Bd. VII, p. 231.
 SCHOTTLÄNDER, Beiträge zur Kenntniss des Zellkerns und der Sexualzellen bei Kryptogamen, Cohn's Beiträge, Bd. 6, P. 267.
 STRASBURGER, Über den Theilungsvorgang der Zellkerne und das Verhältniss der Zelltheilung, Arch. f. mikroskop. Anatomie, Bd. XXI, p. 550.
 — —, Die Kontroversen der indirecten Kerntheilung, ibidem, Bd. XXIII, p. 246.
 — —, Histologische Beiträge, Heft I, Jena 1888.
 — —, „ „ „ „ Heft IV, Jena 1892.

- STRASBURGER, Karyokinetische Probleme, Jahrb. f. wissenschaftl. Botanik, Bd. XXVIII, Heft 1.
 — —, Das botanische Praktikum, dritte Auflage, Jena 1897.
 TANGL, Die Kern und Zelltheilungen bei der Bildung des Pollens von *Hemerocallis fulva*, Denkschriften d. kaiserl. Ak. d. Wissensch. Mathem. naturw. Classe. Bd. 45. Abth II, pag. 65.
 TREUB & MELLINK, Notice sur le développement du sac embryonnaire dans quelques Angiospermes, Arch. néerlandaises d. Sc. exactes et nat. 1880, T. 15, p. 452.
 ZACHARIAS, Über den Nucleolus, Botan. Zeit. 1885, Sp. 257.
 — —, Über Chromatophilie, Ber. d. deutsch. bot. Ges. 1893, p. 1887.
 ZIMMERMANN, Botanische Mikrotechnik, Tübingen 1891.
 — —, Über das Verhalten der Nucleolen während der Karyokinese, Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pflanzenzelle, Bd. 2, p. 1.
 — —, Über die chemische Zusammensetzung des Zellkerns, Zeitschr. f. wissenschaftl. Mikroskopie, 1896, p. 458.
 — —, Die Morphologie und Physiologie des pflanzlichen Zellkernes, Jena 1896.

Erklärung der Abbildungen.

Sämtliche Figuren sind mit Hülfe der Camera lucida unter Verwendung eines LEITZschen Immersionssystemes (Homog. Im. $\frac{1}{12}$ Oc. III) gezeichnet. Die Figuren 10, 11 und 12 sind dann auf $\frac{2}{3}$ verkleinert worden. — In den mit FLEMMINGScher Flüssigkeit fixirten Präparaten ist die Färbung auf den Bildern etwas schematisirt.

Fig. 1. *Tulipa silvestris*, Junger Embryosack, Fixirung: KEISERSche Flüssigkeit; Färbung: Fuchsinjodgrün.

Fig. 2. *Tulipa silvestris*, Sichelstadium. Fixirung: FLEMMINGSche Flüssigkeit; Färbung: Fuchsinjodgrün.

Fig. 3. *Tulipa silvestris*, Sichelstadium. Fixirung: Sublimataalcohol; Färbung: Fuchsinjodgrün.

Fig. 4. *Tulipa Gesneriana*, Sichelstadium. Fixirung: KEISERSche Flüssigkeit; Färbung: Fuchsinjodgrün.

Fig. 5. *Tulipa silvestris*, Sichelstadium. Fixirung: Heisser Wasserdampf, Härtung mit Alcohol; Färbung: Fuchsinjodgrün.

Fig. 6. *Tulipa silvestris*, Altes Sichelstadium, rings um den Kern Kinoplasmabildung. Fixirung: FLEMMINGSche Flüssigkeit; Färbung: Fuchsinjodgrün.

Fig. 7. *Fritillaria imperialis*, Sichelstadium. Fixirung: MERKELSche Flüssigkeit; Färbung: Fuchsinjodgrün.

Fig. 8. *Fritillaria Meleagris*, Sichelstadium; der Nucleolus beim Schneiden an der Mitte abgesprungen. Fixirung: MERKELSche Flüssigkeit; Färbung: Fuchsinjodgrün.

Fig. 9. *Fritillaria Meleagris*, Stadium unmittelbar vor dem Sichelstadium. Fixirung: MERKELSche Flüssigkeit; Färbung: Fuchsinjodgrün.

Fig. 10. *Lilium tigrinum*, Sichelstadium. Fixirung: abs. Alcohol; Färbung: Fuchsinjodgrün.

Fig. 11. *Lilium tigrinum*, Älteres Sichelstadium, beginnende Kinoplasmabildung. Fixirung: FLEMMINGSche Flüssigkeit, Färbung: Fuchsinjodgrün.

Fig. 12. *Lilium tigrinum*, Nach beendetem Sichelstadium ist der Nucleolus wieder in das Centrum des Kernes gerückt. Fixirung: abs. Alcohol (deshalb keine Kinoplasmadifferenzirungen sichtbar); Färbung: Fuchsinjodgrün.

Fig. 13 u. 13 b. *Oenothera biennis*, Sichelstadium. Fixirung: abs. Alcohol; Färbung: Fuchsinjodgrün.

Fig. 14 u. 14 b. *Papaver bracteatum*, Sichelstadium. Fixirung: abs. Alcohol; Färbung: Fuchsinjodgrün.



B. Lidfors gez.

Gen. Stud. Lit. Aust. Stocli.