

Die Bedeutung der Methoden der botanischen Mikrotechnik für die pflanzliche Mikrochemie und Histochemie.

Von **Josef Kissler**.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität Wien.)

(Eingelangt am 19. Juni 1929.)

Durch die grundlegenden Arbeiten von PREGL, EMICH, BEHRENS, DONAU u. a. hat in den letzten Dezennien die Mikrochemie in qualitativer und quantitativer Hinsicht einen derartigen Aufschwung genommen, daß sich die verschiedensten Disziplinen diese Erfolge für ihre Gebiete zunutze gemacht haben. Daß dabei die einzelnen Disziplinen, die sich bei ihren Untersuchungen mikrochemischer Methoden bedienen, die Methodik der „reinen“ Chemie oft nicht glatt übernehmen können, sondern sie erst für ihre Zwecke zurecht und der gegebenen Materie anpassen müssen, ist wohl klar und selbstverständlich. Auf diese Weise erhielt aber der Begriff der Mikrochemie etwas Unbestimmtes und er wird daher von verschiedener Seite auch in verschiedenem Sinne gebraucht, worauf schon TUNMANN¹⁾ im Vorworte zu seinem Buche hinweist. Diese Unbestimmtheit des Begriffes hat sich aber auch auf einem engen Gebiete bereits bemerkbar gemacht, auf dem Gebiete, das sich mit der mikrochemischen Untersuchung der Pflanzen beschäftigt, wo die Begriffe „Pflanzenhistochemie“ und „Pflanzenmikrochemie“ bald im gleichen Sinne gebraucht werden, bald die Histochemie als ein spezieller Teil der Pflanzenmikrochemie hingestellt wird. Durch eine präzise Terminierung hier Klarheit zu schaffen, insbesondere den Begriff der pflanzlichen Histochemie scharf zu umschreiben und abzugrenzen, schien mir vor allem notwendig, bevor auf die mikrotechnischen Methoden, welche in den Dienst der pflanzlichen Mikrochemie treten können, näher eingegangen wird.

TUNMANN¹⁾ bezeichnet, um Mißverständnisse auszuschließen, das Gebiet, das sich nur mit pflanzlichen Objekten beschäftigt, als „botanische Mikrochemie“, „Phytomikrochemie“ oder als „Pflanzenmikrochemie“ und wählt letztere Bezeichnung auch als Titel für sein Buch. Aus denselben Erkenntnissen heraus hat

¹⁾ TUNMANN O., Pflanzenmikrochemie, Berlin 1913.

MOLISCH²⁾), unabhängig von TUNMANN, sein Buch als „Mikrochemie der Pflanze“ bezeichnet. Was nun die engere Abgrenzung des Begriffes der „Pflanzenmikrochemie“ anlangt, so wollen wir zuerst den Ausführungen TUNMANN's folgen: „Wir wählen die Bezeichnung Pflanzenmikrochemie, da sich seit langem die Ausdrücke Pflanzenanatomie, Pflanzenphysiologie u. a. eingebürgert haben und weil sich eine Trennung des großen Gebietes in eine reine und in eine angewandte Pflanzenmikrochemie anbahnt. Das vornehmste Ziel der reinen Pflanzenmikrochemie liegt in dem Nachweis der Körper in der Zelle selbst und im Gewebe sowie in der eingehenden Charakteristik der Zellwände und der organisierten Bestandteile der Zelle. Hauptaufgabe der angewandten Pflanzenmikrochemie ist der tunlichst unmittelbar mit den pflanzlichen Objekten am Objektträger ausgeführte Nachweise der Pflanzenstoffe bei möglichst geringem Aufwand an Zeit und Material.“ Trotzdem scheint es in machen Fällen Schwierigkeiten zu bereiten, die Pflanzenmikrochemie gegen die reine Mikrochemie abzugrenzen und diese Schwierigkeiten hat auch TUNMANN empfunden, wenn er sagt: „Die Grenze zwischen Pflanzenmikrochemie und reiner Mikrochemie kann nicht scharf gezogen werden, gegenwärtig, da die letztere sich noch vorwiegend mit anorganischen Körpern beschäftigt, vielleicht noch leichter als in Zukunft. Im allgemeinen aber kann man sagen, daß alle Arbeiten, die sich direkt mit den pflanzlichen Objekten, und zwar in einfacher Weise am Objektträger ausführen lassen, in unser Gebiet fallen. Daraus geht hervor, daß Arbeiten, die von schwieriger herzustellenden Zubereitungen (Auszügen, gereinigten Lösungen) ausgehen, uns schon ferner liegen. Doch, es sei nochmals betont, diese Abgrenzung ist nicht scharf. Neigungen und Fähigkeiten des Einzelnen werden die Grenze bald nach der chemischen, bald nach der physikalischen, speziell kristallographischen Seite verschieben.“ Vorstehenden Ausführungen zufolge ist mit dem Begriffe der Pflanzenmikrochemie die Ausführung der Reaktionen direkt mit dem pflanzlichen Objekt innigst verknüpft. Eine Vertiefung der Reaktionen nach der chemischen, physikalischen und kristallographischen Seite wird jedoch die Grenzen der Pflanzenmikrochemie kaum verwischen, vielmehr eine wertvolle Erweiterung und Verfeinerung für sie mit sich bringen. Das kann für die Pflanzen-

²⁾ MOLISCH H., Mikrochemie der Pflanze, 3. Aufl., Jena 1924.

mikrochemie nur von Vorteil sein. In gewissen Fällen hat es nun tatsächlich den Anschein, als ob die Grenze zwischen reiner Mikrochemie und Pflanzenmikrochemie eine sehr unscharfe wäre. Dies ist z. B. bei den Sublimationsmethoden der Fall, einer an und für sich rein chemischen Manipulation; und trotzdem würde wohl niemand die Sublimationsmethoden als nicht zur Methodik der Pflanzenmikrochemie gehörig ansehen, wo sie doch den Nachweis gewisser Stoffe aus einem Schnitt oder einem Pflanzenfragment gestatten.

Diese Unsicherheit, wo hört die Pflanzenmikrochemie auf und wo fängt die reine Mikrochemie an, ist nur der Ausdruck einer fehlenden präzisen Abgrenzung des Begriffes der Pflanzenmikrochemie. Diese soll im folgenden nun vorgenommen werden. Die sich bei pflanzenmikrochemischen Untersuchungen nur angenehm bemerkbare Zeitökonomie ist keine Besonderheit der Pflanzenmikrochemie, sondern vielfach Gemeingut aller mikrochemischen Reaktionen. Auch der Umstand, daß das Reaktionsprodukt mit Hilfe des Mikroskopes kontrolliert und untersucht wird und daß viele Reaktionen direkt unter dem Mikroskope vorgenommen und verfolgt werden können, gilt für alle Zweige der Mikrochemie, dergleichen auch, daß die Reaktionen vielfach auf Objektträgern oder auf ähnlichen Unterlagen ausgeführt werden. Dadurch wird nur die mikroskopische Untersuchung und Kontrolle ermöglicht. Die Pflanzenmikrochemie kann also nur durch solche Momente charakterisiert werden, welche direkt mit der Pflanze zusammenhängen und die sich folgendermaßen zusammenfassen lassen:

1. Die mikrochemischen Reaktionen müssen direkt an oder mit dem pflanzlichen Material vorgenommen werden.

2. Zur Ausführung der Reaktion genügt ein kleines Stück von pflanzlichem Gewebe, in den Ausmaßen, wie es sonst zur mikroskopischen Untersuchung verwendet wird. Dabei ist es gleichgültig, ob das Material als Schnitt, Mazerat, Pulver oder in sonst einer Form vorliegt. Die Mengenverhältnisse werden sich am besten in der Art umschreiben lassen, daß die Menge derart ist, daß die Reaktion bequem auf dem Objektträger vorgenommen und das Material bequem von einem Deckglas bedeckt werden kann.

3. Die Reaktionen mit Auszügen, Preßsäften oder dergleichen gehören nur dann in den Bereich der Pflanzenmikrochemie, wenn sie ohne komplizierte Methodik aus kleinen Gewebsfragmenten auf dem Objektträger hergestellt und gewonnen werden können. Bei

der Untersuchung und Prüfung von Pflanzenaschen kann nur dann von pflanzenmikrochemischer Untersuchung gesprochen werden, wenn nur solche Mengen von Asche verwendet werden, wie dies sonst zur mikroskopischen Untersuchung geschieht.

4. Die ganze Art der Ausführung und der Methodik der Pflanzenmikrochemie bringt es mit sich, daß die hierher gehörenden Reaktionen nur qualitativer Natur sein können. In quantitativer Hinsicht kann das Vorhandensein oder Fehlen eines Stoffes festgestellt werden, ferner können auch bis zu einem gewissen Grade die relativen Mengenverhältnisse abgeschätzt werden. Nur bei Sublimationen ist unter gewissen Voraussetzungen eine genaue Erfassung der Menge der sublimierten Substanz durch Wägung möglich.

Die hier vorgenommene Abgrenzung des Begriffes der Pflanzenmikrochemie ist derart, daß sie Unklarheiten nicht mehr zuläßt. Vor allem zeigt sie klar und deutlich, daß nicht jedes chemische Arbeiten mit Pflanzenmaterial, auch wenn man sich dabei gewisser Mikromethoden bedient, Pflanzenmikrochemie ist. Die Reindarstellung, Untersuchung und Analyse irgendeines Pflanzenkörpers mit Hilfe von Mikromethoden hat mit Pflanzenmikrochemie nichts zu tun. Die einzige Beziehung zur Pflanze bei dieser rein chemischen Arbeit ist die, daß ein Pflanzenprodukt vorliegt, das aus dem Pflanzenmaterial extrahiert und gewonnen werden muß. Die biochemische Forschung, deren Aufgabe es ist, die chemischen Vorgänge im lebenden Organismus in qualitativer und quantitativer Hinsicht zu erfassen, bedient sich im allgemeinen der üblichen chemischen Methoden. Die spezielle Fragestellung und die Arbeit mit biologischem Material überhaupt erheischt jedoch in vielen Fällen eine besondere Zurichtung und Anpassung der einzelnen Methoden. Daß sich auch die Biochemie im weitestgehenden Maße der mikrochemischen Methoden bedient, ist nahelegend und selbstverständlich, um so mehr, als in den weitaus meisten Fällen nur mit sehr geringen Stoffausbeuten zu rechnen ist. Die pflanzliche Mikro-Biochemie ist aber nicht dasselbe wie Pflanzenmikrochemie, wenn auch in gewissen Fällen die Pflanzenmikrochemie der pflanzlichen Mikro-Biochemie unterzuordnen ist und ein Teilgebiet von ihr darstellt. Die Gesamtheit der mikrochemischen Methoden, die bei der Pflanzenuntersuchung im weitesten Sinne Verwendung finden, lassen sich als die große Gruppe der mikrochemischen

Methoden zur Erforschung des Chemismus und der chemischen Leistungen des Pflanzenorganismus zusammenfassen.

Schon TUNMANN hat das große Gebiet der Pflanzenmikrochemie in eine reine und in eine angewandte Pflanzenmikrochemie geteilt. Während es Aufgabe der angewandten Pflanzenmikrochemie ist, allgemein den Nachweis eines Stoffes zu führen und dessen Vorhandensein oder Fehlen aufzuzeigen, was für diagnostische Zwecke, für systematisch-anatomische Studien und für die Entscheidung gewisser biochemischer Fragen von großem Vorteil ist, gilt es als oberstes und vornehmstes Ziel der reinen Pflanzenmikrochemie, den Nachweis der einzelnen Stoffe so zu führen, daß sie an der Stelle angezeigt werden, wo sie in der lebenden Pflanze auch lokalisiert sind. Die reine Pflanzenmikrochemie begnügt sich demnach nicht mit dem Nachweis von Stoffen im Pflanzengewebe an und für sich, sondern hat deren lokalisierten Nachweis zum Ziele und wird dadurch unter anderem auch für anatomische und anatomisch-physiologische Zwecke wertvoll. An Stelle der Bezeichnung „reine Pflanzenmikrochemie“ wird auch die Bezeichnung „pflanzliche Histochemie“ gebraucht und wir wollen uns im folgenden auch stets dieser Bezeichnung bedienen.

Ein großer Teil der gegenwärtig der Histochemie zur Verfügung stehenden Reaktionen entspricht keineswegs den Anforderungen, die bezüglich eines lokalisierten Nachweises an sie gestellt werden müssen. Die Ursachen hierfür sind mannigfacher Natur, wie geringe Empfindlichkeit der Reaktionen, langsamer Eintritt der Reaktion und damit Gefahr einer Translokation der Stoffe und dergleichen. Es bedarf daher die Histochemie noch einer sehr weitgehenden Ausgestaltung, die sich einerseits auf die Durcharbeitung der bestehenden und die Schaffung von neuen Reaktionen erstrecken wird, andererseits wird auch in methodischer Hinsicht manches Neue zu schaffen sein und es werden die Methoden und Erfahrungen der verschiedensten Zweige der Mikrotechnik in einem weiteren Maße als bisher in den Dienst der Histochemie treten müssen. Da wir heute noch weit davon entfernt sind, den Nachweis der einzelnen Stoffe absolut lokalisiert führen zu können, andererseits ein absolut lokalisierter Nachweis nicht in allen Fällen unbedingte Notwendigkeit ist, so werden wir bei unseren histo-

chemischen Reaktionen im allgemeinen drei Arten von Lokalisierungen unterscheiden müssen. Demnach kann der Nachweis sein:

1. gewebslokalisiert,
2. zellokalisiert,
3. absolut lokalisiert.

Der ideale Nachweis ist entschieden der absolut lokalisierte, wo die Stoffe innerhalb der Zelle am Orte ihres Vorhandenseins angezeigt werden. Über solche Nachweismöglichkeiten verfügt die Histochemie nur in beschränktem Maße. Die meisten von ihnen stellen Farbenreaktionen dar und betreffen den Nachweis mehr oder minder fester Bestandteile der Zellwand (Holz, Zellulose, Pektin, Kutin, Suberin) oder gewisser fester Zellinhaltsstoffe (z. B. Stärke, Kristalle u. a.), in seltenen Fällen zähflüssiger oder flüssiger Zellbestandteile. Einfacher liegen die Verhältnisse schon bei dem zellokalisierten Nachweis. Hier zeigen uns die Reaktionen an, in welchen Zellen ein bestimmter Stoff vorkommt, ohne daß damit dessen nähere Lagerung oder Verteilung innerhalb der Zelle zum Ausdruck kommt. Dringen die Reagentien nur sehr langsam in das Zellinnere ein oder läßt der Ausfall einer Reaktion, nachdem durch das Reagens die Zellen getötet worden sind, sehr lange auf sich warten, so kann es während dieser Zeit zu stofflichen Verlagerungen und zu einem Herausdiffundieren der Stoffe aus den Zellen kommen. In diesen Fällen ist dann auch ein zellokalisierter Nachweis nicht mehr möglich und man kann auf Grund des Reaktionsausfalles höchstens feststellen, innerhalb welcher Gewebe oder Gewebsgruppen ein bestimmter Stoff vorkommt. Die Gewebslokalisierung kann dadurch erleichtert werden, daß man die zur Ausführung der Reaktion bestimmten Schnitte schon derart zurechtet, daß sie nur eine bestimmte Gewebeart enthalten.

Schließlich erscheint es noch notwendig, kurz die Frage zu streifen, was sich mit Hilfe der histochemischen Reaktionen erreichen läßt und welche Grenzen der Histochemie gesetzt sind. Wir können uns diesbezüglich an die Ausführungen von BRUNSWIK³⁾ halten, der in ungemein scharfsinniger Weise die Grenzen der Mikrochemie in der Biologie aufgezeigt hat. Was die Zellmikro-

³⁾ BRUNSWIK H., Die Grenzen der mikrochemischen Methodik in der Biologie. (Die Naturwissenschaften, Jahrg. 1923, S. 881 bis 885.)

chemie bisher erreicht hat, ist der Nachweis und die Lokalisationsermittlung von Reserve- und Gerüstsubstanzen, von Sekreten und Exkreten der Zelle sowie von Stoffwechselprodukten, die in reichlicher Menge auftreten und angehäuft werden. Trotz der enormen Empfindlichkeit gewisser Reaktionen ist die Histochemie aber nicht in der Lage, Stoffwechselfragen einer Klärung zuzuführen, da es dazu noch bedeutend empfindlicherer Reaktionen bedarf und über solche die Histochemie gegenwärtig nicht verfügt. Wenn sich auf histochemischem Wege trotzdem gelegentlich Stoffwandlungen in der Zelle oder in Geweben qualitativ erfassen lassen, so darf man dabei nie vergessen, daß es sich um einzelne besonders günstige Fälle handelt und daß dabei nur das Anfangs- und das Endglied der Reaktionskette erfaßt wird. In die dazwischen liegenden Vorgänge einzudringen, die Zwischen- und Übergangsprodukte nachweisen zu können, wird der Histochemie wie überhaupt der Pflanzenmikrochemie wohl durchweg versagt bleiben.

Daß die innigst mit dem Pflanzengewebe verknüpfte Histochemie ihre eigene, dem Substrat angepaßte Methodik braucht, ist selbstverständlich. Besonders werden aber in den Dienst der Histochemie und der Pflanzenmikrochemie überhaupt alle jene Methoden treten müssen, welche sonst zum Zwecke einer zytologischen oder histologischen Untersuchung uns die Möglichkeit geben, einen genaueren Einblick in den Feinbau der Zelle und der Gewebe zu gewinnen. Die Heranziehung dieser Methoden, der Methoden der Mikrotechnik, für histochemische Untersuchungen bringt viele und große Vorteile für die Histochemie mit sich und es sollen daher im folgenden die sich bietenden Möglichkeiten kurz skizziert werden, ohne daß an dieser Stelle auf die Handhabung der Methoden näher eingegangen wird. Das erübrigt sich um so mehr, als an anderer Stelle die einschlägige Methodik ausführlichst behandelt ist⁴⁾. Welcher Methode man sich im einzelnen Falle bedienen wird, hängt ganz von der Natur des zu verarbeitenden Materials ab, ob es lebend oder tot, fixiert, konserviert oder trocken ist, weiters welcher Natur die Stoffe sind, die einer histochemischen Prüfung unterworfen werden sollen.

Die größte Bedeutung für die Histochemie besitzt das Mikrotom

⁴⁾ KISSER J., Leitfaden der botanischen Mikrotechnik, Jena 1926; ferner: Der heutige Stand botanisch-mikrotechnischer Schneidemethoden. (*Biologia generalis*, Bd. 4, 1928, S. 131 bis 180.)

und die sich daran knüpfenden Schneidemetoden, welche heute einen derartigen Ausbau besitzen, daß sie die Zerlegung jedes Objektes in Schnitte von notwendigem Ausmaße und notwendiger Feinheit gestatten. Die Methodik wird sich danach richten müssen, ob lebendes oder totes, hartes oder weiches Material vorliegt. Wo besonders dünne Schnitte notwendig sind, wird man, falls dies unbeschadet der nachzuweisenden Stoffe geschehen kann, auch zu Einbettungen des Materials greifen, wobei sich die Auswahl der Einbettungsmasse wieder dem einzelnen Falle anpassen muß. Es stehen uns ja eine Reihe von verschiedenen Einbettungsmöglichkeiten zur Verfügung, solche, welche eine völlige Entwässerung des Materials beanspruchen (Paraffin, Zelloidin) und solche, bei denen das Material eine Entwässerung nicht durchmachen muß (Glycerin-Gelatine, Agar, Gummi) und es daher auch nicht mit verschiedenen organischen Solventien in Berührung zu kommen braucht. Sonst wird totes Material je nach seiner Konsistenz zur Erzielung entsprechender Schnitte verschieden behandelt werden müssen. Gut schneidbares kann direkt geschnitten werden, zu hartes muß erweicht, zu weiches gehärtet werden. Die Art der Härtung und Erweichung muß dabei wiederum auf die im Gewebe vorhandenen und nachzuweisenden Stoffe Rücksicht nehmen.

Besonders wichtig für histochemische Untersuchungen ist die Möglichkeit des direkten Schneidens von lebendem Material mit dem Mikrotom, wenn dies auch im allgemeinen nicht so einfach wie von totem und in seiner Konsistenz entsprechend beeinflussbarem Material ist. Um ein Austrocknen und damit ein Absterben des lebenden Materials beim Schneiden zu verhindern, muß es gut befeuchtet werden. Die Schwierigkeiten, die sich beim Befeuchten des Messers mit Wasser stets einstellen, indem sich dieses infolge seiner großen Oberflächenspannung nicht längs der Schneide auf dem Messer ausbreitete, konnten überwunden werden. Geringe Zusätze von Gelatine, Eiweiß oder Seife zum Wasser setzen dessen Oberflächenspannung sehr stark herab und ermöglichen dadurch dessen leichtes Ausbreiten längs der Messerschneide. Eine andere Schwierigkeit, kleine und weiche lebende Objekte ohne Beschädigung in die Objektklammer am Mikrotom einzuspannen, kann dadurch überwunden werden, daß das Material mit Paraffin umschlossen wird.

Die Schnitte von toten Materialien werden im allgemeinen nur für gewisse histochemische Untersuchung dienen können und ge-

eignet sein, während sie für pflanzenmikrochemische Untersuchungen im weitesten Sinne in viel ausgedehnterem Maße Verwendung finden können, wo es sich eben nur um den Stoffnachweis als solchen ohne Rücksicht auf die Lokalisierung handelt. Denn im getrockneten Material werden beim Trocknen die gelösten Inhaltsstoffe weitgehend verlagert, beim konservierten oder fixierten werden viele herausgelöst oder verändert. Hingegen lassen sich alle festen Bestandteile, wie die Gerüstsubstanzen, die festen Inhaltskörper und Kristalle, an solchem Material gut untersuchen. Für Membranstudien ist totes Material sogar vielfach unbedingt notwendig, da nur solches entsprechend vorbehandelt, gehärtet oder eingebettet werden kann und so die Anfertigung dünnster Schnitte gestattet. Werden doch für Untersuchungen über die Feinstruktur der Membranen oft Schnitte von nur wenigen μ Dicke benötigt.

Von lebendem Material lassen sich oft infolge der weniger günstigen Schneidekonsistenz nicht so dünne Schnitte wie von totem erhalten, doch sind so dünne Schnitte gar nicht notwendig, ja vielfach nicht einmal erwünscht und nur nachteilig. Werden von lebenden Geweben allzu dünne Schnitte hergestellt, so werden dabei die meisten Zellen angeschnitten, teilweise zerstört und aus den angeschnittenen Zellen können nun die löslichen Stoffe austreten und sich über die ganze Schnittfläche verteilen. Ein lokalisierter Nachweis ist unter solchen Umständen dann nur schwer zu führen. Es muß daher die Schnittdicke so bemessen werden, daß sie auf die Größe der Zellen Rücksicht nimmt und der Schnitt mindestens eine Lage von intakten Zellen enthält. Auf diesen Umstand wird bei der Ausführung von histochemischen Reaktionen nicht immer das notwendige Gewicht gelegt, insbesondere nicht bei der Anfertigung von Querschnitten durch Stengelorgane. Da nämlich die Zellen in den meisten Stengelorganen in der Längsrichtung sehr stark gestreckt sind, müssen relativ dicke Schnitte angefertigt werden, um nicht die meisten Zellen zu verletzen. Da dicke Schnitte die Beobachtung aber erschweren, so ist in vielen Fällen die Anfertigung von Längsschnitten vorzuziehen, da die Zellen in der Breite einen viel geringeren Durchmesser besitzen, oder man greift zur Anfertigung von Gefrierschnitten, worauf wir später noch zurückkommen werden. Bei jeder Anfertigung von Schnitten werden eine große Zahl von Zellen angeschnitten und verletzt. Um sich von den aus diesen herausgetretenen Stoffen unabhängig zu machen, wird es manchmal notwendig sein, die

Schnitte in fließendem Wasser gut zu waschen, um den Inhalt der angeschnittenen Zellen zu entfernen. Restlos wird dies aber wohl nicht immer gelingen.

In den Fällen, wo zell- und gewebslokalisierte Nachweise notwendig sind, kann auch die Gefriermethode wertvolle Dienste leisten. Bei dieser Methode wird das lebende Material auf dem Mikrotom durchgefroren, im gefrorenen Zustande geschnitten und die gefrorenen Schnitte können dann direkt in das Reagens übertragen werden. Da die Zellen durch das Gefrieren getötet werden, werden auch viele Reagentien bei solchen Schnitten in die Zellen viel leichter eindringen können. Die Verwendung der Gefriermethode für histochemische Zwecke geht auf MACALLUM⁵⁾ zurück, der sie bei tierischen Objekten verwendete und meines Wissens waren STOKLASA und MATOUSEK⁶⁾ die ersten, die sich ihrer auch bei pflanzlichen Objekten bedienen. Bei der Anfertigung von Gefrierschnitten für histochemische Zwecke ist es nur notwendig, daß die Schnitte am Messer gefroren bleiben. Die Messer müssen daher stark gekühlt werden, was am besten nach dem von KRAUSE⁷⁾ vorgeschlagenen Verfahren geschieht. Die Schnitte kommen gefroren in das Reagens, so daß eine stoffliche Verlagerung weder vor der Schnittanfertigung noch im Schnitte selbst möglich ist. Eventuell doch auftretende Veränderungen sind so geringfügig, daß sie kaum ins Gewicht fallen. Voraussetzung ist aber, daß die Reaktion rasch eintritt, da bei trägen Reaktionen und langsamem Auftreten des Reaktionsproduktes mit Verlagerungen zu rechnen ist.

Die hier kurz skizzierten Möglichkeiten der Anfertigung von Schnitten mit dem Mikrotom zeigen klar und deutlich, in wie vielen Fällen dieser Zweig der botanischen Mikrotechnik mit Erfolg in den Dienst der Histochemie treten kann, und es wird Aufgabe künftiger Untersuchungen sein, dieses Gebiet noch weiter zu vertiefen. Es braucht nicht besonders darauf hingewiesen werden, daß die botanische Mikrotechnik ebenso auch für die allge-

⁵⁾ MACALLUM A. B., Die Methoden der biochemischen Mikrochemie. (Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden, herausg. von ABDERHALDEN E., Bd. 5, 1911, Berlin-Wien.)

⁶⁾ STOKLASA J. und MATOUSEK A., Beiträge zur Kenntnis der Ernährung der Zuckerrübe, Jena 1916, S. 28.

⁷⁾ KRAUSE R., Enzyklopädie der mikroskopischen Technik, 3. Aufl., Bd. II

meine pflanzliche Mikrochemie bedeutungsvoll ist. In kurzen Zügen mögen im nachstehenden die Vorteile des Mikrotoms und der Mikrotomtechnik für die Histochemie und für die Pflanzenmikrochemie überhaupt zusammengefaßt werden.

1. Die Möglichkeit der Anfertigung zahlreicher Schnitte in kürzester Zeit, durch lebende wie durch tote Objekte, gestattet, viele Reaktionen in Parallele nebeneinander ausführen zu können. Nur so läßt sich ein erschöpfendes Bild gewinnen und nur so ist es möglich, eine Reaktion gründlich auf ihren Wert und ihre Brauchbarkeit studieren zu können.

2. Durch die Möglichkeit der Herstellung von Schnitten beliebiger, aber genau meßbarer Dicke kann die Schnittdicke stets der Struktur der einzelnen Gewebe angepaßt werden.

3. Da die Schnitte auch sämtliche eine gleichmäßige Dicke besitzen und große Schnittmengen von gewünschter Dicke in gleichem Maße hergestellt werden können, lassen sich leicht Vergleiche über die Mengenverhältnisse bestimmter Stoffe in den verschiedenen Geweben und Organen bei denselben Pflanzen und bei verschiedenen Pflanzen gewinnen.

4. Der Umstand, daß auch Schnitte von großen Dimensionen angefertigt werden können, ermöglicht an jedem Schnitt den sofortigen Überblick über die Stoffverteilung in gleichartigen und verschiedenen Geweben.

5. Beim Nachweis flüchtiger Verbindungen muß Schnitthanfertigung und Reaktion ungemein rasch aufeinander folgen. Auch hier leistet das Mikrotom überaus wertvolle Dienste und ermöglichte PECHE⁸⁾ den Nachweis der ungemein flüchtigen Zyanwasserstoffsäure in den Blättern von *Prunus Laurocerasus* L.

6. Schließlich sei hier noch auf eine von mir⁹⁾ mit Hilfe des Mikrotoms ausgearbeitete Methode hingewiesen, welche es gestattet, die Empfindlichkeitsgrenzen bei solchen mikrochemischen Reaktionen zu ermitteln, wo als Reagentien alkoholische Lösungen verwendet werden. Falls das Reaktionsprodukt in Alkohol weniger löslich als in Wasser ist, empfiehlt es sich, falls dies aus

⁸⁾ PECHE K., Mikrochemischer Nachweis der Zyanwasserstoffsäure in *Prunus Laurocerasus* L. (Sitzber. Kais. Akad. Wiss. Wien, mathem.-naturwiss. Kl., Abt. I, Bd. 121, 1912.)

⁹⁾ KISSER J., Beitrag zum histochemischen Nachweis des Kalziums. (Pharmazeutische Presse, Folge 4, 1923.)

sonstigen Gründen zugänglich ist, in Alkohol gelöste Reagentien zu verwenden, die auch gleichzeitig rascher und leichter in die Zellen eindringen. Da nun zu prüfende wässrige Lösungstropfen durch alkoholische Reagentien auf dem Objektträger verdrängt werden und es zu keiner innigen Mischung beider kommt, so kann man vorteilhaft folgendermaßen verfahren: Mit dem Mikrotom werden etwa 100 μ dicke Querschnitte durch Hollundermark hergestellt, von der Luft befreit, dann chemisch gereinigt und schließlich mit der zu prüfenden Lösung durchtränkt. Zu solchen Schnitten kann nun ein alkoholisches Reagens, ohne daß man Unzukömmlichkeiten befürchten muß, zugesetzt werden. Man erhält bei derartiger Ausführung der Reaktion gleichzeitig auch ein annäherndes Bild über die Form und die Größe, die Kristalle im Gewebe annehmen.

Nicht nur die Schneidemethoden, auch die übrigen Methoden der Mikrotechnik können mit Erfolg in den Dienst der pflanzlichen Mikrochemie und Histochemie treten und es eröffnet sich auch hier ein weites Gebiet für künftige Untersuchungen.

Manche Reagentien wirken derart energisch auf pflanzliche Gewebe ein, daß sie zum Verquellen gebracht oder ganz zerstört werden. Von einem lokalisierten Nachweis kann dann natürlich nicht mehr die Rede sein. Hier hat nun KRETZ¹⁰⁾ einen Weg gewiesen, der über derartige Schwierigkeiten hinwegführen kann. Beim Nachweis des Tryptophans in pflanzlichen Geweben mittels der VOISENET'schen Reaktion stellten sich insofern große Schwierigkeiten ein, als durch die notwendige Verwendung von konzentrierter Salzsäure ein rasches Diffundieren des gebildeten Farbstoffes eintrat, andererseits das Gewebe derart verquoll und erweicht wurde, daß es beim Auflegen des Deckglases zum Zweck der mikroskopischen Untersuchung zu einem strukturlosen Brei zerfloß. Über diese Schwierigkeit konnte aber KRETZ dadurch hinwegkommen, daß er die Gewebe durch ein künstliches Kieselsäureskelett widerstandsfähig machte. Die Schnitte werden zuerst kurz in eine wässrige Lösung von Natriumsilikat übertragen, worauf beim Übertragen in das Reagens durch die in ihm vorhandene Salzsäure die Kieselsäure in Freiheit gesetzt wird und als chemisch äußerst schwer angreifbares Gel ausfällt. Dieses Verfahren ermöglichte eine Verfestigung des Gewebes und gleichzeitig den lokali-

¹⁰⁾ KRETZ FR., Über den mikrochemischen Nachweis von Tryptophan in der Pflanze. (Biochem. Zeitschr., Bd. 130, 1922, S. 86 bis 98.)

sierten Nachweis des Tryptophans. In Verbindung mit einer Fixierung der Eiweißsubstanzen ließen sich selbst zytologische Details in der hochkonzentrierten Salzsäure untersuchen. Dieses Verfahren oder auf ähnlichen Prinzipien aufgebaute andere werden vielleicht zur Verfeinerung mancher Reaktionen beitragen können. Insbesondere ist auch daran zu denken, ob sich nicht gerade bei sehr empfindlichen Farbenreaktionen, die diffus sind und durch das Herausdiffundieren des Reaktionsproduktes an Brauchbarkeit für histochemische Untersuchungen verlieren, durch gewisse kolloidale Zusätze bedeutende Verbesserungen erzielen lassen, falls es dadurch gelingt, dem Herausdiffundieren entgegenzuwirken.

Eine anders geartete Verfestigung erweist sich auch manchmal bei Pflanzenaschen als notwendig. Durch Veraschung von pflanzlichen Schnitten oder Gewebstücken¹¹⁾ lassen sich leicht Anhaltspunkte bezüglich Menge und Verteilung der Mineralbestandteile gewinnen, insbesondere der Verkieselungen, die mit ihren feinsten Details und Strukturen in der Asche sehr klar und deutlich hervortreten. Gewebe, die in ihren Membranen nur sehr geringe Mengen von Mineralsubstanzen enthalten, liefern nach dem Verbrennen Aschen, die äußerst wenig widerstandsfähig sind und die bei noch so sorgsamer Verarbeitung zu einem Präparate gänzlich zerfallen. Dem kann dadurch abgeholfen werden, daß man nach einem auf meine Veranlassung vor kurzem von BLABENSTEINER¹²⁾ gearbeiteten Verfahren die Asche auf bestimmte Art mit Zelloidin durchtränkt und sie so ungemein verfestigt und widerstandsfähig macht.

Was die übrigen Verfahren der Mikrotechnik anlangt, so sei hier kurz noch auf die Mazerationsmethoden hingewiesen, die bei der Untersuchung von Membransubstanzen gute Dienste leisten können¹³⁾, ferner auf die verschiedenen Aufhellungsmittel, die je

¹¹⁾ Vergl. diesbezüglich die Literaturzusammenstellung bei KISSER J., Der heutige Stand botanisch-mikrotechnischer Schneidemetoden (Biologia generalis, Bd. 4, 1928, S. 131 bis 180); ferner sei hier auf eine umfassende Darstellung dieses Gebietes hingewiesen, die in nächster Zeit im Rahmen des ABDERHALDEN'schen Handbuches der biologischen Arbeitsmethoden erscheinen wird.

¹²⁾ BLABENSTEINER W., Über die Verwendung des Aschenbildes für die Bestimmung pharmakognostisch benützter Rinden. (Sitzber. Akad. Wiss. Wien, mathem.-naturwiss. Kl., Abt. I, 1928.)

¹³⁾ Vergl. z. B. ANDERSON D. B., Über die Struktur der Kollenchymzellwand auf Grund mikrochemischer Untersuchungen. (Sitzber. Akad. Wiss. Wien, mathem.-naturwiss. Kl., Abt. I, Bd. 136, 1927.)

nach ihrer Wirkung physikalischer oder chemischer Natur sein können, vielfach aber eine scharfe Abgrenzung nicht zulassen. Durch Bleichung der Gewebe oder durch Verwendung stark lichtbrechender Medien als Untersuchungsflüssigkeit können nicht nur bereits im Gewebe vorhandene Stoffe deutlicher hervorgehoben werden, sondern nach Ausführung von Reaktionen auch oft gewisse Reaktionsprodukte. Es sei hier nur auf das Phenol zum Nachweis von Verkieselungen hingewiesen, das Jodphenol und das Jodchloralhydrat zum Nachweis kleinster Stärkemengen und dergleichen mehr.

Die vorstehenden, zum Teil allgemein gehaltenen Ausführungen und die speziell herausgegriffenen Beispiele haben vor allem den Zweck verfolgt, aufzuzeigen, daß die Grenzen der pflanzlichen Mikrochemie und im speziellen der pflanzlichen Histochemie scharf gezogen werden können, was für einen weiteren Ausbau dieser großen und wichtigen Gebiete von Nutzen und Vorteil sein wird. Sie haben weiters gezeigt, daß dieselben Methoden, die uns bei zytologischen und histologischen Untersuchungen einen genauen Einblick in den mikroskopischen Aufbau der Zelle und Gewebe ermöglichen, auch in den Dienst der pflanzlichen Mikrochemie und Histochemie treten können und daß sie berufen sind, wesentlich zur Verfeinerung und Vertiefung der Pflanzenmikrochemie und besonders der Histochemie beizutragen.
