

Die Verwendung von Jod-Phenol zum histochemischen Nachweis kleinster Stärkemengen.

Von **Josef Kissler**.

(Eingelangt am 5. Mai 1930.)

So empfindlich auch Jod mit Stärke reagiert, so versagt diese Reaktion mit den gewöhnlichen Reagentien doch dort, wo es sich um den Nachweis kleinster Stärkemengen handelt, wie z. B. der kleinsten Stärkeeinschlüsse (autochthone Stärke) in den Chloroplasten. Schuld daran ist nicht vielleicht eine zu geringe Empfindlichkeit der Reaktion selbst, sondern der Umstand, daß die Stärkekörnchen von anderen Inhaltsstoffen der Zelle verdeckt oder infolge deren Eigenfärbung oder Anfärbung durch das Jod nicht hervortreten können.

Man hat daher auf verschiedene Art versucht, über die Störungen von seiten des Zellinhalts hinwegzukommen. Besonders zwei Verfahren wurden in dieser Hinsicht öfters versucht, nämlich die Ausführung der Jodreaktion nach Entfernung der störenden Zellinhaltsbestandteile durch Eau de Javelle, ein Verfahren, das von HEINRICHER¹⁾ herrührt, und zweitens die Benutzung des Jods in Verbindung mit einem starken Aufhellungsmittel, vor allem des Chloralhydrats, das von MEYER²⁾ empfohlen wurde. Beide Verfahren haben jedoch gewisse, nicht unwesentliche Nachteile, auf die an anderer Stelle ausführlicher eingegangen werden soll. Hier sei nur zusammenfassend festgestellt, daß das Eau de Javelle keinen lokalisierten Nachweis in der Zelle selbst gestattet,

¹⁾ HEINRICHER E., Verwendbarkeit des Eau de Javelle zum Nachweis kleinster Stärkemengen. (Ztschr. f. wiss. Mikroskopie, 3, 213 bis 215 [1886]).

²⁾ MEYER A., Das Chlorophyllkorn in chemischer, morphologischer und biologischer Beziehung. Leipzig 1883, S. 28 bis 29.

da eben alle Zellinhaltsbestandteile mit Ausnahme von Kieselkörpern und Kalkoxalatkristallen aus der Zelle herausgelöst werden, und daß außerdem in gewissen Fällen die Gefahr besteht, daß bei der notwendigen längeren Einwirkung des Eau de Javelles auch die Stärkekörner angegriffen oder gelöst werden. Durch die Verwendung von Jod in Verbindung mit Chloralhydrat tritt zwar die Stärke in dem stark aufgehellten Gewebe überaus deutlich hervor, doch lassen sich nach der Behandlung mit Chloralhydrat Form, Größe und Lokalisierung und oft auch die Mengenverhältnisse der Stärkekörnchen nicht mehr feststellen, da durch das Chloralhydrat die Zellinhaltsbestandteile völlig verquellen und die Stärkekörner selbst stark aufquellen; Form- und Größenveränderungen sind eine natürliche Folge davon.

Ein idealer Nachweis kleinster Stärkemengen ist demnach nur dann möglich, wenn Jod in Verbindung mit einem stark aufhellenden Medium verwendet wird, das Stärke und sonstigen Zellinhalt nicht verändert. Die weitaus meistens stark lichtbrechenden Medien, wie Canada-Balsam, Nelkenöl, Anilin, Styresin, Monobromnaphthalin und andere, müssen dabei von vornherein ausschalten, da bei Verwendung dieser als Lösungsmittel für Jod die Stärke nicht angefärbt wird; für den Eintritt der Jodfärbung ist es unbedingt notwendig, daß sich die Stärke in einem gequollenen Zustande befindet oder daß die verwendeten Reagentien eine gewisse Menge Wasser enthalten, durch die eine Quellung der Stärke ermöglicht wird. Als ein besonders günstiges Aufhellungsmittel wurde nun das Phenol gefunden, das bereits von NAUMANN³⁾ in Verbindung mit Jod zum Nachweis von Stärke benutzt wurde, das aber merkwürdigerweise bis jetzt nur sehr wenig Verwendung fand. Zum Stärkenachweis verwendet man Phenol, in das einige Kriställchen Jod eingetragen werden, die sich rasch mit brauner Farbe lösen. Das auf Stärke zu prüfende Objekt wird in diese Lösung eingelegt und nach kurzer Zeit, bei dünnen Schnitten in wenigen Minuten, ist die Aufhellung fertig und vorhandene Stärke, selbst in minimalster Menge, tritt an Ort und Stelle, in keiner Weise verändert, überaus scharf hervor. Darin liegt ein großer Vorteil gegenüber der Jod-Chloralhydrat-

³⁾ NAUMANN E., Mikrotekniska Notiser VIII—IX. Om jodfenol som mikrokemist reagens. (Bot. Notiser, 197—202 [1917].)

Methode. Daß sich durch Jod-Phenol die Stärke nicht blau, sondern anfangs mehr rotviolett oder rotbraun und schließlich tief schwarz färbt, kann in keiner Weise gegen diese Reaktion sprechen, im Gegenteil, die tief dunkel gefärbten Körnchen heben sich von dem völlig aufgehellten und durchsichtigen Gewebe ganz besonders scharf ab. Einen Nachteil besitzt das Reagens in dieser Form wohl, und zwar den, daß frische Schnitte damit nicht behandelt werden können. Da sich Phenol nur in sehr geringer Menge in Wasser löst (6,2 Teile Phenol in 100 Teilen Wasser) und sich daher mit dem in frischen Schnitten vorhandenen wässerigen Zellinhalt nicht mischt, treten sehr störende Emulsionsbildungen auf oder das Phenol dringt überhaupt nicht in den Schnitt ein. In dieser Art kann daher Jod-Phenol nur bei trockenen Schnitten oder bei Schnitten aus Alkohol verwendet werden.

Die Versuche gingen nun dahin, das Phenol durch geeignete Zusätze wasserunempfindlich zu machen, und solche wurden auch gefunden. So ist Jod-Phenol in allen Verhältnissen mit Jod-Chloralhydrat (5 : 2) mischbar. Je nach der Menge des zu Phenol zugesetzten Chloralhydrats wird die Wasserempfindlichkeit des Phenols immer mehr und mehr herabgesetzt; andererseits kann durch einen größeren Zusatz von Phenol zu Chloralhydrat dessen verquellende Wirkung auf die Stärke ausgeschaltet werden. Die Gemische besitzen ebenfalls eine sehr starke Lichtbrechung. In dem Maße, als der Zusatz von Jod-Phenol zum Jod-Chloralhydrat vermehrt wird, färbt sich die Stärke nicht mehr rein blau, sondern mehr blauviolett, rotviolett, braunstichig usw. Die Deformierung der Stärke durch das Chloralhydrat kann dadurch ausgeschaltet werden, daß man zum Stärkenachweis dem Jod-Chloralhydrat einen gleichen Teil Jod-Phenol zusetzt. Bei geringeren Jod-Phenol-Zusätzen stellt sich alsbald wieder die Verquellung ein. Da die Chloralhydrat-Phenol-Gemische die Fähigkeit haben, relativ große Mengen Wasser aufzunehmen, ohne daß es zu einer Emulsionsbildung kommt, so kann auf diesem Wege auch die Wasserempfindlichkeit des Phenols in gewünschtem Maße herabgesetzt werden. Am günstigsten erwies sich in dieser Hinsicht ein Gemisch von fünf Teilen Jod-Phenol und drei Teilen Jod-Chloralhydrat, da zu einem Teil dieses Gemisches ein Teil Wasser zugesetzt werden muß, bis wieder eine Emulsionsbildung auftritt. Da

nun in den auf Stärke zu prüfenden Schnitten bedeutend weniger Wasser vorhanden ist, als dem Volum des zugesetzten Reagens entspricht, so sind Störungen der Reaktion in dieser Hinsicht ausgeschlossen. Bei Behandlung von lebenden Schnitten mit diesem Gemisch wird der Zellinhalt weitgehend deformiert und von der Chloroplastenform ist nicht mehr viel zu erkennen. Man darf eben nicht vergessen, daß die meisten histochemischen Reagentien kein Fixierungsmittel für den Zellinhalt sind. Die Zerstörung der Chloroplasten läßt sich aber vermeiden, wenn man in Alkohol konserviertes und gehärtetes Material verwendet.

Will man das Chloralhydrat umgehen und auf andere Art die Wasserempfindlichkeit des Phenols vermindern, so kann dies auch durch Zusätze von Alkohol oder Glycerin geschehen. Sowohl in Alkohol als auch Glycerin ist Phenol in allen Verhältnissen löslich. Allerdings wird durch diese Zusätze die Lichtbrechung und damit die aufhellende Wirkung des Phenols herabgesetzt, durch den Alkohol begreiflicherweise stärker als durch das Glycerin. Gemische von Jod-Phenol und alkoholischer Jodlösung oder Jod-Glycerin haben aber den Nachteil, daß sich im Maße des Zusatzes trockene Stärke nur noch ganz schwach oder überhaupt nicht anfärbt. Mit Wasser befeuchtete Stärke färbt sich wohl an, aber ungleich, falls nur sehr wenig Wasser vorhanden war. Um eine rasche und gleichmäßige Färbung der Stärke zu erhalten, ist es daher unbedingt notwendig, daß den Gemischen auch etwas Wasser zugesetzt wird. Durch geringe Zusätze von Alkohol oder Glycerin zum Phenol wird dessen Wasserempfindlichkeit nur wenig herabgesetzt und es kommt bei Behandlung größerer und wasserreicherer Schnitte mit solchen Gemischen leicht zu Emulsionsbildungen. Solche entstehen aber auch dann, wenn das mit einem Deckglas bedeckte, in einem Alkohol-Phenol-Gemisch sich befindliche Objekt längere Zeit an der Luft liegenbleibt. Am Rande des Deckglases beginnt nämlich der Alkohol ziemlich rasch abzdunsten, das Lösungsvermögen des Gemisches für Wasser wird dadurch rasch herabgesetzt, und in dem Maße, als der Alkohol abzdunstet, kommt es zu Entmischungen, die mit störenden Trübungen der Flüssigkeit verbunden sind. Als günstigste Zusammensetzung des Phenol-Alkohol-Gemisches wurde folgende gefunden: 8 Teile Jod-Phenol, 4 Teile Jod-Alkohol und 1 Teil Wasser.

Dieses Gemisch ist sehr unempfindlich gegen Wasser, und zu 10 ccm können etwa 4 bis 5 ccm Wasser zugesetzt werden, bis es zu einer Trübung kommt. Eine Trübung durch am Deckglasrande abdunstenden Alkohol tritt erst nach langer Zeit ein, und schließlich kann man ja die Präparate, wenn sie länger aufbewahrt werden sollen, provisorisch mit Paraffin verschließen. Vorteilhafter ist es, an Stelle des Alkohols dem Phenol Glycerin zuzusetzen, und zwar in derselben Menge, wie für Alkohol angegeben, und auch den Wasserzusatz in gleicher Menge zu nehmen. Ein solches Gemisch ist noch unempfindlicher gegen Wasser, und ein Teil muß etwa mit dem gleichen Teil Wasser versetzt werden, bis es zu einer dauernden Trübung kommt. Der Glycerinzusatz setzt nicht nur die Lichtbrechung des Phenols weniger herab, sondern es fällt auch die nach längerer Zeit bei den Alkoholgemischen durch Abdunsten des Alkohols eintretende Trübung weg, da ja das Glycerin nicht verdunsten kann. Wenn auch die Lichtbrechung dieser Gemische niedriger ist als die des reinen Phenols, so macht sich dies doch kaum ungünstig bemerkbar. Im Gegenteil ist dies sogar manchmal nur angenehm, da in solchen Gemischen gewisse Details in der Zelle deutlicher auszunehmen sind als in reinem Phenol, wo sie infolge der starken Aufhellung mehr oder minder weitgehend verschwinden. Will man auf die starke Aufhellung durch reines Phenol nicht verzichten, so hat man ja immer die Möglichkeit, die Schnitte aus Alkohol in Jod-Phenol zu bringen oder ein Gemisch von Jod-Chloralhydrat und Jod-Phenol zu verwenden.
