Beobachtungen über die chromonematische Struktur des Zellkerns von *Hordeum vulgare*

Elektronenmikroskopischer Fixierungs- und Kontrastierungsvergleich*

Von A. RESCH ** und E. PEVELING ***

Aus dem Botanischen Institut der Universität Münster/Westfalen

(Z. Naturforsch. 19 b, 506—513 [1964]; eingegangen am 27. Dezember 1963)

Die Chromatinstrukturen der Wurzelmeristem-Interphasen von *Hordeum vulgare* wurden nach verschiedenen Fixierungen und Kontrastierungen elektronenmikroskopisch analysiert. In jedem Fall ist der Kern von entspiralisierten Chromosomeneinheiten der Chromonemastufe — 0,1 bis 0,2 μ breit — diskontinuierlich ausgefüllt (Chromonemakern). Die Polkappenchromozentren sind im Elektronenmikroskop als Zusammenlagerungen dieser Chromonemata zu erkennen.

Unter den Subchromonemata, die in enger, unübersichtlicher Packung die Chromonemata aufbauen, erscheinen 60 bis 100 Å breite Fibrillen besonders deutlich.

Die angegebenen Schwankungsbreiten der Chromonemata und der Fibrillen sind sowohl biologisch als auch präparativ bedingt. Durch eine große Zahl von Messungen konnten folgende allgemeine Eigenschaften der Fixierungsmittel bei der Wiedergabe der DNS-haltigen Strukturen ermittelt werden: KMnO_4 : sehr breite, zur Verklebung neigende Strukturen; OsO_4 und Alkohol-Eisessig-Carmin: mittlere Breite der Strukturen, günstiger Kontrast, Fibrillen spiralig, das saure Fixierungsmittel gleichwertig; Formol mit OsO_4 -Nachkontrastierung: dünne Strukturen, viel Ähnlichkeit mit der Osmiumfixierung; Formol: ebenfalls dünne Strukturen, Fibrillen teilweise zerstört, geringer Kontrast; Flemming-Heitz: dünnste Darstellung des Chromonema, Fibrillen undeutlich, von mittlerer Breite, Kontrast gut.

In den Zellkernen, die sich nicht in Teilung befinden, liegen die Chromosomen in einer Form vor, die von den jeweiligen Funktionszuständen geprägt ist. Diese Aussage übernehmen wir von den lichtmikroskopisch untersuchbaren und cytogenetisch lokalisierten Strukturen der Riesenchromosomen. Man sollte annehmen, daß die höhere Auflösung des Elektronenmikroskopes an den sehr viel kleineren Interphasechromosomen üblicher Zellkerne die Beobachtung ähnlicher Bildungen gestattet. Wir müssen aber gestehen, daß wir von einer Einsicht in die Funktionsform normaler Chromosomen im Sinne einer *Drosophila*-Cytologie noch sehr weit entfernt sind. Die Gründe für den schleppenden Fortgang der elektronenmikroskopischen Untersuchungen über den Zellkern der höheren Organismen liegen zum allergrößten Teil in der Eigenart der notwendigen Präparation. Obwohl schon sehr viele Einzeldaten zusammengetragen worden sind, wissen wir nur wenig über die feinere Architektur der Chromosomen bzw. Zellkerne. Es ist für das Verständnis des Feinbaues der Zellkerne besonders erschwerend, daß

der Formwechsel der Chromosomen elektronenmikroskopisch nur lückenhaft bekannt ist. Die Geschichte der Lichtmikroskopie zeigt, wie der Interphasekern erst aus der Kenntnis seiner Teilungsstadien richtig verstanden werden konnte. Diese lichtmikroskopischen Beobachtungen über den Teilungskern können und müssen daher vorerst in der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Zellkernen eingesetzt werden.

Es bedarf keiner besonderen Erläuterung, welche Bedeutung einem Fixierungs- und Kontrastierungsvergleich auf diesem Gebiete zukommt. Schon in der lichtmikroskopischen Karyologie ist das Strukturbild ein Fixierungs- und Färbeproblem¹. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen gilt dies in noch viel stärkerem Maße, und ein Blick in die einlaufende Literatur zeigt, daß im Bereich der Methodik längst nicht das letzte Wort gesprochen ist. Andererseits hat sich herausgestellt, daß die DNS-Histone sowohl im lichtmikroskopischen² als auch im sublichtmikroskopischen Chromofibrillen-Bereich^{3, 4} strukturell sehr „resistent“ sind. Man kann daher

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

** Jetzt Bot. Inst. T.H. Darmstadt.

*** z. Z.: Cytogen. Labor. Ann. Arbor, U.S.A.

¹ G. TISCHLER, Hdb. Pflanzenanat. I, 1, Bornträger, Berlin 1934.

² B. VAZART, C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. **247**, 952 [1958].

³ G. YASUZUMI, Chromosoma **4**, 222 [1951].

⁴ H. RIS, Interpretation of Ultrastructure **1**, 69 [1962].

nicht das „Osmiumbild“ der dispersen Chromatinverteilung als das einzig naturgetreue hinstellen, da es weder cytochemisch⁵ noch generell zutrifft. Lebendbeobachtungen sprechen dafür, daß es mehrere Möglichkeiten gibt, in denen sich die interphasische Ausbildung der Chromosomen verwirklicht. So ist es zweifellos richtig, über alle Artefaktprobleme hinweg eine Klassifizierung der Kernstrukturtypen durchzuführen, wie sie für die Pflanzen durch die Einteilung in Chromonema- und Chromozentrenkerne erfolgen kann⁶. Diese Unterschiede sind auch taxonomisch sehr spezifisch.

Ausgangspunkt der im folgenden berichteten Untersuchungen waren elektronenmikroskopische Beobachtungen an Teilungs- und Interphasekernen des Wurzelmeristems von *Hordeum vulgare*, die mit Hilfe der lichtmikroskopisch erprobten Carmintechnik gemacht werden konnten⁷. Dabei wurde eine relativ grobfädige, also distinkte Chromatinverteilung in der Interphase festgestellt. Hierauf wird nun unter Berücksichtigung anderer Fixierungen und im Vergleich mit den lichtmikroskopisch feststellbaren Strukturen näher eingegangen.

Methodik

Objekt: *Hordeum vulgare* (Wintergerste Elite, Eckendorfer Mädru, ungebeizt). Ankeimung in feuchten Kammern zwischen schräg gestellten Faltenfiltern bei 23°–25 °C im Dunkeln. Nach 3 Tagen wurde von den 3–5 cm langen Wurzeln die Spitze nach Entfernung der Wurzelhaube fixiert.

Fixierung (s. auch Tab. 1): Die Alkohol-Eisessig(AE)- und Chrom-Osmiumsäure-Fixierungsgemische sind in der Karyologie allgemein angewendete Mittel der Zellkern- und Chromosomen-Untersuchungen. Von den Standardfixierungen wurde Osmiumtetroxyd und Kaliumpermanganat verwendet. Neuere Untersuchungen mit Formol-Fixierung und Osmium-Kontrastierung^{8,9} veranlaßten uns, diese Fixierung in den Vergleich mit einzubeziehen.

Einbettung: Die Entwässerung erfolgte in Alkohol- oder Propylenoxydstufen (1/2–1-stdl.). Wir haben nicht den Eindruck, daß diese unterschiedliche Behandlung einen großen Einfluß auf die Struktur-erhaltung hat. Von viel größerer Wirkung auf das Erscheinungsbild ist jedoch das Einbettungsmittel. Für den vorliegenden Fall hat sich Epon als das geeignetere und universellere Polymerisat erwiesen. — Bei der elektronenmikroskopischen Präparation sind Schrumpfungen zu erwarten. Um diese zu prüfen, wurde ein lichtmikroskopisches Quetschpräparat der entsprechenden Behandlung unterworfen, also ebenfalls in Alkohol entwässert und über Propylenoxyd mit Epon eingedeckt und polymerisiert (Abb. 1 b). Es zeigte sich nur eine geringe Schrumpfung von ca. 5 Prozent.

Rezepte: *Chrom-Osmiumsäure* = Flemming-Stamm = Flemming-Heitz: 15 cm³ CrO₃ 1-proz., 4 cm³ OsO₄ 2-prozentig. *Formalin*: 4-proz. gepuffert mit KH₂PO₄ (0,033-m.) und NaOH. *Alkohol-Eisessig* = AE: 2 Tle. abs. Alkohol rein, 1 Tl. konz. Essigsäure p.a. *Carminessigsäure* = KE: 2,5-proz. (und 0,5-proz.), 2,5 (0,5) g Carmin rubrum optimum (früher von Bayer, jetzt nur von Chroma), in 100 cm³ 50-proz. Essigsäure gekocht und filtriert. *Ernst'sches Gemisch*: 2 Tle. Alkohol-Eisessig auf 1 Tl. Carminessig 0,5-prozentig. *Osmiumsäure*: 1-proz. mit Veronal-Natrium gepuffertes Osmiumtetroxyd. Kaliumpermanganat: 5-proz. wäßrige Lösung. *Epongemisch* [g]: Epon

Fixierung			Nachkontrastierung		
Bezeichnung	pH	Dauer (Zimmertemp.)	Bezeichnung	pH	Dauer
Chrom-Osmiumsäure	1,1	2 Stdn.	—	—	—
Chrom-Osmiumsäure	1,1	8 Stdn.	Carminessig (KE) 0,5-proz.	1,7	2 Tage
Formalin gep.	7,2	24 Stdn.	Osmiumsäure gep.	7,0	1 Stde.
Formalin gep.	7,2	24 Stdn.	—	—	—
Ernst'sches Gemisch (AE + KE)	2,1	2–10 Tage	Carminessig (KE) 2,5-proz.	2,0	1–8 Tage
Alkohol-Eisessig (AE)	1,6	1 Stde.	Carminessig (KE) 2,5-proz.	2,0	4 Tage
Osmiumsäure gep.	7,0	1 1/4 Stdn.	—	—	—
Kaliumpermanganat	7,0	1/4 Stde.	—	—	—

Tab. 1. Behandlungszeiten und pH-Werte der Fixierungs- und Kontrastierungsmittel.

⁵ I. R. GIBBONS u. J. R. G. BRADFIELD, Electron Microscopy Proc. of the Stockholm Conference S. 108 [1956].

⁶ L. GEITLER, Hdb. Pflanzenphys. I, 123, Berlin 1955.

⁷ A. RESCH u. E. PEVELING, Planta 59, 85 [1962].

⁸ V. MARINOZZI u. A. GAUTIER, J. Ultrastructure Res. 7, 436 [1962].

⁹ B. R. NEBEL u. E. M. COULON, Chromosoma 13, 272 [1962].

812 60, Epon 826 30, Epon X-71 10, DDSA (Härter) 95, MNA (Härter) 24, DMP-30 (Beschleuniger) 3,8. Mikrotom: Porter-Blum; Mikroskop: Siemens Elmiskop I.

Ergebnisse

1. Anordnung und Kontrast des Chromatins in den Interphasekernen

Das lichtmikroskopische Bild des Interphasekerns von *Hordeum vulgare* ist sowohl nach Carmin- als auch nach Feulgen-Technik hauptsächlich fädig, also chromonematisch (Abb. 1*). Auch die von HEITZ¹⁰ als Polkappenchromozentren bezeichneten heterochromatischen Strukturen sind deutlich fädig und nicht kugelig wie die heterochromatischen Körper der typischen Chromozentrenkerne. Es besteht also keine Frage, daß wir es hier mit einem Chromonemakern zu tun haben, der allerdings einige chromozentrenartige Bildungen besitzt. (Auf die Problematik, die TSCHERMAK-WOESS¹¹ durch die Bezeichnung „Chromomerenkern“ aufgeworfen hat, können wir hier nicht eingehen**.) Die Definition der Chromozentren besagt, daß es sich um nicht vollständig entspiralisierte Chromosomenteile handelt. Im Falle der Polkappenchromozentren von *Hordeum vulgare* sind es die proximalen Abschnitte der Chromosomen, die die Umbildung der distalen Chromosomenteile nicht mitmachen. Abschließend und als Überleitung zu den elektronenmikroskopischen Beobachtungen sei hier noch einmal darauf verwiesen, wie geringfügig die Veränderung des lichtmikroskopischen Präparates bei der Einbettung in Epon ist (Abb. 1 b).

Bei allen für die Elektronenmikroskopie versuchten Fixierungen wird der Aufbau des Interphasekerns von *Hordeum vulgare* als Chromonemakern deutlich (Abb. 2 a). Bei keiner Fixierung, auch nicht bei OsO₄, ist die Verteilung des Chromatins so dispers, daß man von einer vollkommenen Auflockerung der Interphasechromosomen sprechen könnte. Wieweit die chromatischen Strukturen den lichtmikroskopisch beschriebenen entsprechen, wird weiter unten durch Messungen näher behandelt werden. Aber auch ohne Größenangaben sieht man bei denjenigen Kernen, die ungefähr parallel zur Längsachse (ehemalige Spindelachse) geschnitten sind, ganz deutlich das Polfeld (P) durch die Anhäufung und

Mächtigkeit der chromatischen Strukturen, der sog. Chromozentren, obwohl diese im elektronenmikroskopischen Schnitt keineswegs durch Heterochromatie (= Kontrastunterschied) auffallen. Für diese Chromozentren haben wir die Feststellung zu treffen, daß sich ihre Färbbarkeit (ihr DNS-Gehalt?) nicht von der der distalen Abschnitte der Chromosomen unterscheidet. Auch im Bau und der Verteilung der Mikrofibrillen (s. u.) finden wir zwischen dem Heterochromatin und dem Euchromatin keinen Unterschied, wie ihn RIS im Bereich der submikroskopischen Spiralisierung beschreibt¹². Daraus ist zu folgern, daß die Chromatinkontrast-Unterschiede bei unserem Objekt nur lichtoptisch bedingt sind.

Der Vergleich der Fixierungen kann am leichtesten und natürlichsten über das Carminbild erfolgen. Dabei kommt die starke Kontrastierung des Chromatins der Beobachtung zugute, die aber nicht auf einer starken Elektronenstreuung des Carmins, sondern auf der relativ langen Kontrastierungszeit (Tab. 1) und der Chromatinspezifität des Farbstoffes beruht. Besitzt ein Kontrastmittel diese Chromatin (= DNS)-Spezifität nicht, führt eine längere oder konzentriertere Behandlung nur zu einer Überfärbung, aber nicht zu einem Herausheben (= positive Kontrastierung) des Chromosomenmaterials dieses Kerntyps. Die FLEMING-Fixierung bedarf nicht unbedingt der Carmin-Nachkontrastierung, da im Fixierungsgemisch bereits eine ziemlich starke Kontrastierung liegt (Os und Cr). Erwartungsgemäß brachte die zu Kontrollzwecken und als Grundlage für cytochemische Versuche geeignete Formolfixierung nur einen geringen Kontrast, der eher im Kaliumphosphatpuffer oder dem Eigenkontrast des Chromatins zu suchen ist.

Der Kontrast zwischen Chromatin und Nucleoplasma fällt bei den verschiedenen Fixierungen sehr unterschiedlich aus. Die Nucleolen können bei FLEMING, Osmium und Carmin am leichtesten erkannt und vom Chromatin unterschieden werden. Alle hierher gehörenden Beobachtungen sind in einer Aufstellung zusammengefaßt (Tab. 2). Dort finden sich auch kurze Hinweise über die Struktur und die Erhaltung aller Kern- und einiger Zellbestandteile. Genauere Beobachtungen über das Chromatin sollen nun im folgenden wiedergegeben werden.

* Abb. 1—4 s. Tafel S. 508 a—d.

** S. RESCH, Ber. dtsch. bot. Ges. **77**, 134 [1964].

¹⁰ E. HEITZ, Planta **18**, 571 [1933].

¹¹ E. TSCHERMAK-WOESS, Protoplasmatologie V, 1. Wien 1963.

¹² H. RIS, Symp. S. 121. Noordhoff, Groningen 1955.

Abb. 4.

Abb. 1 a—d. Interphasekerne von *Hordeum vulgare*, lichtmikroskopisch. a) Aus einem AE-KE-Quetschpräparat der Wurzelspitze. Oben rechts einige der breiten chromosomenartigen Chromozentren (Polkappe), unten die ungefärbten Nucleolen. Im übrigen Kernraum Chromonemen. b', b'', b''' Die gleiche Zelle wie a nach Entwässerung und Einbettung (Polymerisation) in Epon. Durch eine geringe räumliche Veränderung liegt die Schärfenebene jetzt etwas anders. Man findet aber auf den drei Schichtaufnahmen alle Strukturen des Quetschpräparates wieder. Gleichzeitig wird demonstriert, wie sehr Heterochromatin- und Chromomeren-effekt von der optischen Einstellung abhängig sind. c) Flemming-fixiertes Feulgen-Quetschpräparat der Wurzelspitze, Lichtgrün gegengefärbt, entwässert und in Malinol eingebettet. Chromozentren und Nucleolen (helle Vakuole) in der Mitte, also andere Ansicht als Bild a. Die DNS-haltigen Strukturen, soweit sie in der Bildebene verlaufen, fädig. d) Lebendaufnahme eines Zellkerns aus einer Epidermiszelle (Koleoptile) mit Plasmaströmung, dieser Kern zeigt eine ähnliche chromonematische Struktur wie die fixierten.

Abb. 2 a. Interphasekerne (Wurzeleristem) von *Hordeum vulgare*, elektronenmikroskopisch, nach verschiedenen Fixierungen und Kontrastierungen laut Beschriftung. N = Nucleolus, P = Polfeld. Maßstab = 1 μ . Weitere Einzelheiten s. Text und Tab. 2. Alle Aufnahmen nach Epon-Einbettung.

Abb. 3. Zwei Beispiele für die Wiedergabe der Chromozentren und Chromonemen sowie deren Mikrofilbrillen bei stärkerer Vergrößerung (65 000 : 1). C = Cytoplasma, M = Kernmembran, N = Nucleolus. Das Nucleoplasma ist bei Carmin nicht, bei Formol + OsO_4 granulär bis fibrillär dargestellt. Man erkennt die 0,1–0,2 μ breiten Chromonemata und im Bereich der Chromozentren die etwa 1 μ breite Restspirale und das enge relational coiling dieser Chromonemata. Je nach Schnittwinkel sind die 60–100 Å breiten Subchromonemata punktförmig und stark elektronenstreuend oder fädig mit schwächerem Kontrast wiedergegeben. Epon-Einbettung.

Abb. 4. Ausschnittvergrößerung von Chromonema-Abschnitten. Die 60–100 Å breiten Subchromonemata sind aus ein oder zwei spiralisierten kleineren Einheiten (ca. 40 Å und kleiner) zusammengesetzt. Größere Ähnlichkeit besteht zwischen AE+Carmin- und OsO_4 -Behandlung. KMnO_4 , Formol (ohne OsO_4) und Flemming sind davon und untereinander sehr verschieden. Epon-Einbettung.

		Chromosmiumsäure		Formol		AE + KE	OsO ₄	KMnO ₄
		ohne KE	mit KE	mit OsO ₄	ohne OsO ₄			
Chromatin	Kontrast:	mittel-stark	stark	mittel		stark	mittel	
Nucleolus	Kontrast:	mittel				mittel-schwach	stark	schwach
	Struktur:	homogen Hof	granulär-fibrillär	granulär-fibrillär Hof	fein-granulär Hof	granulär-fibrillär, enger Kontakt zum Chromatin	granulär-fibrillär Hof	unspezifisch
Nucleoplasma	Kontrast:	mittel	schwach-kein	schwach mit stark kontr. globulären Körperchen	schwach	fehlend	mittel-schwach	schwach
	Struktur:	fibrillär-netzig		granulär-fibrillär	feingranulär	?	granulär-fibrillär	granulär
Kernmem-	Lamellen-Darstellung:	deutlich	undeutlich				deutlich	sehr deutlich
	Lamellen-Abstand:	eng gleich	? ?	weit ungleich		eng gleich	eng-weit gleich-ungl.	eng gleich
	Poren:	undeutlich					„geschlossen“	offen
Cytoplasma	Kontrast:	mittel			mittel-schwach	mittel	mittel-schwach	
	Struktur:	fibrillär-netzig	grob-granulär	granulär		grob-granulär	granulär-fibrillär	granulär
	Organelle:	?		undeutlich			deutlich	sehr deutlich

Tab. 2. Übersicht über die Kontrastabstufungen und Strukturunterschiede der einzelnen Kern- und Zellbestandteile nach verschiedener Behandlung.

2. Morphologie und Struktur der Chromonemen in den Interphasekernen

Im vorhergehenden Abschnitt haben wir festgestellt, daß der Interphasekern des Wurzelmeristems von *Hordeum vulgare* distinkte „Fäden“ als Äquivalentstruktur besitzt. Die Untereinheiten des Chromosoms sind also in der Interphase nur bis zu einer bestimmten Stufe entspiralisiert. Die Restspiralen kann man trotz relativ großer Dimensionen (bis $1\ \mu$) auch in den Dünnschnitten sehen, und man erkennt

leicht, daß diesen telophasischen Spiralen eine kleinere Spirale unterlegt ist (Abb. 3). Der Durchmesser dieser Spiralen ist $300 - 400\ m\mu$ und entspricht damit der Chromatidbreite der prophasischen Chromosomen. Zwei solcher Spiralen sind auch ineinandergelegt zu finden, ohne daß der Durchmesser stark vermehrt wird ($400 - 500\ m\mu$, Abb. 3). Diese Doppelspiralen werden im Lichtmikroskop als stark gefärbte, dicke Bänder, Stücke oder Körper, also als heterochromatische Chromozentren gesehen und gemessen (ca. $0,5\ \mu$). Die anscheinend schwächer ge-

färbten (sog. euchromatischen) Chromosomenteile oder Untereinheiten können im Lichtmikroskop nicht exakt gesehen und vermessen werden (etwa $0,2 \mu$). Teilweise sind es überhaupt nur noch Andeutungen von Strukturen, besonders im distalen, polfernen Bereich des Zellkerns. Sie stellen aber die Komponenten der oben genannten Spiralisierungen dar und werden daher als Chromonemen bezeichnet. Diese Spiralisierungseinheit (besser Entspiralisierungseinheit) ist im Elektronenmikroskop gut zu erkennen und mißt dort von weniger als $100 \text{ m}\mu$ bis knapp über $200 \text{ m}\mu$, liegt also in einer Größenordnung, die sich genau an der Auflösungsgrenze des Lichtmikroskopes hält. Aus den Abb. 2 und 3 ergibt sich bereits, daß diese Chromonemen durch die verschiedenen Fixierungen in der Dimension (Breite) und in der Struktur (s. u.) nicht einheitlich wiedergegeben werden. Wir entnehmen daraus, daß die anfänglich äquivalent erscheinenden Fixierungen doch noch Unterschiede in der Chromatindarstellung hervorrufen. Flemming gibt die feinste und, wie es scheint, gegliedertste, KMnO_4 die größte Erhaltung der Chromonemen. Die übrigen Fixierungen lassen sich nicht allein nach dem Augenschein beurteilen. Darum haben wir durch Messungen versucht, die Chromonembreite zu bestimmen.

Die erhaltenen Kurven (Abb. 2 b) zeigen alle eine asymmetrische Verteilung mit dem Maximum oder der Massierung der Werte in der linken Hälfte (bei den kleineren Dimensionen). Das ist zunächst schwer erklärbar, obwohl diese Verteilungsform bei biologischen Objekten auffallend häufig vorkommt (z. B. die Masseverteilung der Mitochondrien¹³). Wir können die Verteilung auch nicht auf die Anschnitte der durchschnittlich $100 - 200 \text{ m}\mu$ dicken Chromonemen in den Dünnschnitten (Schnittdicke etwa $50 - 100 \text{ m}\mu$) zurückführen. Das Ergebnis aus der statistischen Verteilung der Anschnitte wäre zwar ebenfalls eine asymmetrische Kurve, aber eine solche, deren Steilabfall auf der rechten Seite im Bereich der wirklichen Strukturbreite läge und links einen flachen Kurvenanstieg brächte. Natürlich sind die Werte der Anschnitte in den Diagrammen mit erfaßt, sie werden aber bei allen Fixierungen in gleichem Maße mitspielen. Eine weitere Überlegung führt zu der Feststellung, daß keine diskontinuierliche Verteilung der Chromonembreiten vorkommt, aus der man auf Wachstums- oder Teilungsvorgänge

in den chromosomalen Interphasestrukturen schließen könnte. Wir nehmen heute an, daß die DNS-Reproduktion unabhängig von der morphologischen Vervielfachung erfolgt¹⁴, und die Autoreduktion der DNS-Moleküle auch im kompakten Chromonemafaden möglich ist. Diese letzte Überlegung über das Fehlen eines rhythmischen Wachstums im Bereich der Interphasechromonemata wird allerdings gegenstandslos, wenn wir die breite Streuung der Werte so interpretieren, daß die Chromonembreite über das ganze Chromosom nicht einheitlich ist, sondern eine Breitenabnahme vom Centromer bis zu den Enden vorliegt. Wir haben bei den lichtmikroskopischen Beobachtungen über das polare und das distale Kernfeld Entsprechendes erwähnt und die Erfahrungen mit den Pachytändchromosomen deuten auch in

Abb. 2 b. Verteilungsdiagramme der Breiten von Chromatinstrukturen nach verschiedenen Fixierungen und Kontrastierungen. Es sind jeweils 500 Messungen aus mehreren Zellkernen (mindestens 10) verschiedener Wurzelspitzen verwendet und in Klassen von $20 \text{ m}\mu$ aufgetragen (Abszisse). Auf der Ordinate ist die absolute Häufigkeit pro Klasse angegeben. M = Mittelwert.

¹³ G. F. BAHR u. E. ZEITLER, J. Cell Biol. **15**, 489 [1962].

¹⁴ B. P. KAUFMANN, H. GAY u. M. R. McDONALD, Int. Rev. of Cytology **9**, 77 [1960].

diese Richtung. Dennoch brachte eine getrennte Ausmessung von Polfeld und distalem Bereich in den Elektronenmikrogrammen keine deutlichen Unterschiede. So müssen wir die Verteilung der Werte um $150\text{ m}\mu$ als Chromonemabreiten-Variation verschiedener Ursachen hinnehmen. Die Werte von 300 und mehr $\text{m}\mu$ dagegen sind sicher keine Breitenvariationen des Chromonemas, sondern echte Zusammenlagerungen, die auch elektronenmikroskopisch nicht mehr aufgelöst werden können, wobei es von der Fixierung abhängig ist, ob die Strukturbreiten von 300–500 $\text{m}\mu$ vorkommen oder nicht. So zeigt das KMnO_4 -Diagramm die meisten Werte in diesem Bereich, was dem visuellen Eindruck eines verbackenen, klumpigen Chromatins entspricht, dem die chromonemale Gliederung fehlt. Keine oder sehr wenige Werte über 300 $\text{m}\mu$ und ein deutlich ausgeprägtes Maximum im chromonematischen Bereich um 100 $\text{m}\mu$ finden wir nach *Flemming*- und Formol-Fixierung. Eine breit streuende Verteilung zwischen 100 und 300 $\text{m}\mu$ mit geringen Verklumpungstendenzen ist nach OsO_4 und Alkohol-Eisessig zu konstatieren, also eine gewisse Verwandtschaft mit der KMnO_4 -Darstellung. Das Diagramm der Formol-Fixierung mit Osmium-Kontrastierung liegt zwischen den beiden genannten charakteristisch verschiedenen Gruppen und trägt Merkmale beider Fixierungen.

Wir sehen also, daß sich die saure Fixierung Alkohol-Eisessig mit der gerühmten neutralen OsO_4 -Fixierung ebenso vergleichen läßt, wie das extrem saure *Flemming*-Gemisch (p_{H} 1,1) mit der neutralen Formol-Fixierung. Geht man nach der Faustregel, daß bei Fixierungsvergleichen die feinste Strukturwiedergabe auch die beste ist¹⁵, würde man *Flemming* wie im Lichtmikroskop zur Chromonemadarstellung vorziehen^{10, 17} und andererseits KMnO_4 ablehnen, die übrigen bedingt gelten lassen, und zwar in der Reihenfolge wie sie im Diagramm zwischen den beiden Extremen angeordnet sind. Bevor wir uns darauf festlegen, ist es unbedingt notwendig, den Einfluß des Fixierungsmittels auf die Feinstruktur des Chromatins zu beschreiben.

Die Chromonemata selbst bestehen aus unregelmäßig verlaufenden Mikrofilbrillen, wie bereits aus

Abb. 3 zu ersehen ist. Diese Strukturen sind 60 bis 100 Å breit und sollen als Subchromonemata bezeichnet werden. Wir können in den Dünnschnitten nicht eindeutig feststellen, wieviele ein Chromonema bilden und ob weitere Organisationsstufen (Spiralisationsstufen) zwischen dem Subchromonema und dem Chromonema liegen.

Bei stärkerer Vergrößerung ist ein Vergleich des Chromonemafeinbaues nach den verschiedenen Fixierungen möglich (Abb. 4)*. Die größte Strukturähnlichkeit besteht wieder zwischen Osmiumtetroxyd- und Alkohol-Eisessig-Fixierung. Besonders bei AE sieht man, daß sich die Subchromonemata aus fädigen, spiralisierten Untereinheiten (ca. 40 Å) zusammensetzen. Auch nach Kaliumpermanganat lassen sich die Subchromonemata in ihrer feinen Struktur gut erkennen. Im Gegensatz zum fädigen Aspekt der beiden oben genannten Fixierungen zeigen sie aber eine vorwiegend körnige Struktur, die in eine „graue Substanz“ eingebettet ist. Das feinfädigste Bild ergibt sich nach Formol, umeinandergewundene Strukturelemente sind hier aber auch nicht zu sehen. Nach *Flemming*-Fixierung ist eine mit obigem vergleichbare Analyse nicht durchführbar, da die Mikrofilbrillen der Subchromonemata zu groben Strängen verklebt sind. Wir sehen also, daß das elektronenmikroskopische Feinstrukturbild der *Flemming*-Fixierung nicht zufriedenstellend ist. Die Breitenmessungen bei den anderen Fixierungen ergaben folgende Mittelwerte: Formol 56 Å, Formol + OsO_4 60 Å, Osmiumtetroxyd 71 Å, Alkohol-Eisessig 72 Å und Kaliumpermanganat 83 Ångström. Es zeigte sich dieselbe Folge wie bei den Chromonemata; auch dort war eine „zunehmende“ Breite von Formol bis Kaliumpermanganat festzustellen.

Die Breitenunterschiede der Chromonemata sind also in der Fixierung der Mikrofilbrillen begründet. Dabei wirkt *Flemming*-Fixierung stark artifiziell. Die Erhaltung der Strukturen bei den übrigen Fixierungen ist sehr unterschiedlich. Die größte Strukturäquivalenz ist zwischen AE und OsO_4 gegeben. Diese Fixierungen kommen der gegenwärtigen Hypothese des Supercoilingmodells der Chromosomenfeinstruktur am nächsten.

¹⁵ A. BAIRATI u. F. E. LEHMANN, Publ. Staz. Zool. Napoli 23, Suppl. 193 [1951].

¹⁶ L. GEITLER, Schnellmethoden der Kern- und Chromosomenuntersuchung. Springer, Wien 1949.

¹⁷ G. BOPP-HASSENKAMP, Protoplasma 50, 243 [1959].

* Diese Abbildungen wurden mittels Zwischenvergrößerungen angefertigt, um die bei einer direkten, starken Sekundärvergrößerung auftretenden Plattenkorneffekte zu vermeiden.

Diskussion

1. Zur Fixierungstechnik

Die Alkohol-Eisessig-Fixierung mit anschließender Carmin- oder Orcein-Färbung ist aus der modernen Karyologie und Cytogenetik nicht mehr fortzudenken. In den methodischen Anweisungen wird die AE-KE-Technik als diejenige angesehen, die das Chromatin am naturgestreuesten zu erhalten vermag¹⁶. Tatsächlich baut die Mehrzahl aller karyologischen Befunde auf der Carmintechnik auf. Gegen eine unbeschränkte Anwendung der AE-Fixierung gibt es aber Einwände. Bekannt ist, daß die derart fixierten Strukturen nicht stabil genug sind, die Prozeduren der Paraffinmikrotomtechnik zu überstehen. Es kommt zu einer deutlichen Vergröberung und Vernetzung des Chromatins. Diese Artefakte treten aber bei Einbettung in Epon und anschließender Ultramikrotomtechnik, wie wir zeigen konnten, nicht auf. Unser Fixierungsvergleich beweist außerdem, daß die AE-Fixierung nicht aus dem Rahmen der allgemein gebräuchlichen elektronenmikroskopischen Fixierungen herausfällt.

Ein weiterer Einwand betrifft die starke Acidität des Fixierungsmittels. In der elektronenmikroskopischen Präparation wird seit langem ein „neutral“ gepuffertes Fixierungsgemisch verwendet. Die beiden karyologischen Fixiermittel (AE und Flemming) sind dagegen stark sauer (Tab. 1). Solche extremen p_H -Unterschiede können vielleicht das Gefüge der Chromosomen verändern¹⁷ oder — wie hier bei diesem Vergleich — das Bild des Interphasekernes. Wir sehen aber, daß sich die Chromatinverteilung in den Interphasekernen weder vom Fixierungsmittel noch vom Fixierungs- p_H wesentlich beeinflussen läßt. Trotzdem sind vom biochemischen Standpunkt extreme p_H -Werte für die Reindarstellung der DNS abzulehnen¹⁸. Die Mikrofibrillen (Subchromonemata) der Chromosomen höherer Organismen, die wahrscheinlich ein Histon-DNS-Komplex bilden, sind dagegen erstaunlich artefakt-stabil. Ob mit sauren oder neutralen Gemischen fixiert, sie sind immer wieder in der gleichen Größenordnung um 100 Å gefunden worden⁴. Hydrolytische Behandlung vermag sie jedoch zu zerstören¹⁹. Dagegen

greifen saure Fixierungsmittel (Carnoy) die DNS der Zelle auch bei längerer Einwirkungsdauer nur zu 15% an (vergleichbarer RNS-Extraktionswert 50%)²⁰. So wird man für karyologische Untersuchungen nicht unbedingt auf dem neutralen Fixierungsmittel beharren müssen. In diese Richtung weisen auch die Feststellungen von CLAUDE²¹, daß die Osmium-Fixierung im sauren Bereich besser für die Chromatindarstellung geeignet ist als die übliche Anwendung im neutralen Bereich. (Angaben über die Kontrastierung im sauren Bereich s. folgendes Kapitel.)

So kann man die AE-Fixierung mit anschließender Carminessigbehandlung für die Chromosomendarstellung weiterhin anwenden, und wir werden eines Tages, wenn die DNS-Eiweiß-Chemie noch weiter fortgeschritten ist, verstehen, warum die Praktiker der Lichtmikroskopie zur sauren Fixierung gegriffen haben.

Eine Einschränkung ist allerdings zur Flemming-Fixierung zu machen. Der p_H -Wert von 1,1 ist sehr extrem, gibt aber lichtmikroskopisch eine feingliedrige Chromonemadarstellung. Elektronenmikroskopisch erscheint dagegen das Chromatin geschrumpft und verklebt. Die Subchromonemata sind nach dieser Fixierung nicht oder nur sehr grob zu erkennen. Hier zeigt sich keine Strukturäquivalenz, sondern ein ziemlich deutlicher Artefakt.

2. Zur Kontrastierung

In den meisten Fällen erhält man nach Carminfärbung das gleiche Bild wie bei Feulgen-Reaktion auf DNS. Diese — fast spezifische — Wirkung ergibt sich aber nur bei Anwendung in saurer Lösung. HEITZ schreibt in seiner grundlegenden Carminarbeit²²: „Ausgangspunkt hierbei war die mikrochemische Erfahrung . . . wonach 45-proz. Essigsäure Plasma und Nucleolen quellen macht, während das Chromatin unverändert bleibt.“ So wirken bei der Carmin-Essigsäure gute Strukturhaltung und selektive Anfärbung der Chromosomen günstig zusammen. Da das Carmin auch einen elektronenmikroskopischen Kontrast ergibt, ist dieser basische Farbstoff sicher auch geeignet für die Untersuchung der DNS-haltigen Feinstrukturen. Andere chromatin-

¹⁸ R. K. ZAHN, E. TIESLER, A. K. KLEINSCHMIDT u. D. LANG, Biochem. Z. **336**, 281 [1962].

¹⁹ G. BOPP-HASSENKAMP, Z. Naturforschg. **14b**, 188 [1959].

²⁰ E. HARBERS u. K. NEUMANN, Z. Naturforschg. **10b**, 357 [1955].

²¹ A. CLAUDE, Electron Microscopy, Int. Congress Philadelphia II, L-14, 1962.

²² E. HEITZ, Z. Bot. **18**, 625 [1926].

positive Kontrastierungsmittel für elektronenoptische Untersuchungen sind Uranylacetat und Bleihydroxyd⁸. Die Uranylkontrastierung ist bei geringer Konzentration und niedrigem pH ^{23, 24} selektiv für Nucleinsäuren. Hier finden sich Zusammenhänge mit der Carminanwendung im sauren Bereich und mittels schwacher Lösungen, die allerdings längere Kontrastierungszeiten erfordern.

3. Die Interphasechromosomen

In den Interphasekernen von *Hordeum vulgare* findet man im Leben und nach Fixierung deutlich fädige Strukturen von ca. 0,2 und 0,5 μ Breite. Bei den ersteren, die in der Mehrzahl vorliegen, handelt es sich um Chromonemen. Die letzteren sind, da sie stark heterochromatische Färbung besitzen, definitionsgemäß als Chromozentren anzusprechen.

Die elektronenmikroskopischen Vergleichsfixierungen zeigen übereinstimmend ebenfalls den chromonematischen Charakter dieses Kernbaues. Die Chromozentren sind je nach Fixierung mehr oder weniger nachweisbar. Wirkt ein Fixierungsmittel im Bereich der Chromonemata quellend oder verklebend, so sind bis 0,5 μ breite Bänder oder Komplexe zu sehen (rechts liegender Teil der Diagramme), die als lichtmikroskopische Chromozentren gedeutet werden können. Überwiegend sind die Chromozentren jedoch in ihre Untereinheiten, die Chromonemata, aufgelöst. Das gesamte Kernbild von *Hordeum vulgare* wird somit von Chromonemastrukturen bestimmt, die im Bereich der Polkappe dichter liegen. Diese klar abzugrenzenden Chromonemen sind mit einer Größenordnung um 0,1 bis 0,2 μ noch weitgehend lichtmikroskopisch zu erkennen. Eine fein disperse Verteilung des Chromatins über den ganzen Kernraum wurde bei keiner Behandlung beobachtet, auch nicht nach Osmiumfixierung. Wir müssen daher der Behauptung von Riss⁴ widersprechen, daß die angeblich natürliche Verteilung des Chromatins feindispers sei und sich nur mit Osmium oder Formol erhalten lasse, während saure und alkoholhaltige Fixierungsmittel jenes schrumpfen lassen. Selbstverständlich liegen je nach Behandlung geringe Abweichungen in der Breitenwiedergabe der Chromonemata vor, die jedoch für die Erhaltung des gesamten Strukturbildes nicht ausschlaggebend sind. Die gleiche Schrumpfungsbzw.

Quellungsreaktion wie bei den Chromonemata trat bei unseren Untersuchungen abweichend zu anderen Beobachtungen¹⁹ auch bei den Mikrofibrillen auf. Was die Breite der Mikrofibrillen betrifft, so wird noch zu prüfen sein, ob der Unterschied zwischen den 60–90 Å breiten Fibrillen im Interphasekern von *Hordeum* sowie den 70 Å breiten in Kernen von *Amoeba*²⁵ und den häufig zitierten 130–150 Å breiten Strukturen stadienbedingt ist oder durch die elektronenmikroskopische Präparationstechnik hervorgerufen wird. Die Vermutung auf ein Variieren der Mikrofibrillenbreite während des Mitosezyklus liegt dadurch nahe, daß gelegentlich bei *Hordeum* auch Strukturen um 150 Å sowie einzelne klar erkennbare Einheiten um 500 Å, die aus meiotischen Prophasechromosomen bekannt sind, gefunden wurden.

Abgesehen von dem noch zu klärenden Feinbau der Chromonemata bleibt noch die Frage nach dem Begriff Chromonema und Chromonemakern. Der Terminus Chromonema kann sowohl aus chemischer²⁶ wie aus morphologischer²⁷ Sicht in Frage gestellt werden. Dem Argument, daß das Chromonema vermutlich ein DNS-freier Faden ist, der die Verbindung zwischen den Chromomeren herstellt, ist entgegenzuhalten, daß Chromonema = Genonema DNS-haltig sein muß, wenn der Terminus irgendwie zu Recht bestehen bleiben soll. Dem morphologischen Einwand, daß aus rein historischen Gründen der Begriff Chromonema nur im lichtmikroskopischen Bereich angewandt werden soll, ist dadurch entgegenzutreten, daß wir nicht deshalb den Namen bereits bezeichneter Strukturen ändern sollten, weil sie in manchen Fällen unter die Grenze des lichtmikroskopischen Auflösungsvermögens reichen. Die 0,1–0,2 μ breiten Chromatinstrukturen sind also eindeutig als Chromonemata zu bezeichnen. Ein Kern, in dem diese Strukturen vorherrschen, sollte nicht zu den Chromomerenkernen gerechnet werden, auch dann nicht, wenn die Arbeitskerne (Soma) chromomerenartig erscheinen¹¹; ganz abgesehen von der Fragwürdigkeit des Chromomerenbegriffes. Nach den vorliegenden Beobachtungen möchten wir daher die Interphasekerne von *Hordeum vulgare* ganz eindeutig zu den Chromonemakernen im weiteren und engeren Sinne rechnen.

²³ H. E. HUXLEY u. G. ZUBAY, Proc. Europ. Conf. Electr. Micr. Delft 2, 699 [1960].

²⁴ S. K. WOLFE, M. BEER u. C. R. ZOBEL, Electron Microscopy, Int. Congress Philadelphia, II, O-6, 1962.

²⁵ G. E. PAPPAS, J. biophysic. biochem. Cytol. 2, 221 [1956].

²⁶ A. FREY-WYSSLING, Submicroscopic morphology of protoplasm, Amsterdam, New York 1953.

²⁷ N. SHINKE, The Nucleus 2, 161 [1959].