Experimentelle Untersuchungen über die Vitalfärbung sich teilender Zellen. II Mitt. Zytoplasmafärbungen mit Azofarbstoffen; vitale Mehrfärbungen

Von

W. A. Becker

Aus dem Institut für Allg. Botanik der Universität Warschau

Eingegangen am 4. December 1933

I

„Unter den programmatischen Forderungen der experimentellen Zellforschung steht die Auswahl und Behandlung geeigneter Versuchsobjekte und das Streben nach neuen Untersuchungsmethoden im Dienste physiologischer Fragestellung mit an erster Stelle. Für große und wichtige Gebiete der Zytologie und Histologie ist ein wesentlicher Fortschritt, vielfach sogar eine entscheidende Wendung erst nach Erfüllung der genannten Forderungen zu erwarten“. (GICKLHORN, 1930, S. 345). Diesen Worten GICKLHORNS kommt im gegenwärtigen Moment, nachdem die zytologische Erforschung der lebenden Zelle immer mehr an Bedeutung gewinnt, ein besonderer Sinn zu. Aus den Voraussetzungen der „protoplasmatischen Pflanzenanatomie“ (im Sinne WEBERS, 1929) folgt die unmittelbare Notwendigkeit neue, für lebende Objekte geeignete Untersuchungsmethoden zu erfinden. Von ähnlichen Strebungen geleitet, begann ich vor einigen Jahren, der Initiative meines hochverehrten Lehrers, Prof. ZYGMUNT WÓYCICKI folgend, die Möglichkeit einer Anwendung der Vitalfärbung zur Lösung von gewissen Zellteilungsproblemen bei der pflanzlichen Zelle zu untersuchen.

Die vitale Verfärbung der Zellplatte, des Chondrioms und zuletzt der Zellwand während der Zellteilung (BECKER, 1932 b, c, d, 1933 b) gab mir die Möglichkeit eine bestimmte Stellung zu den Erscheinungen der Zytokinese einzunehmen. Eine Zusammenstellung aller Angaben über das Problem der Zytodierese durch Zellplattenbildung samt neuen noch unveröffentlichten Untersuchungen wird den Inhalt des nächstfolgenden Beitrages bilden. In der vorliegenden Arbeit möchte ich die Ergebnisse der vitalen Färbung des Zytoplasmas während der Zellteilung bekanntgeben. Dazu bin ich durch die letzten Arbeiten BLEIERS (1931) angeregt. Es ergab sich die Möglichkeit zur Lösung der von BLEIER berührten Probleme die Zytoplasma-

färbung mit Azofarbstoffen heranzuziehen, welche Methode, wie nach der Arbeit von SCHAEDE (1924) zu vermuten, zu gewissen Hoffnungen berechtigte. Konkret habe ich mir zur Aufgabe gestellt zu untersuchen, ob es mittels der erwähnten Methode nicht möglich wäre die Beziehung der Kernspindelsubstanz, des sogenannten Verbindungsschlauches zum Phragmoplasten aufzuklären.

Die hier veröffentlichten Beobachtungen stammen aus den Sommermonaten der Jahre 1932 und 1933.

II

Schon in den ersten Arbeiten über die Vitalfärbungsmethoden wird die Anwendung gewisser Azofarbstoffe zur Vitalfärbung des Zytoplasmas erwähnt. (vgl. PFEFFER, 1886, sowie die dort gegebene Literatur). Erst RUHLAND (1912) jedoch bewies, daß für Pflanzenzellen Chrysoidin sich besonders eignet. SCHAEDE hat nicht nur die Angaben RUHLANDS nochmals an Dauerzellen geprüft und bestätigt (1923), sondern auch den Versuch unternommen, die erwähnte Färbungsmethode bei der Zellteilung anzuwenden (1924). Querschnitte durch *Allium*- und *Vicia*-Wurzeln gaben kein befriedigendes Resultat, da sie der gegenwärtigen Auffassung nicht standzuhalten vermögen, die Beobachtungen an Staubfadenhaaren von *Tradescantia virginica* erwiesen dagegen, daß „man mit einigem Mühaufwand eine tadellose Plasmafärbung erzielen kann, bei der die Zirkulation ungestört ist und die Karyokinesen wie im ungefärbten Objekt ablaufen“ (SCHAEDE, 1924, S. 244). Bei der Vitalfärbung mit Chrysoidin färbt sich nur das Zytoplasma; Kern und Chromosomen nehmen nicht daran teil. „Besonders schön sind Telophasen, wenn die farblosen Chromosomen und die in Bildung begriffenen Tochterkerne sich von der gelben Kerntonne abheben“ (SCHAEDE, 1924, S. 244). SCHAEDE weist gleichzeitig auf die großen Schwierigkeiten bei der Handhabung dieser Methode hin (..., „diese Färbung sehr viel Zeit und Mühe in Anspruch nimmt...“, S. 244), infolgedessen er sich ihrer nur selten bediente. Zugleich weist SCHAEDE die Färbungsmethode von CAMPBELL (1888) mittels Dahliaviolett, Methylviolett und Mauvein ab und vermutet, daß die Beobachtungen dieses Autors auf Missverständniss beruhen.

Die RUHLAND-SCHAEDESche Methode wurde gelegentlich auch von BĚLAŘ (1929) bei seinen Vitalbeobachtungen über die Mitose bei *Tradescantia virginica* angewandt, doch misst ihr BĚLAŘ infolge der schädlichen Einwirkung des Farbstoffes auf die Zelle keine größere Bedeutung bei. „Die von SCHAEDE (1925) empfohlene Vitalfärbung mit Chrysoidin... habe ich zwar einige Male angewandt, finde sie aber (wie SCHAEDE) trotz ihres hübschen Effektes (diffuse Gelb-

färbung des Zytoplasmas, Kern und Chromosomen farblos) nicht vorteilhaft, zumal da sie die Zellen nach einiger Zeit doch schädigt“ (BĚLAŘ 1929, S. 75).

Auch der Versuch von MARTENS (1929) gewährte kein besseres Resultat „Ces essais sont encore insuffisant et je ne relate qu'un cas d'empoisonnement cellulaire par concentration progressive de la solution“ (MARTENS 1929, S. 183). MARTENS berichtet hier nur über die Absterbeerscheinungen in der Zelle infolge der übermässigen Farbstoffkonzentration. Wir sehen somit, daß seit dem Jahre 1924, in welchem die Abhandlung von SCHAEDE erschien, die Arbeiten über die Vitalfärbung des Zytoplasmas pflanzlicher Zelle während der Zellteilung kaum vorwärtsschritten, zumal die SCHAEDESche Abhandlung selbst, wenn sie auch auf die vorhandenen Möglichkeiten deutlich hinweist, doch auf die berührte Frage nicht näher eingeht.

Zu meinen eigenen Versuchen benützte ich Chrysoidin und Bismarckbraun in wässrigen Standardlösungen von 1:1000 Konzentration. An diese Konzentration habe ich mich nicht ganz streng gehalten, indem ich die Farbstofflösung mit gewöhnlichem Leitungswasser mehr oder weniger verdünnte. Es lag mir nur daran in der beobachteten Zelle eine genügend starke und deutliche gelbe Verfärbung des Zytoplasmas zu erzielen, worauf ich sogleich das Präparat mit reinem Wasser durchgewaschen habe. Es dünkt mir nämlich vorteilhafter möglichst rasch das Zytoplasma mit einer konzentrierteren Farbstofflösung zu färben und das Präparat sogleich durchzuwaschen, als es durch eine längere Zeit in einer verdünnten Lösung zu halten (vgl. ALBACH, 1927). Als Material benützte ich Staubfadenhaare von *Tradescantia virginiana*, *Tr. pilosa* und *Tr. decipiens*. Die Beobachtungen erfolgten im Lichte einer weissen Glühbirne von 75 Watt mit Benützung eines Blaufilters, welcher die Intensität der Färbungen deutlicher zum Ausdruck bringt. Sehr gute Resultate erhielt ich auch in gewöhnlichem Tageslichte. Mit beiden Farbstoffen habe ich grundsätzlich ähnliche Erfolge erzielt, die gelungenen Beobachtungen kamen freilich bei Benützung von Bismarckbraun zustande.

Ich liess die Zellen auf verschiedenen Teilungsstadien färben und nachher beobachtete ich den weiteren Teilungsvorgang. In einer Reihe von Beobachtungen konnte ich die vollständige und normale Teilung von Zellen verfolgen, die schon in der mittleren Prophase gefärbt wurden. Viel weniger Schwierigkeiten bietet die Verfolgung des Teilungsvorganges bei Zellen, welche in der Metaphase oder gar in der Anaphase der Färbung unterzogen wurden. Bei einer gewissen Übung in der Arbeit mit Vitalfarbstoffen und *Tradescantia*-staubfadenhaaren gibt die RUHLAND-SCHAEDESche

Methode wirklich ausgezeichnete und effektvolle Resultate. Ausnahmslos in allen Fällen färbt sich nur die Zellwand und das Zytoplasma, während die Chromosomen und der Kernsaft ungefärbt bleiben. Aus diesem Grunde fällt sehr deutlich und übersichtlich die Polkappenbildung aus. Wir sehen, wie in einem gewissen Momente der Prophase zuerst an einem Pole und dann auch an dem Gegenpole die charakteristische Kernkontraktion erfolgt. Die hyaline und farblose Polkappensphäre hebt sich sehr scharf von der gelben und schwach körnigen Zytoplasmahülle ab, welche den Kern umgibt. Als dann in der Kernsubstanz die die Metakinese einleitenden Bewegungen sich merkbar machen, nehmen die Chromosomen den ganzen farblosen Raum des Kernes ein und verhüllen die Polkappen. Während der Metaphase bleibt die Färbung unverändert: im gelben Zytoplasma liegt der ungefärbte Kernsaft und in diesem die ungefärbten Chromosomen. Im Laufe der Anaphase dehnt sich die Kernsubstanz mitsamt den Chromosomen parallel der Längsachse der Zelle aus, bleibt aber weiterhin ungefärbt (Paragenoplastin bei BLEIER, 1931, substance parachromosomique bei KOERPERICH, 1930). Auch als die Tochterchromosomen schon die Polgegend erreichen, bleibt der Verbindungsschlauch ungefärbt. Da dieser Moment eben für unsere Betrachtung ausschlaggebend ist, wollen wir ihm etwas mehr Aufmerksamkeit zuwenden.

Im Falle einer zu starken und schädlichen Färbung, färbt sich der Verbindungsschlauch (Stemmkörper bei BĚLAŘ, 1929) sogleich gelb, noch während die Chromosomen polwärts auseinanderrücken. Ungefärbt bleiben nur die Chromosomen und der durch dieselben eingenommene Teil des Kernsaftes. In derartigen Fällen kommt aber oft die Kernrekonstruktion in der Telophase nicht mehr zustande und der Phragmoplast bildet sich in der Regel ebenfalls nicht. Es bleibt dennoch die Frage offen, ob der Stemmkörper schon in den ersten Phasen seines Längewachstums in seiner Entwicklung vom Zytoplasma nicht abhängig ist.

In denjenigen Fällen, wo nach der Färbung die Zellteilung normal und ungestört verlief, blieb der Stemmkörper ebenso wie die Kerne ungefärbt, wogegen das Zytoplasma sich gelb färbte. Es folgte dann eine ziemlich beträchtliche Einschnürung der Spindel, schon von ROBYNS (1924–26) mitgeteilt, genauer aber von BĚLAŘ (1929) beschrieben, doch ist die Einschnürung nicht vollständig und das gelbe Zytoplasma greift nicht auf den Spindelraum hinüber. Erst im Momente, wo die Spindel aufzuquellen anfängt, wodurch der Beginn der Phragmoplastenbildung angezeigt wird, beginnt auch die Spindel sich zu vergilben. Dieser Prozeß wurde ganz zweifellos festgestellt, obgleich er nicht in allen Fällen gleich schnell verläuft.

Wahrscheinlich hängt er vom Färbungsvorgang selbst ab. Manchmal sieht man, wie ein Stemmkörper, welcher erst aufzuquellen beginnt und kaum die ersten Zellplattenspuren aufweist, schon ganz deutlich gelb wird, während in anderen Fällen am ganzen Phragmoplasten kaum eine gelbliche Färbung zu erkennen ist. Immerhin kann man feststellen, daß der Phragmoplastenentwicklung parallel die Färbung an Intensität zunimmt, bis sie sich zuletzt mit derjenigen des Zytoplasmas ganz ausgleicht. Andererseits bewirkt die Zugabe einer frischen Farbstoffportion, in der Zeit, während derer der Phragmoplast aus dem Stemmkörper gebildet wird, eine energische Färbung desselben, während die Kerne immer ungefärbt bleiben. Alle diese Umstände scheinen dafür zu sprechen, daß die Stemmkörpersubstanz einer gewissen Veränderung unterliegt, deren Charakter wir hier weder diskutieren noch bei ihrer Kompliziertheit festzustellen vermögen; jedenfalls das eine läßt sich schon jetzt sagen darüber, daß sie zur Bildung einer zytoplasmaartigen Substanz führt. Die Zellplatte, welche in einem derartigen gelben Phragmoplasten entsteht, setzt sich zuerst aus farblosen Körnchen (Tröpfchen) zusammen, welche dann in einer Linie sich zusammenreihen. Nach einer gewissen Zeit kann man mittels Plasmolyse die Anwesenheit einer regelrechten, festen Zellwand feststellen, der gelbe Phragmoplast dagegen verschwindet und läßt ein gelbes wandständiges Zytoplasma zurück, ähnlich demjenigen, welches in allen älteren Zellen vorhanden ist.

Es unterliegt daher gar keinem Zweifel, daß die Stemmkörpersubstanz einer zytoplasmatischen Metamorphose unterliegt, welche auch BĚLAŘ (1928) als möglich annahm und als „Pseudomorphose“ bezeichnete. Auch WASSERMANN (1929) nimmt es als bestimmt an, daß der Zwischenkörper, d.h. das zwischen den Tochterchromosomen liegende Protoplasma, andere Eigenschaften besitzt, als die Metaphasespindel. WASSERMANN vergleicht aber als gleichartig den Stemmkörper aus den Spermatozyten von *Stenobothrus* mit dem Phragmoplasten aus den Wurzelzellen von *Allium*. Wenngleich auch beide Gebilde „Zwischenkörper“ sind, so besagt dieser Umstand noch nichts über den Charakter ihrer Metamorphose und gar anzuzweifeln ist die Gleichartigkeit beider Gebilde.

Bei zytologischer Untersuchung fixiertes Material sowie bei gewöhnlichen Vitalbeobachtungen konnte die Metamorphose des Stemmkörpers auf Grund von gewissen morphologischen Merkmalen angenommen werden. Nach BLEIER (1931) ist als derartiges Merkmal das Auftreten von Vacuolen und Chondriom in dieser Spindel zu betrachten. Wir müssen aber wieder, was den Phragmoplasten von Pflanzenzellen anbelangt, betonen, daß sowohl auf fixiertem

Material (DÉVISÉ, 1922, ROBYNS, 1924–26, KOERPERICH 1930) wie in während der Zellteilung vitalbeobachteten Zellen (BECKER, 1933 b) festgestellt wurde, daß das Chondriom als solches weder in den Stemmkörper noch in den Phragmoplasten herübertritt. Somit bleibt als einziger morphologischer Beweis der Verwandlung des Stemmkörpers in Pflanzenzellen die Zellplattenbildung und das Aufquellen der Spindel übrig. Bei Vitalfärbung mit Azofarbstoffen läßt sich jedoch diese Verwandlung sogar da nachweisen, wo es infolge irgendwelcher Störungen im Teilungsvorgang nicht zur Bildung der Zellplatte kommt. In diesem Falle beginnt die farblose und typisch abgeschnürte Spindel regelmäßig zu quellen und nimmt eine tonnenförmige Gestalt an, gleichzeitig wird sie intensiv gelb. Obwohl eine derartige Spindel fast den ganzen Querschnitt der Zelle einnimmt, ist keine Spur von einer Zellplatte an ihr zu erkennen. Nach einer kurzen Zeit verschwindet dieser Pseudophragmoplast und es bleibt eine typische zweikernige Zelle zurück. Wo die Zellplatte fehlt, fehlt auch der morphologische Beweis für eine Verwandlung des Stemmkörpers (abgesehen von der Quellung, vgl. WASSERMANN, 1929). Das Resultat der Vitalfärbung liefert uns auch da den Beweis dafür. Ich glaube, daß diese Methode uns voll zur Annahme einer wirklichen Metamorphose des Stemmkörpers und nicht nur einer hipotetischen „Pseudomorphose“ (BĚLAŘ, 1928) berechtigt. Auf Grund einer beträchtlichen Anzahl von Vitalbeobachtungen an Zellen, welche auf diese Weise gefärbt wurden (ich habe insgesamt 157 Mitosen verfolgt) muß ich aber betonen, daß der Phragmoplast nicht immer sich nach dem oben dargestellten Schema bildet.

Die andere Art und Weise, nach welcher sich der Phragmoplast in einer Zelle mit gelbgefärbtem Zytoplasma bildet, ist nicht minder charakteristisch: der farblose Stemmkörper schnürt sich typisch ein und in seiner Mitte tritt gelbgefärbtes und schwachkörniges Zytoplasma auf, welches eine mehr oder weniger breite Sphäre zwischen den ungefärbten Kernen einnimmt. Aus demselben entsteht bald der gelbe hyaline Phragmoplast mit der typischen Zellplatte. Währenddessen quillt das Zytoplasma nicht nur in der Querrichtung sondern auch in der Längsrichtung der Zelle an, so daß die Kerne, welche oft sehr nahe nebeneinander liegen, durch den Phragmoplasten weit auseinandergerückt werden. In dem dargestellten Falle scheint der Phragmoplast sich ausschließlich nur auf Kosten des sich gelb färbenden Zytoplasma zu bilden. Auch dieser Zytodieresetypus führt zur normalen und vollständigen Zellteilung, wie man sich mittels Plasmolyse leicht überzeugen kann.

In gewissen pathologischen Fällen vitaler Zellfärbung läßt sich die Einschnürung der farblosen Spindelsubstanz ebenfalls feststellen

(Abb. 1), ja in derartigen Fällen kommt es sogar zu einer vollständigen Einschnürung. Der Phragmoplast hat sich jedoch da, nach meinen Beobachtungen wenigstens (vgl. WADA, 1932), nicht gebildet.

Die dargestellten Beobachtungen, sowie die mikrurgischen Untersuchungen von WADA (1932, vgl. besonders S. 122–123 u. 129–131), veranlassten mich zur Verfolgung des Zytodieresevorganges in Zellen, welche mit Azofarbstoffen nicht gefärbt wurden. Bei diesen Untersuchungen, die ich im Juni-Juli 1933 vorgenommen habe, konnte ich mich überzeugen, daß die erwähnten zwei „Zytodieresetypen“ in den Staubfadenhaaren von *Tradescantia* ganz unabhängig von der Vitalfärbung vorkommen. Der erste „Typus“, wo der Stemmkörper unmittelbar

in den Phragmoplasten hinübergeht, läßt sich ganz zweifellos feststellen, es kann aber auch vorkommen, daß zwischen den Kernen körniges Zytoplasma auftritt und erst aus diesem sich die zytokinetische Spindel bildet. Wodurch der eine oder der zweite Weg bedingt ist, kann ich nicht entscheiden, immerhin bin ich zufällig auf gewisse Umstände aufmerksam geworden, welche nicht ohne Einfluß dabei zu sein scheinen.

Eines Tages (15. VII. 1933) habe ich für Untersuchung Staubfadenhaare von Blütenknospen benützt, welche seit 3 Tagen im Laboratoriumsraum standen. Die Blätter dieser Knospen waren an den Enden etwas vergilbt. In den erwähnten Staubfadenhaaren gingen noch zahlreiche Zellteilungen vor sich,¹⁾ in allen diesen Fällen jedoch (12 F.) entstand der Phragmoplast aus einem körnigen Protoplasma, welches sich zwischen den Tochterkernen festgesetzt hat. Trotz eines gewissen abnormen Zustandes der Knospen, liefen die Zellteilungen ganz normal bis aus Ende ab. In 3 Fällen habe ich die Zellen plasmolysiert und konnte mich von der Anwesenheit einer normalen Zellwand überzeugen. Nicht minder wichtig ist aber der Umstand, daß gewisse nicht erfaßbare Veränderungen in den Beobachtungsbedingungen (Temperatur, Licht, Alter des Materials) be-

Abb. 1. Pathologische Durchschnürung des Stemmkörpers. Die Zeichnungen während der Observation entworfen. Näheres im Text.

1) Bekanntlich hören bei *Tradescantia*-pflanzen, welche im Blumentopf länger gehalten werden, die Zellteilungen auf.

stimmte Änderungen des Bildes hervorrufen können. Ganz ähnliche Zytodierese-bilder kommen oft in Staubfadenhaaren von Knospen vor, welche im Spätherbst von der Pflanze gepflückt werden. Ich vermute, daß das Übergreifen von Zytoplasma auf die Spindel, wie es die ersten Beobachter der Zellteilung in lebenden Zellen beschrieben haben (vgl. TREUB, 1878, HANSTEIN, 1879, ZACHARIAS, 1888) eben auf derartige Zytodieresebilder, von Zellen, welche in besonderen Bedingungen zur Beobachtung gelangten, zurückzuführen ist.

Gegenüber der Paragenoplasttheorie von BLEIER (1931) können wir mithin folgende Stellung einnehmen: die These BLEIERS „jeder Paragenoplast aus einem Paragenoplasten“ (1931, S. 48) scheint keinem Zweifel zu unterliegen; ebenso die vollständige Durchschnürung des Paragenoplasten, wenigstens in gewissen pathologischen Fällen. In den meisten Fällen aber bleiben wie es scheint Teile des Paragenoplasten zwischen den Tochterkernen zurück, wo sie einen deutlichen zytoplasmatischen Charakter annehmen. Der Phragmoplast bildet sich entweder aus dem gelbgefärbten Zytoplasma, welches im Äquator des eingeschnürten Paragenoplasten auftritt, oder er entsteht unmittelbar durch Veränderung des früher ungefärbten Stemmkörpers. Ebenso unterliegt es keinem Zweifel, daß beim zweiten Zytodieresetypus der Äquatorialteil des Stemmkörpers, oft sogar der ganze Raum zwischen den Tochterkernen durch gelb sich färbendes, körniges Protoplasma eingenommen wird. Wir wollen aber nicht vergessen, daß dieser Umstand uns noch nicht zur Behauptung berechtigt, daß körniges Zytoplasma von aussen auf das Gebiet der eingeschnürten Spindel herübergetreten ist. Es wäre ganz gut möglich, daß die Spindel ganz bzw. nur teilweise sich verändert und eine bestimmte körnige, „zytoplasmatische“ Struktur annimmt. Im Lichte der von mir früher beschriebenen Degenerationserscheinungen im Phragmoplasten, würden derartige Bilder ganz möglich und verständlich sein (vgl. BECKER, 1933 a, S. 137, 139–142, 149–152.) Aus diesem Grunde glaube ich auch, daß die Frage der vollständigen Durchschnürung des Paragenoplasten d.h. des gänzlichen Übertritts desselben in die Tochterkerne, in diesem Falle nicht definitiv gelöst werden kann. Denn stets wird die Möglichkeit einer teilweisen wenigstens Strukturveränderung des Paragenoplasten oder des Zytoplasmas nicht aus der Hand gewiesen werden können. Selbst BLEIER schreibt (1931, S. 35): „Allerdings ist es noch eine offene Frage, ob Teile des Paragenoplasten zwischen den Kernen zurückbleiben oder alles in die Tochterkerne aufgenommen wird. Sollte festgestellt werden, daß Paragenoplastenteile zurückbleiben, so kann diesen doch keine wesentliche Bedeutung für die Ausbildung der Verbindungsspindel zukommen,

wie die Verhältnisse im Endosperm eindeutig beweisen“ Bei Vitalbeobachtung, irgendwelche Zytoplasmabewegungen von einer bestimmten Richtung (wie z.B. Übertritt auf das Spindelgebiet) nicht festgestellt werden können.

Eine Schlußfolgerung ist aber sicher: der zytoplasmatische Charakter des Phragmoplasten. Ein Anteil von Kernsubstanz an der Bildung desselben ist zwar sehr wahrscheinlich, morphologisch jedoch weisen die protoplasmatischen Substanzen des Phragmoplasten alle Eigenschaften von Zytoplasmassubstanz auf.

Im Anschluß daran ist interessanterweise die Frage der Vitalfärbung der Zellplatte wieder aktuell geworden. Wie ich früher mitgeteilt habe, muß man, um eine Vitalfärbung der Zellplatte zu erlangen, die Zelle auf einem frühen Mitosestadium (Pro- oder Metaphase) färben (BECKER, 1932 b). Obwohl diese Bedingung notwendig ist, ist sie doch nicht hinreichend. Jetzt nach einer Reihe neuer Beobachtungen neige ich eher zur Annahme, daß Vitalfärbung der Zellplatte dann erfolgt, wenn sich dieselbe unmittelbar aus der Stemmkörpersubstanz bildet, beim „zweiten Zytodieresetypus“ dagegen, trotz der frühzeitigen Färbung mit Vacuolarfarbstoffen, nicht zustande kommt. Wenn ich auch nicht ganz sicher bin, ob dieser Umstand für die Vitalfärbung der Zellplatte entscheidend ist, so will ich doch auf die Tatsache hinweisen daß auch da, wo Phragmoplast und Zellplatte außerhalb der Kernfigur sich bilden (vgl. BECKER, 1933, S. 140–143) die Zellplatte trotz intensiver und frühzeitiger Vakuolenfärbung sich nie färbt. Vielleicht wird diese Beobachtung zur Aufklärung des Mechanismus der Zellplattenvitalfärbung beitragen.

III

Außer den Azofarbstoffen, welche in Übereinstimmung mit den Angaben RUHLANDS und SCHAEDE sich für die Vitalfärbung des Zytoplasmas besonders gut eignen, habe ich auch andere zytoplasmatische Farbstoffe zu benützen versucht, u.a. insbesondere Methylviolett und Dahliaviolett, welche schon von CAMPBELL (1888), zwecks Vitalfärbung von Zellen während der Zellteilung, verwendet wurden. Im Vergleich mit den Azofarbstoffen, waren jedoch die betreffenden Resultate ziemlich ohne größere Bedeutung.

Dahliaviolett färbt das Zytoplasma entweder gleichmäßig violett oder nur die Kleinkörnchen desselben, ähnlich wie Janusgrün oder Phenosafranin (vgl. BECKER 1933 b). Wird das Zytoplasma in der Prophase der Färbung unterzogen, dann wird der weitere Teilungsprozeß der Zelle stets aufgehalten. Die Färbung in der Metaphase hält die weitere Teilung zwar nicht auf, doch ist sie unvollständig.

Färbt sich das ganze Zytoplasma violett, dann wird der Phragmoplast, wie es scheint, ebenfalls violett; färben sich nur Körnchen, dann bleibt der Phragmoplast ungefärbt.

Unbequem ist der Umstand, daß die erwähnten Farbstoffe auch die Kerne, den Kernsaft sowie das Chromatin und die Nucleoli, leicht färben (CAMPBELL, 1888). Färbt sich neben dem Zytoplasma noch der Kern, dann wird die weitere Teilung eingestellt, wenn auch ausnahmsweise – wie ich gelegentlich in drei Fällen festgestellt habe – sie weiter fortschreiten kann.

Jeder, der systematisch mit den Methoden der Vitalfärbung sich befaßt hat, weiß von der Schwierigkeit zu erzählen den Zellkern vital zu färben, ohne daß gleichzeitig die Zellteilung eingestellt wird. Von einigen Untersuchungen älteres Datums abgesehen, welche noch der Überprüfung bedürfen (eine Zusammenstellung derselben befindet sich bei MÖLLENDORF, 1920) muß zugegeben werden, daß eine derartige, zu breitangestellten Versuchen geeignete Methode eigentlich noch nicht erfunden wurde.

Die sauren Farbstoffe GICKLHORNS (1930) liefern einerseits auch nur sehr phragmentarische Resultate, andererseits wurde diese Methode an Querschnitten durch junge *Tradescantia*-blätter ausgearbeitet, welche ein viel weniger durchsichtiges und zur Vitalbeobachtung geeignetes Objekt als z.B. die Staubfadenhaare derselben Pflanze darstellen. Meiner Meinung nach, ist auch gegenüber dieser Methode der Skeptizismus RUHLANDS (1924) an Platze, welcher bezüglich der Angaben CAMPBELLS bemerkt, daß „diese Angaben sind fast überall auf Mißtrauen und Ablehnung gestossen“ (S. 202). Für mich ist es aber unzweifelhaft, daß gewisse Strukturveränderungen und Verschiebungen in während der Teilung gefärbten Zellkernen gar nicht ausgeschlossen sind. Die Beobachtungen von CAMPBELL halte ich für ganz gut möglich.¹⁾

In den betreffenden beobachteten drei Fällen von Teilungen gefärbter Kerne, traten die Strukturverschiebungen, jeweils an einem anderen Stadium auf.

In erstem Falle handelte es sich um eine frühzeitige Prophase mit spiralgewundenen Fäden, wie auf Phot. 6, T. III, bei BĚLAŘ (1929). Die Fäden waren deutlich blau (Dahlia violett). Die blaue Färbung der Kerne war zwar schwach trotzdem jedoch ganz zwei-

1) Wie weit der Skeptizismus der Forscher gegenüber den betreffenden Beobachtungen reicht, beweist das erwähnte Zitat über CAMPBELL und der nächstfolgende Satz aus der Hand RUHLANDS (1924, S. 202): „Man darf aber nicht vergessen, daß die Arbeit des genannten Verfassers unter den Augen von PFEFFER entstanden ist...“ Zur Wahrhaftmachung der Angaben CAMPBELLS bedürfte es der Autorität PFEFFERS!

felllos vorhanden. Glücklicherweise lag das Staubfadenhaar mit der betreffenden Zelle neben einem anderen, das ganz farblose Kerne hatte, wodurch die Färbung bedeutend an Deutlichkeit gewann. Die Teilung schritt bis zum Stadium der bouquetartig gelagerten dicken Chromosomen fort, welche schon violett gefärbt waren. Auf diesem Stadium wurde die weitere Teilung eingestellt, obzwar die Zelle noch eine längere Zeit am Leben blieb. Ja, schon nach der Einstellung der Kernteilung, begann im Zytoplasma eine intensive Rotationsbewegung der violettgefärbten Körnchen, vollkommen ähnlich den Vorgängen im Ruhestadium! Dieser Umstand beweist, daß aller Wahrscheinlichkeit nach eine gewisse gegenseitige Unabhängigkeit mancher Vorgänge im Zellkern und im Zytoplasma besteht (vgl. DEMOOR, 1893, und BECKER 1933 a).

Im zweiten Falle unterlagen die blauen, schon an den Polen gelegenen Anaphasechromosomen teilweise der Kathachromasie obzwar dieser Prozeß nicht bis zur Bildung von definitiven Ruhekernen hingeführt hat.

Im dritten Falle haben die Chromosomen, welche in der Anaphase sich blau gefärbt haben, noch einen ziemlich weiten Weg nach den Polen hin zurückgelegt, ohne aber später die Telophase zu rekonstruieren. Zwischen den Chromosomen trat ein rudimentärer Phragmoplast mit Zellplatte auf.

Wie ich mich überzeugen konnte, läßt sich die Wanderung der gefärbten Chromosomen zu den Polen verhältnismäßig leicht bei Benützung von Malachitgrün beobachten (vgl. die Arbeit von ALBACH, 1927). Im Effekt ist diese Färbung viel durchsichtiger und selektiver als die mit Methyl-bzw. Dahliaviolett. Malachitgrün färbt nur das Chromatin schön grün, wogegen der Kernsaft, die Nucleoli, die Spindel und das Zytoplasma ungefärbt bleiben. Der Farbstoff selbst ist sehr schädlich und hemmt den Mitoseablauf. Falls wir aber stark verdünnte Lösungen benützen und der Kern erst in der Anaphase sich zu färben anfängt, dann legen die Chromosomen noch einen ziemlich langen Weg zu den Polen zurück; es kann ebenfalls ein rudimentärer Phragmoplast entstehen. Die beigefügten Abbildungen stellen eben eine Reihe von darauffolgenden Mitosestadien vor, vom Momente der Grünfärbung der Chromosomen an (Abb. 2, a-c).

Ich möchte jedoch auf den Umstand aufmerksam machen, daß die Chromosomen sich gefärbt haben, als sie schon gänzlich voneinander abgetrennt waren und nur nebeneinander lagen. Derartige Chromosomen waren es, welche später gegen die Pole abgedrängt wurden. Nimmer jedoch habe ich ein Auseinandergehen von Chromosomen beobachten können, welche in den Anfangsstadien der

Anaphase bzw. in der späten Metaphase gefärbt wurden. Der Umstand, daß in allen erwähnten Fällen das Zytoplasma (aber auch der Kernsaft!) ungefärbt blieb, kann als weiterer Beweis für die Autonomie mancher Vorgänge in der Zelle gelten.

Abb. 2. Das Auseinanderrücken von Chromosomen, welche mit Malachitgrün gefärbt wurden; 14²⁰, 15, 15³⁸; Die Zeichnungen während der Observation entworfen und dann schematisch ergänzt. Erklärung im Text.

In allen Fällen von Malachitgrünfärbung haben die gefärbten Chromosomen das Ruhestadium nicht wieder herzustellen vermocht, obwohl die Färbung mit der Zeit infolge der Reduktion des Farbstoffes verschwunden ist.

IV

Nachdem ich mir über die Aussichten der Vitalfärbung verschiedener Zellstrukturen, während der Zellteilung der Pflanzenzelle, klar geworden bin, stellte ich mir zur Aufgabe, womöglich auch die Methoden der mehrmaligen vitalfärbung zu erforschen. Die Untersuchungen, welche in dieser Hinsicht auf Dauerzellen vorgenommen wurden erfreuen sich in der Literatur eines genügend bekannten Rufes.¹⁾ Mich interessierten dabei zwei Fragen: erstens, inwieweit die Methoden zwei-drei-u.s.w.-facher Vitalfärbung zur Klärung gewisser mit der Zellteilung zusammenhängender zytologischen Probleme herangezogen werden können und zweitens, ob und auf welche Weise die Vitalfärbung einer Zellstruktur während der Zellteilung die Färbung anderer Zellstrukturen beeinflußt.

Was die erste Aufgabe anbelangt, so ist eine definitive Lösung derselben auf einmal unmöglich. Ich selbst habe manche Vorgänge bei vitaler Doppelfärbung zur Klärung gewisser mit der Zytodierese zusammenhängender Probleme auszunützen versucht. Zukünftigen Untersuchungen muß es überlassen werden, auch andere Probleme mittels dieser Methoden zu lösen. Einstweilen wollen wir nur die Methoden selbst sowie deren Wert kennenlernen. Bisher habe ich folgende vitale Mehrfärbungen durchgeführt:

1) Die Arbeiten von BECQUEREL, GUILLIERMOND, RUŽIČKA u.a.

a) Vacuolen- Zellplatte- und Chondriom-vitalfärbung. Diese Färbung gelingt verhältnismäßig leicht. Meistens ging ich so vor, daß ich zuerst das Chondriom mittels Janusgrün und dann die Vacuolen mit Neutralrot färbte. Die Färbung der Zelle in der Prophase bewirkt die Einstellung der weiteren Zellteilung—was wahrscheinlich der Wirkung von Janusgrün zuzuschreiben ist (BECKER, 1933 b)—dagegen gelang es mir die ganze Mitose zu verfolgen, falls ich die erwähnte Doppelfärbung in der Metaphase vorgenommen habe. Die Entmischung im Phragmoplasten (= Zellplatte) wird durch eine rote Färbung der Äquatorialebene desselben angezeigt, ziegelrot sind auch die Vacuolen. Gleichzeitig liegen im Zytoplasma rings um den Kern und den Phragmoplasten grüne Körnchen dicht nebeneinander. Sehr typisch treten diese Körnchen im Zytoplasma auf, welches dem in die Breite sich ausdehnendem Phragmoplasten in dessen Äquatorialebene liegt. Irgendwelche Metamorphosen bzw. eine Abnahme dieser Körnchen im Zytoplasma während der Quellung des Phragmoplasten und der Ausbreitung der Zellplatte läßt sich nicht feststellen.

Ebenso kann man mit Erfolg die Vacuolen in der Prophase färben und die Zelle dann auf den späteren Stadien (Meta- bzw. Anaphase) mit Janusgrün nachfärben. Der Effekt bleibt ähnlich. Bei diesen Färbungen kommen abnorme Kernteilungen vor, welche für die Vacuolarfärbungen mit Neutralrot charakteristisch sind (BECKER, 1933 a). Die Teilung kann gänzlich bis ans Ende ablaufen, es kann sich eine totale Zellplatte bilden, die Kerne rekonstruieren die Ruhephase.

b) Vacuolen- Zellplatte- und Zytoplasma-färbung. Diese Vitalfärbung erhielt ich mit irgendeinem Azinfarbstoffe sowie einem der oben erwähnten Azofarbstoffe. Die gelbfärbung des Zytoplasmas und des Phragmoplasten verhindert gar nicht die Färbung der Zellplatte durch die Vacuolarfarbstoffe. Meistens habe ich die Zelle mit dem Vacuolenfarbstoff in der Pro- bzw. Metaphase gefärbt und dann schon im Laufe der Anaphase oder noch früher das Zytoplasma mit einem Azofarbstoffe behandelt. Das gewonnene Bild ist sehr effektiv: die Kerne sind ungefärbt, Zytoplasma und Phragmoplast sind gelb, Vacuolen und Zellplatte sind rot (Neutralrot) oder violett (Kresylblau). Die Färbung der Zellplatte mit Kresylblau, mit gleichzeitiger Zytoplasma- und Phragmoplastfärbung habe ich eingehender verfolgt. Es stellte sich heraus, daß diese Färbung rein violett ausfällt, ohne jedwede Spur von Grün. Dieser Umstand beweist, daß während der Entmischung die Zytoplasma-phase von der Phase flüssiger, die Zellplatte bildender, Granula vollständig abgetrennt ist. Im Gegenfall d.h., falls das Zytoplasma des

gelben Phragmoplasten mosaikartig zwischen der violetten Granulaphase liegen würde, müßte diese Struktur vom Profil aus grün bzw. schmutzig-grün erscheinen. Ebenso ist es für mich gegenwärtig klar, daß die Färbung der Phragmoplastenränder während der Spaltung desselben in der Zellplattenebene, wie ich sie während der Plasmolyse vitalgefärbter Zellen erhalten habe (BECKER, 1932 d, Phot. 6–9, T. XVI), als Artefakt entsteht, infolge Auseinanderreißen der flüssigen Granulaphase und teilweiser Adsorption derselben an den plasmatischen Phragmoplastenrändern.

Den obigen Schlußfolgerungen kann man jedoch den einen Vorwurf entgegenstellen, daß ich in meinen bisherigen Versuchen mit dieser vitaler Doppelfärbung eine vollständige Zellteilung nicht erzielen konnte. Die Mitose endet mit der Entmischung der Zellplatte, eine feste Zellwand bildet sich aber nicht. Vielleicht werden weitere Untersuchungen diese Lücke ausfüllen, möglicherweise wird es sich auch herausstellen, daß eine derartige vollständige Phasetrennung nur eine Artefakterscheinung ist.

Einige Anomalien in der Kernteilung, insbesondere nach Kresylblaufärbung kommen auch hier vor.

c) Chondriom- und Zytoplasmafärbung. Diese Vitalfärbung erzielte ich mit Bismarckbraun und Janusgrün oder Bismarckbraun und Phenosafranin; im letzteren Fall färben sich auch die Zellwände (BECKER, 1933 b). Meistens habe ich in der Metaphase zuerst das Chondriom und nachher das Zytoplasma gefärbt. Auch wenn man beide Färbungen früh (in der Metaphase) und gleich nebeneinander vornimmt und die weiteren Vorgänge während der Zellteilung und in den Tochterzellen verfolgt, kann man sich überzeugen, daß sogar nach 8–12 Stunden die grünen bzw. roten Körnchen im gelben Zytoplasma weder degenerieren noch ihre Gestalt ändern. Trotzdem ist die Teilung sehr oft nicht total und endet mit der Bildung eines unvollständigen Phragmoplasten und der Zellplatte. Nach Phenosafranin degeneriert der Phragmoplast fast immer (BECKER, 1932 a, 1933 b).

d) Auf Grund der unter a, b, und c dargestellten Färbungen, versuchte ich in einer Zelle die Vacuolen, die Zellplatte, das Chondriom, das Zytoplasma und die Zellwand vital zu färben. Dieser Versuch gelang nur teilweise. In der mit entsprechenden Farbstoffen in der Prophase bzw. Metaphase überladenen Zelle schritt die Teilung zwar fort, ging aber nie zu Ende. Da jedoch jeder einzelne der erwähnten Farbstoffe nur in einem bestimmten Stadium der Mitose eine gewisse Rolle für meine Untersuchungen spielte, habe ich sie nacheinander in verschiedenen Zeitabschnitten benützt um nur im gewünschten Moment die gewünschte Färbung zu erzielen. So

konnte ich in einem Falle eine mehr weniger komplette Zellteilung von der Prophase bis zur Bildung der ganzen Zellplatte verfolgen, wobei Phragmoplast und Zytoplasma gelb (Bismarckbraun), Vacuolen und Zellplatte violett (Kresylblau), das Chondriom grün (Janusgrün) und die Zellwände rot (Phenosafranin) gefärbt waren. Die Vacuolen habe ich in der Prophase gefärbt, das Chondriom während der Metakinese, das Zytoplasma am Beginn der Anaphase und nachher die Zellwand. Die Differenzierung aller erwähnten Elemente war sehr deutlich und effektiv. Die Kerne blieben die ganze Zeit ungefärbt und erreichten die totale Rekonstruktion in der Telophase.

Eine andere Serie von vitalen Mehrfärbungen welche ich noch im Jahre 1931 begonnen habe, steht im Zusammenhange mit der Frage vitaler Zellwandfärbung.

e) Eine derselben bestand in einer Doppelfärbung von Vacuolen, Zellplatte und Zellwand mit Kresylblau und Phenosafranin. Diese Farbstoffe habe ich absichtlich mit Rücksicht auf den Farbenunterschied so zusammengestellt. Es handelte sich mir darum, ob es mittels dieser Methode nicht möglich wäre den Übergangsmoment der flüssigen Substanz der Zellplattenkörnchen in die stabile Zellwand zu erfassen und festzustellen wie bei diesem Vorgang die vitale Färbung abläuft. Das Resultat dieser Versuche stellt sich folgendermaßen dar:

In einigen Fällen beobachtete ich eine stufenhafte, langsame Entfärbung der Zellplatte bis zur vollständigen Farblosigkeit, worauf in der Mitte des von den plasmatischen Rändern der Tochterzellen gebildeten Spaltes die rote Linie der Zellwand erschien. In anderen Fällen verlaufen beide Prozesse gleich nacheinander so, daß gleich nach dem Verschwinden der Violett färbung der Zellplatte die rote Linie der Zellwand auftritt. Mehrfache Plasmolysierungsversuche beweisen jedoch die Anwesenheit einer Phase, wo zwischen den Phragmoplastenrändern ein dünnes festes bzw. halbfestes Häutchen vorhanden ist, welches sich mit Phenosafranin noch nicht färbt. Diesen Vorgängen beabsichtige ich ein anderes Studium zu widmen.

f) Mit demselben Farbstoffpaar gelingt es manchmal außer den Vacuolen, der Zellplatte und der Zellwand noch das Chondriom zu färben, doch meistens bewirkt diese Färbung eine Degeneration des Phragmoplasten. Bei der unter e) dargestellten Doppelfärbung ist es ratsam mit Phenosafranin die Zelle erst im letzten Moment vor der Wandbildung zu färben.

g) Ohne größere Schwierigkeiten gelingt endlich die gleichzeitige Vitalfärbung von Zytoplasma, Chondriom und Zellwand. Zu dieser Färbung, welche nur eine gewisse Vereinfachung der unter d) beschriebenen darstellt, benützte ich sowohl die Kombination Bis-

marckbraun-Janusgrün-Phenosafranin, wie die Kombination Bismarckbraun-Phenosafranin. Unter gewissen früher erwähnten Vorbehalten geben beide Kombinationen ziemlich gute Resultate.

Weitere Experimente mit anderen Farbstoffkombinationen sind gewiß noch möglich, die Gruppe der Azin- und Azofarbstoffe eignet sich dazu ganz besonders. Hier habe ich nur diejenigen Versuche berücksichtigt, die ich selbst bisher ausgeführt habe. Nicht zu vergessen ist, daß die erlangten Resultate mit den erwähnten Farbstoffen nur auf den Staubfadenhaarzellen von *Tradescantia virginiana*, *pilosa* und *decipiens* erzielt wurden. Nur die Vitalfärbung der Zellplatte habe ich auch an anderen Objekten durchgeführt. (BECKER, 1932 d, S. 391, 412). Zukünftigen Untersuchungen muß es überlassen werden, ob und inwieweit andere Färbungen sowohl für andere Untersuchungsobjekte wie für andere Zellteilungstypen sich eignen.

Zusammenfassung

1. Im Zusammenhange mit einer gründlichen Bearbeitung der Methoden vitaler Zytoplasmafärbung mit Azofarbstoffen (nach den Vorschriften von RUHLAND und SCHAEDE), wurde die Paragenoplastentheorie von BLEIER einer näheren Diskussion unterzogen und auf die Schwierigkeiten der Interpretation mancher vitalen Protoplasmastrukturen hingewiesen. Die einzige Schlußfolgerung aus der betreffenden Färbungsmethode scheint darin zu bestehen, daß der Phragmoplast ein Gebilde von zytoplasmatischem Charakter darstellt.

2. Weiters wurde eine Reihe von vitalen Mehrfärbungen einer Zelle beschrieben. Durch verschiedene Kombination vacuolarer, chondriomaler, zytoplasmatischer und zellmembraniger Farbstoffe gelingt es während der Zellteilung alle einzelnen Zellstrukturen zu differenzieren.

3. Die Arbeit enthält außerdem einige Beobachtungen über Vitalfärbung von Kernen während der Zellteilung.

Literaturverzeichnis

Albach, W.	1927.	Über vitale Kern- und Protoplasmafärbung pflanzlicher Zellen. Zeitschr. f. wiss. Mikroskop., 44.
Becker, W. A.	1932a.	Influence des colorants de la serie des azines sur la marche de la cinese somatique dans les racines chez <i>Allium Cepa</i> . Revue gen. de Bot., 44. p. 24.
—————	1932b.	Über die Vitalfärbung der Zellplatte. Protoplasma, 15, S. 478.
—————	1932c.	Recherches experimentales sur la cytocinese et la formation de la plaque cellulaire dans la cellule vivante. C. Rend. Acad. Sc., 194, p. 1850.
—————	1932d.	Badania eksperymentalne nad barwieniem za zycia dzialacych sie komórek. Studja nad cytokineza. (Experimentelle Untersuchungen über die Vitalfärbung sich teilender Zellen. Studien über die Zytokinese.) Acta Soc. Bot. Poloniae, IX, S. 381.

- Becker, W. A. 1933a. Vitalbeobachtungen über den Einfluß von Methylenblau und Neutralrot auf den Verlauf von Karyo- und Zytokinese. Beitrag zur Pathologie der Mitose. *Cytologia*, 4, S. 135.
- 1933b. Application de la coloration vitale à l'étude de la cytodierèse. *C. Rend. Acad. Sc.*, 196, p. 2022.
- Bělar, K. 1928. Die cytologischen Grundlagen der Vererbung. Berlin, 412 S.
- 1929. Beiträge zur Kausalanalyse der Mitose III. Untersuchungen an den Staubfadenhaarzellen und Blattmeristemzellen von *Tradescantia virginica*. *Zeitschr. f. Zellf. u. mikr. Anat.*, 10, S. 73.
- Bleier, H. 1931. Zur Kausalanalyse der Kernteilung. *Genetica*, 8, S. 27.
- Campbell, D. H. 1888. The staining of living nuclei. *Unters. aus dem Bot. Inst. zu Tübingen*, 2, S. 569.
- Demoor, J. 1898. Contribution à l'étude de la physiologie de la cellule (indépendance fonctionnelle du protoplasma et du noyau). *Arch. de Biol.* 13, p. 163.
- Dévisé, R. 1922. La figure achromatique et la plaque cellulaire dans les microsporocytes du *Larix europaea*. *Cellule*, 32, p. 249.
- Gicklhorn, J. 1930. Zur Frage der Lebendbeobachtung und Vitalfärbung von Chromosomen pflanzlicher Zellen. *Protoplasma*, 10, S. 345.
- Hanstein, J. 1879. Über die Gestaltungsvorgänge in den Zellkernen bei der Zellteilung. *Sitz.-Ber. Niederrh. Ges. f. Nat. u. Heilk.*, S. 145.
- Koerperich, J. 1930. Etude comparative du noyau, des chromosomes et leurs relations avec le cytoplasme. *Cellule*, 39, p. 309.
- Martens, P. 1929. Nouvelles recherches experimentales sur la cinèse dans la cellule vivante. *Cellule*, 39, p. 167.
- Möllendorf, W. 1920. Vitale Färbungen an tierischen Zellen. *Ergebn. d. Physiol.*, 18, S. 141.
- Pfeffer, W. 1886. Über Aufnahme von Anilinfarben in lebende Zellen. *Unters. aus dem Bot. Inst. zu Tübingen*, 2, S. 325.
- Robyns, W. 1924/26. Le fuseau de caryocinèse et le fuseau de cytocinèse dans les divisions somatiques des Phanérogames. I, II, et III P. *Cellule*, 34, p. 367, et 37, p. 145.
- Ruhland, W. 1912. Studien über die Aufnahme von Kolloiden durch die pflanzliche Plasmahaut. *Jahrb. f. wiss. Bot.*, 51, S. 394.
- 1924. Vitalfärbung bei Pflanzen. *Abderhalden Handb. biol. Arbeitsmeth.* Abt. XI, T. 2, S. 187.
- Schaepe, R. 1923. Über das Verhalten von Pflanzenzellen gegenüber Anilinfarbstoffen. *Jahrb. f. wiss. Bot.*, 62.
- 1924. Untersuchungen über Zelle, Kern und ihre Teilung am lebenden Objekt. *Beitr. Biol. d. Pfl.* 14, S. 231.
- Traub, M. 1878. Quelques recherches sur le rôle du noyau dans les divisions des cellules végétales. *Natuurk. Verh. k. Akad. d. Wetensch. Amsterdam*, Deel 19, 35.
- Wada, B. 1932. Mikrurgische Untersuchungen lebender Zellen in der Teilung I. Die Bildung von Tetraploidkernen, zweikernigen Zellen und anderen abnormen Teilungsbildern. *Cytologia*, 4, S. 114.
- Wassermann, F. 1929. Wachstum und Vermehrung der lebendigen Masse: Hdb. d. mikr. Anat. des Menschen. I. Bd., 2. T., 807 S.
- Weber, F. 1929. Protoplasmatische Pflanzenanatomie. *Protoplasma*, 8, S. 291.
- Zacharias, E. 1888. Über Kern- und Zellteilung. *Bot. Ztg.* 46, S. 33-40 u. 51-62.