

(Aus dem Institut für Pflanzenökologie der Universität Greifswald.)

# Gewinnung isolierter Zellen aus pflanzlichen Geweben durch Pektinasewirkung.

Von R. BAUCH und H. J. OVERBECK.

Mit 2 Textabbildungen.

Das übliche Schnellverfahren zur Feststellung von Chromosomenzahlen in Wurzelspitzen, die Behandlung mit kochender Karminessigsäure nach HEITZ, bewirkt neben der Färbung eine gewisse Mazeration der Zellverbände. Die durch die Säurebehandlung erzielte Lockerung des Zellgefüges reicht im allgemeinen aus, um durch einen Druck auf das Deckglas für Zählungen geeignete Einzelzellen oder kleinere Zellkomplexe zu erhalten. In vielen Fällen ist aber die Zerlegung des Gewebes in Einzelemente noch recht unvollkommen und selbst mehrmaliges Aufkochen mit Karminessigsäure führt zu keinen besseren Ergebnissen. Der Wunsch, eine Zerlegung der Wurzelspitzen bis zu den einzelnen Zellen durchzuführen, veranlaßte uns, Fermente als Mazerationsmittel zu

Hauptbestandteile Pektinasen sind, das aber auch noch kräftige Proteasen enthält (OPPENHEIMER, p. 523). Zur Lösung der Enzyme wurden etwa 0,5 g der Substanz 24 Stunden lang mit 10 ccm Wasser bei Zimmertemperatur digeriert und nach Filtration verwendet. Legt man frische oder mit Alkohol-Eisessig fixierte Wurzeln in eine derartige Lösung ein, so ist nach dreistündiger Behandlung die Lösung der Pektin-Mittellamelle bereits so weit vorgeschritten, daß ein leichter Druck auf das Deckglas genügt, um die Wurzeln in einen Brei von Einzelzellen zerfallen zu lassen. Für die Karminessigsäurefärbung zerteilt man die Wurzeln zweckmäßig mit Nadeln im Farbtropfen möglichst klein, kocht unter dem Deckglas auf und zerdrückt dann das Gewebe. Durch diese Zerteilung

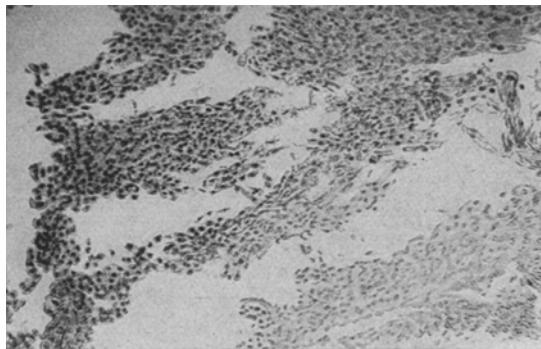


Abb. 1. Zwiebelwurzel. 3 Stunden mit Filtragol behandelt; Karminessigsäurefärbung. Die Gewebe sind einschichtig ausgebrettet. Objektiv 3, Okular 2.

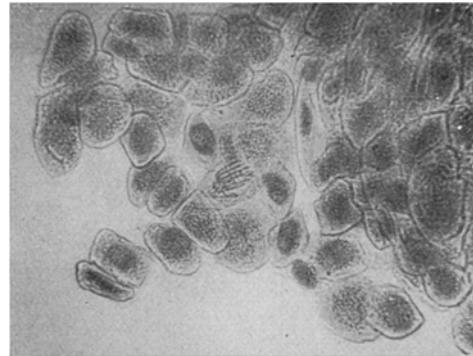


Abb. 2. Zwiebelwurzel. Gleiche Behandlung. Kernstrukturen werden durch die Fermente nicht geschädigt. Objektiv 6, Okular 2.

verwenden. Für diese Zwecke kamen in erster Linie Zellulasen und Pektinasen in Frage. Derartige Fermentpräparate sind von der pharmazeutischen Industrie teils für medizinische, teils für technische Zwecke in den Handel gebracht worden. Als Zellulase wurde das „Luizym“ des Luitpoldwerkes München, als Pektinase das „Filtragol“ von Bayer-Leverkusen geprüft. Das Zellulasepräparat erwies sich für unsere Zwecke als ungeeignet. Selbst bei jüngsten Wurzelmeristemen konnte mit ihm keinerlei Lockerung des Gewebezusammenhangs erzielt werden. Dagegen war es mit dem Pektinasepräparat ohne besondere Schwierigkeiten möglich, das Gewebe völlig zu erweichen. Wir verfügen jetzt über zweijährige Erfahrung mit dieser Methodik und glauben, daß dadurch die Schnellverfahren zur Chromosomenzählung nicht nur in schwierigeren Fällen, sondern ganz allgemein vereinfacht werden können.

F i l t r a g o l wird für technische Zwecke der Mostbereitung verwendet, um die in der Obstsaftkellerei häufig unangenehm auftretenden Pektintrübungen zu beseitigen. Das technische Präparat besteht aus fein zerkleinerten Pflanzenteilen, auf denen besonders aktive Rassen von *Aspergillus niger* kultiviert worden sind. Es stellt also ein Enzymgemisch dar, dessen

vermeidet man, daß sich mehrere Zellschichten übereinander legen (Abb. 1.) Die Filtragol-Behandlung stört die Klarheit der zytologischen Details in keiner Weise (Abb. 2). Auch die im Präparat vorhandenen Proteasen machen sich bei einer derartig kurzzeitigen Behandlung nicht weiter störend bemerkbar. Die Innehaltung eines bestimmten pH-Wertes ist für unsere Zwecke nicht erforderlich. Für die Pektinasen ist zwar ein pH-Wert von 6,0 optimal, aber die fixierten Wurzeln bringen genügend Säure mit, um die Lösung der Mittellamelle zu gewährleisten. Überdies tritt diese Lösung auch im neutralen und leicht alkalischen Bereich ein, erfordert nur eine etwas längere Dauer der Einwirkung. Die Filtragolbehandlung läßt sich, wenn man vorfixierte Wurzeln verwendet, sogar noch abkürzen. Nach  $\frac{1}{2}$ - bis 1 stündigem Aufenthalt in der Lösung sind die Wurzeln genügend mit dem Ferment durchtränkt. Überträgt man sie dann in Wasser, so läuft die enzymatische Spaltung weiter und führt etwa in der gleichen Zeit zur Erweichung der Gewebe wie bei dauernder Einwirkung der Fermentlösung. Die Filtragollösung trübt sich bei längerer Aufbewahrung leicht durch bakterielles Wachstum. Die pektinlösende Wirkung leidet darunter aber nicht. Noch 10 Tage alte Lösungen, die bereits

stark getrübt waren, gaben uns zufriedenstellende Wirkung.

Wie spezifisch die Filtragolbehandlung die Pektininasen zur Wirkung kommen läßt und wie weit die Proteasen dabei zurücktreten, ergibt sich am besten aus der Tatsache, daß lebende Wurzelspitzen durch die Behandlung nicht nennenswert in ihrer Wachstumsintensität gestört sind, trotzdem sie vollständig erweicht sind und unter dem Deckglas in einen Zellbrei zerfallen. Nach Übertragung in Wasser bleiben die Meristemteile noch etwa 3 Tage lang deutlich erweicht, bis die Wirkung der Pektinase bei dem weiteren Wachstum der Wurzel nachläßt. Es bietet sich hier also eine einfache und schonende Methode, um lebende Zellen für experimentelle Zwecke in größeren Mengen aus Geweben zu isolieren. Wie wenig die Behandlung die Zellen in ihrem Stoffwechsel stört, ergibt sich am besten aus der Tatsache, daß die Protoplasmaströmung von *Tradescantia*-Staubfadenhaaren selbst bei 24 stündigem Aufenthalt in der Stammlösung unverändert abläuft.

Filtragol wirkt nicht nur bei zarteren Wurzelspitzen und Sproßmeristemen, sondern erweicht auch jüngere Blattstiele und Sproßteile. So ließen sich junge Sprosse von *Paeonia*, *Aquilegia* und *Primula* leicht in Einzelzellen zerlegen. Dabei lösten sich zuerst die Markzellen voneinander, während Rinde und Leitbündel nach 3stündiger Einwirkung noch fest geblieben waren. Eine 24stündige Behandlung führte aber auch bei diesen resistenteren Geweben zur Aufhebung

des Gewebezusammenhaltes. Dagegen war es bei ausgewachsenen Organen, Sprossen und Blättern, selbst bei längerer Behandlung, nicht möglich, Einzelzellen zu erhalten. Hier dürften die Mittellamellen bereits weitere chemische Veränderungen erlitten haben, die die Löslichkeit der Pektinlamelle herabsetzen.

Neuerdings verwenden wir an Stelle des technischen Präparates einen Fermentauszug, der uns seitens der Herstellerfirma entgegenkommenderweise zur Verfügung gestellt wurde. Er wirkt in der gleichen Weise wie das technische Präparat.

#### Zusammenfassung.

Die Isolierung von Einzelzellen aus jugendlichen lebenden oder fixierten pflanzlichen Geweben gelingt leicht durch Lösung der Mittellamelle mit Pektininasen. Eine 3ständige Filtragol-Behandlung reicht aus, um den Zellverband so weitgehend zu lockern, daß durch leichten Druck auf das Deckglas größere Mengen isolierter Zellen zu erhalten sind. Diese Vorbehandlung erleichtert das Aufsuchen geeigneter Stadien für die Chromosomenzählung nach den üblichen Schnellverfahren. Da die Lebensvorgänge in der Zelle durch die Behandlung nicht gestört werden, ermöglicht dieses Verfahren auch die Isolierung lebender Zellen aus dem Gewebeverbande.

**Amerkung:** Falls Filtragol derzeit auf dem Handelswege nicht erhältlich sein sollte, dürften Obstsaftkeltereien in der Lage sein, die erforderlichen geringen Mengen abzugeben.

## REFERATE.

### Allgemeines.

**M. B. CRANE, Origin of Viruses.** (Ursprung von Viren.) *Nature* **155** (1945).

Bei Ppropfung der Apfelsorte Lord Lambourne auf andere Sorten sind zwei Abnormitäten aufgetreten: 1. die Zweige haben beim Wachstum in sich keinen festen Halt, so daß schon wenige Früchte die Zweige fast senkrecht nach unten ziehen; 2. die Früchte werden nur ein Viertel so groß wie gewöhnlich. Bei Ppropfung von Lambourne auf die Sorte Excelsior entwickelte Lambourne nur schlaffes Geäst, bei Ppropfung derselben Varietät auf die Sorte Redcoat Grieve entsteht die kleinfrüchtige Abnormität. Gleiche Reaktionen treten auf, wenn man Lambourne auf andere Sorten ppropft. Verf. glaubt, daß die Abnormitäten auf Viren zurückzuführen sind, und daß diese Viren unmittelbar während der Ppropfung entstanden sind, und zwar durch Eindringen von Proteinen einer Varietät in die Zellen der anderen. Eine ähnliche Erscheinung, die diese Vorstellung stützen könnte, haben andere Autoren bei Kartoffelpropfungen gefunden.

*Bandlow.*

**B. LINDQUIST, The main varieties of *Picea Abies* (L.) Karst. in Europe, with a contribution to the theory of a forest vegetation in Scandinavia during the last Pleistocene glaciation.** (Die Hauptvarietäten der Fichte in Europa, mit einem Beitrag zur Theorie einer Waldvegetation während der letzten Diluvialvereisung.) *Acta Horti Bergiani* (Uppsala) **14**, 249 bis 342 (1948).

Die Behaarung der einjährigen Triebe der Fichte nimmt in Europa von S nach N zu, umgekehrt nimmt die Häufigkeit ganz kahler Exemplare nach N zu rasch ab, wie die Untersuchung von 380 Populationen (je 100 Stück) aus ganz Skandinavien, 29 aus der Schweiz und 75 in Skandinavien angepflanzten Herkünften aus Mitteleuropa zeigte. An Stelle der früheren, ausschließlich auf die Form der Zapfenschuppen gegründeten Varietäten wird eine neue Gliederung der Art durchgeführt, die auch die Triebbehaarung berücksichtigt. Behaarte Zweige hat

der Haupttyp und die nicht mehr als selbständige Art anerkannte var. *obovata* (Ledeb.) Fellm., kahle Zweige zwei neue Varietäten, die in Mitteleuropa verbreitete var. *germanica* Lindq. mit rhombischen Zapfenschuppen und die var. *arctica* Lindq. mit kleineren Zapfen und verkehrt-eiförmigen Schuppen. Diese Varietät hat ein eigenartig zersplittertes Areal an der Grenze der Fichtenverbreitung von W-Norwegen bis Kola, das die verschiedensten klimatischen Bedingungen umfaßt. Da ferner eine Reihe von Glazialrelikten dieselbe Verbreitung zeigt, wird nach eingehender Diskussion der Schluß gezogen, daß die Varietät ein Glazialrelikt ist, die Fichte also schon im letzten Interglazial in Skandinavien gelebt und wohl Walder gebildet hat. Sie muß dann, wie eine Auswertung der Literatur über Pollenanalyse ergibt, ein zweites Mal im Spätglazial von Mitteleuropa her eingewandert sein. Der Hauptschub kam aber erst im Atlantikum von Finnland her über die Ostsee. Er verdrängte die unter dem Klima der Wärmezeit nicht mehr konkurrenzfähigen Fichten aus dem Spätglazial oder sog sie auf. Auf die Einkreuzung der aus Mitteleuropa stammenden Fichte der Südeinwanderung dürfte noch die geringe Behaarung der heutigen südkandinavischen Fichten zurückgehen. Die var. *arctica* wurde in ihre heutigen Vorpostenstandorte an der Verbreitungsgrenze der Art zurückgedrängt. Gleichzeitig mit der Einwanderung des Haupttyps drang var. *obovata* von N-Asien her über Kola nach N-Skandinavien vor.

*Paul (Bonn).* **oo**

**A. I. LUSS, Citruskulturen in der UdSSR.** Moskau-Leningrad, Verlag Selzozgiz, 132 S. 25 Abb. (1947). [Russisch.]

Das Buch besteht aus drei Teilen: 1. Entstehung der Citrusarten und die Aufgaben ihres Einführens, 2. Das neue System der botanischen Klassifikation der Gattung *Citrus*, 3. Die Ergebnisse des Einführens und der Sortenforschung der Citruskulturen in der UdSSR. Die wichtigste Aufgabe des Einführens sieht Verf. im Heranziehen des züchterischen Ausgangsmaterials aus nördlichsten und besonders hoch in Gebirgen liegenden natürlichen