

Zeitschrift: Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse
Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft
Band: 76 (1966)

Artikel: Vergleichende Röntgendiffraktionsuntersuchungen an Spermatozoiden in den spermatogenen Fäden von Chara (Armleuchteralge)
Autor: Hollenstein, Hans Ulrich
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-53580>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 08.02.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Vergleichende Röntgendiffraktionsuntersuchungen an Spermatozoiden in den spermatogenen Fäden von Chara (Armleuchteralge)

Von *Hans Ulrich Hollenstein*

Dipl. Naturwissenschaftler ETH

Manuskript eingegangen am 10. September 1966

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	452
II. Das Objekt und seine Eigenschaften	455
1. Die Gewinnung von Antheridien	455
2. Die Spermiogenese der Characeen	455
3. Die optische Anisotropie der Spermatozoiden	457
4. Methodische Fragen	457
III. Röntgenuntersuchungen	459
1. Material und Methode	459
a) Objekte und Materialaufbereitung	459
b) Herstellung der Röntgenpräparate, Feuchtigkeitskontrolle	461
c) Röntgenaufnahmen	461
d) Auswertung der Diagramme	462
2. Resultate	462
a) Der Einfluss der Zellwand	465
b) Tierische Vergleichsobjekte und DNS	468
c) Reife spermatogene Fäden	471
IV. Diskussion	472
V. Zusammenfassung	474
Literaturverzeichnis	475

I. Einleitung

Die Thymusdrüse ist das klassische Ausgangsobjekt für die Gewinnung grösserer Mengen Desoxyribonukleinsäure (DNS), welche deshalb ursprünglich als Thymonukleinsäure bezeichnet wurde. Im gequollenen Zustande liefern die Alkalisalze solcher DNS-Präparate Gele, aus denen Fäden gezogen werden können. In diesen Fäden sind die Kettenmoleküle

der Nukleinsäuren so weitgehend parallelisiert, dass ein quasi-kristalliner Zustand entsteht, der es dank der vielen Röntgeninterferenzen der Faserdiagramme, die er liefert, ermöglichte, ein Strukturmodell der DNS aufzustellen (z. B. Langridge et al., 1960).

Die Auswertung der Faserdiagramme der DNS-Fäden ergibt, dass sich die Fadenmoleküle in verschiedener Weise strecken und zusammenlagern können. Abhängig sind diese Modifikationen vom anwesenden Alkali-metall, vor allem aber vom Wassergehalt der Fasern. Durch dessen Veränderung können die Modifikationen zum Teil reversibel ineinander übergeführt werden. Bei 92 % rel. Feuchtigkeit bilden Fasern von Alkali-metallsalzen der DNS ein semikristallines hexagonales Gefüge in der sogenannten B-Form. Die zugrunde liegende B-Konfiguration des DNS-Moleküls entspricht grundsätzlich dem Modell von Watson und Crick (1953) und wird wie folgt beschrieben:

Das DNS-Molekül bildet eine Doppelschraube gegenläufiger Polynukleotidketten. Die Desoxyribosephosphathelices tragen auf der Innenseite die Purin- und Pyrimidinbasen, die durch Wasserstoffbrücken zu komplementären Paaren verbunden werden. Die Ringebenen der Basenpaare stehen senkrecht zur Molekülachse, und ihr Abstand beträgt 3,4 Å. Da die Faserperiode 34,0 Å misst, sind 10 Paare pro Umdrehung einer Helix vorhanden (Langridge et al., 1960).

Der B-Form kommt eine besondere Bedeutung zu, da das DNS-Molekül auch in Kombination mit Proteinen diese Konfiguration beibehält. Man kann daher Fasern von extrahierten oder in vitro rekombinierten Nukleoprotaminen und Nukleohistonen verschiedenster Herkunft herstellen. Sie ergeben Faserdiagramme, die in ihren Grundzügen eine grosse Ähnlichkeit mit Diagrammen reiner DNS besitzen. Hieraus folgt, dass die basischen Proteine ohne grössere Störung des semikristallinen Gitters in der einen oder andern Weise an die parallelen DNS-Moleküle angelagert sein müssen (Wilkins, 1956).

Als geeignete Untersuchungsobjekte natürlicher Nukleoproteide haben sich eine Anzahl tierischer Spermienköpfe erwiesen. Ihr ausserordentlich kompakter Bau, der sie licht- und elektronenmikroskopisch homogen erscheinen lässt, ist bekannt. Dazu tritt in vielen Fällen starke optische Anisotropie (negativ einachsige Doppelbrechung, UV-Dichroismus), die eine parallele Anordnung der Nukleoproteinmoleküle anzeigt (Schmidt, 1937; Wilkins, 1951). Die Übereinstimmung der optischen Eigenschaften von DNS-Fasern und Heuschreckenspermien ist auffallend. Die feinbauliche Ordnung und die sich daraus ergebende Anisotropie folgen weitgehend der äusseren Gestalt der Spermienköpfe. Von isodiametrischen, isotropen bis zu spiess- und nadelförmigen, stark anisotropen Vertretern existieren alle Übergänge (Patri, 1932). Röntgendiagramme

zeigen, dass bereits in kompakten isotropen Spermienkernen kristalline Bündel von Nukleoproteinmolekülen vorkommen, die aber unter sich ungeordnet sind. In anisotropen, langgestreckten Kernen sind diese Kristallite ausserdem parallel zur Spermienkopfachse ausgerichtet. Im Falle von *Sepia*-Spermien ist es gelungen, auch die Spermienkopfachsen zu orientieren und Faserdiagramme zu erhalten (Wilkins und Battaglia, 1953; Wilkins und Randall, 1953). Von einigen weiteren tierischen Objekten haben getrocknete unorientierte Spermienköpfe und intakte, lebend aufgenommene Spermatophoren vergleichbare Pulverdiagramme ergeben (Wilkins, 1956). Eine Ausdehnung der Untersuchungen auf pflanzliche Objekte fehlt.

Nun kennt man aber auch bei den Kormophyten und ihren unmittelbaren Vorgängern begeisselte männliche Gameten mit kompakten, mikroskopisch homogenen Kernen (Tschermak-Woess, 1963). Insbesondere ist die für Archegoniaten charakteristische schraubige Verlängerung der Spermatozoidenkerne zu erwähnen (Vazart, 1963).

Optische Anisotropie ist zunächst als Einzelfall für die Mikrogameten von *Cystosira barbata* (*Fucales*) von Ullrich (1936) beschrieben worden. An den Spermatozoiden in den spermatogenen Fäden von *Chara contraria* (*Charales*) hat sie Becker (1937) entdeckt. Pfeiffer (1949) bestätigt eine weite Verbreitung dieser Erscheinung bei den Spermatozoidenkernen von *Lycopodium*, *Selaginella*, *Isoetes*, *Equisetum*, *Ophioglossum*, *Polypodium* und *Marsilea* (*Pteridophyta*).

Es wäre nun von Interesse, abzuklären, ob die erwähnten pflanzlichen Spermatozoiden den gleichen Typus der DNS enthalten wie die tierischen Spermien. Es wird zwar allgemein angenommen, dass die pflanzliche DNS mit der tierischen identisch sei, doch liegen hierfür bislang keinerlei Beweise vor.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher mit Versuchen, diese Vermutung durch Anwendung von Röntgendiffraktionsmethoden zu überprüfen. Vergleiche mit Diagrammen bekannter tierischer Objekte sollen zeigen, ob die DNS auch im pflanzlichen Spermatozoidenkern kristallographisch in der B-Form vorliegt, die dem Watson-Crick-Modell entspricht.

Untersucht wurden die spermatogenen Fäden von *Chara*-Arten. Die Eignung dieses Objektes wird im folgenden Abschnitt diskutiert.

Herrn Prof. Dr. A. Frey-Wyssling und Herrn Prof. Dr. F. Ruch am Institut für Allgemeine Botanik ETH (Zytologie) danke ich für Anregungen und Ratschläge während der Arbeit, Herrn Prof. Dr. J. D. Dunitz am Laboratorium für Organische Chemie ETH (Strukturanalyse) für die Erlaubnis zur Benützung der Einrichtungen für Vorversuche und für die Diskussion der Ergebnisse und Herrn Prof. Dr. H. Zollinger am Technisch-Chemischen Laboratorium ETH (Textilchemie) für die Überlassung der Röntgenanlage.

II. Das Objekt und seine Eigenschaften

1. Die Gewinnung von Antheridien

Im Vergleich zu tierischen Spermien kommen pflanzliche Spermatozoiden im allgemeinen je Geschlechtsorgan in viel kleinerer Zahl zur Reife. Sie sind daher auch weniger leicht in genügender Menge zu beschaffen. Eine Ausnahme bilden die Characeen. Es dürfte kaum ein zweites pflanzliches Objekt geben, bei dem mit ähnlich geringem Aufwand jederzeit Spermatozoiden gefunden werden können. Jedes der zahlreichen Antheridien an einem Triebe entlässt Tausende von Spermatozoiden. Ausserdem sind die Characeen an ihren natürlichen Standorten meist in Massen entwickelt. Durch Stecklingsvermehrung lassen sie sich relativ einfach in Kultur nehmen. Mit zusätzlicher Beleuchtung setzen sie auch ausserhalb der Fruktifikationsperiode (Sommer bis Herbst) reichlich Antheridien an (Karling, 1924). Die leicht von blossem Auge sichtbaren, zuletzt orangeroten Antheridien entstehen an den quirlständigen Kurztrieben. Ihr Entwicklungsstadium kann mit einiger Übung an ihrer Grösse, Farbe und Stellung am gesamten Trieb abgeschätzt werden.

Reife Antheridien finden sich stets im untersten (ältesten), manchmal auch im zweituntersten Quirl, der überhaupt noch Antheridien trägt. Die Entleerung erfolgt regelmässig fortschreitend von den distal zu den basal stehenden Antheridien eines Kurztriebes. Untersucht man daher Antheridien in der Nachbarschaft von solchen, deren Schildzellen sich bereits geöffnet haben oder abgefallen sind, so findet man unschwer ausgereifte Spermatozoiden. Gelegentlich kann auch ihr Schlüpfen auf dem Objektträger verfolgt werden.

2. Die Spermiogenese der Characeen

Eine zusammenfassende Darstellung gibt Vazart (1963). Die zytologische Arbeit von Delay (1949) behandelt besonders die Umwandlungen des Kerns und bespricht die meist ältere Literatur. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben Sato (1954) und Eggmann (1966) angestellt.

Die acht Schildzellen der Antheridienwand tragen nach innen je eine Stielzelle mit mehreren primären und sekundären Köpfchenzellen. Von den sekundären Köpfchenzellen wachsen die spermatogenen Fäden aus und erfüllen das Lumen der Antheridien. Ihre Zellenzahl beträgt dabei in der Regel 2^n und kommt durch synchrone Teilungsschritte zustande (Geitler, 1948). Die grosse Zahl der Fäden (je nach Art gegen hundert), die reihenweise auftretenden synchronen Mitosestadien, das rasche Wachstum und die leichte Präparierbarkeit machen die spermatogenen

Fäden ganz allgemein zu einem interessanten zytologischen Objekt. Bei spätestens 128 Zellen pro Faden, nach dem 7. Teilungsschritt, sind die Spermatischen ausgebildet, und die eigentliche Spermiogenese beginnt.

Nach eigenen Beobachtungen im Phasenkontrastmikroskop rückt zuerst der Kern in der scheibenförmigen Zelle zur Seite. Das Cytoplasma zieht sich etwas von der Längswand der Zelle zurück und bildet eine Rinne zur Aufnahme der in mehreren Windungen auswachsenden zwei Geisseln. Der Kern verdichtet sich vom Rande her, verliert Volumen und wird lichtmikroskopisch homogen. Das Cytoplasma treibt in zwei verschiedenen Ebenen Fortsätze, die allmählich in entgegengesetzter Richtung zum Vorder- und Hinterende der Spermatozoiden auswachsen. Der Kern beginnt sich unter Querschnittsverringerung zu strecken, krümmt sich sichelförmig und windet sich schliesslich schraubig auf.

Die reifen Spermatozoiden im freischwimmenden Zustand haben die Gestalt kurzer Korkenzieher (Abb. 1). Ihr Durchmesser beträgt ca. $5 \mu\text{m}$, die Ganghöhe bis $4 \mu\text{m}$. Das körnige, vakuolisierte plasmatische Schwanzstück ist ca. $3 \mu\text{m}$ dick und ca. $10 \mu\text{m}$ lang. Das sich verjüngende Vorderende ist etwas kürzer und entlässt ca. $5 \mu\text{m}$ hinter der Spitze die Geisseln. Der Kern bildet unter einem Plasmaüberzug das Mittelstück des Spermatozoidkörpers. Er ist ca. $0,7 \mu\text{m}$ dick und nimmt zweieinhalb Windungen oder ca. $40 \mu\text{m}$ der Schraube ein. Die errechnete und an ausgestreckt liegenden Spermatozoiden gemessene Totallänge beträgt rund $60 \mu\text{m}$, ebenso lang sind die Geisseln. Namhafte artspezifische Unterschiede sind

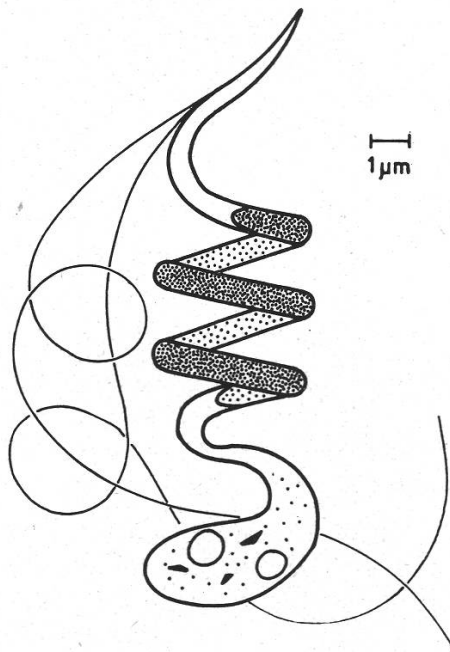


Abbildung 1

Chara-Spermatozoid, reif, geschlüpft, schematisch

bisher nicht beobachtet worden. Bei gleicher Grösse und Gestalt scheint nur die Zahl der pro Antheridium gebildeten Spermatozoiden zu variieren.

3. Die optische Anisotropie der Spermatozoiden

Sobald sich der Kern zu strecken beginnt, tritt zunehmende Doppelbrechung auf. Die Werte der Gangunterschiede steigen an, obwohl der Durchmesser des Kernabschnittes dabei ständig verkleinert wird. Der doppelbrechende Abschnitt deckt sich genau mit den mittleren zweieinhalb Windungen des Spermatozoidkörpers, die sich auch aufgrund der Feulgenschen Reaktion als DNS-haltiger Kern zu erkennen geben. An geschlüpften, frei und mehr oder weniger ausgestreckt liegenden Spermatozoiden von *Chara vulgaris* L. wurden Gangunterschiede bis 20 nm gemessen. Bei einer Kerndicke von $0,7 \mu\text{m}$ ergibt dies eine Stärke der Doppelbrechung von ca. 0,03. Die höchsten bei *Sepia*-Spermien gefundenen Werte (Schmidt, 1937) liegen um 0,04–0,05. Entwässerung durch Alkohol vermag auch hier wie bei den meisten langgestreckten Formen der tierischen Spermien den Gangunterschied nur unmerklich zu steigern. Da an lebenden Spermatozoiden in Wasser, an fixierten in Glycerin und in Kanadabalsam dieselben Werte gemessen werden, kann Formdoppelbrechung ausgeschlossen werden. Die Eigendoppelbrechung ist negativ bezogen auf die Schraubenumgänge des Kerns. Die Auslöschung ist einheitlich und folgt ebenfalls genau der Schraubungsrichtung, so dass undeformierte Spermatozoiden bei Aufsicht in Richtung der Schraubachse ein Sphäritenkreuz zeigen.

Das polarisationsoptische Verhalten der *Chara*-Spermatozoiden stimmt somit völlig überein mit den Verhältnissen bei einer grossen Anzahl tierischer Spermienköpfe (Patri, 1932; Schmidt, 1937). Die DNS-Stränge müssen dicht gepackt parallel zur Kernachse geordnet verlaufen. Diese ist bei den Spermien gestreckt, bei den Spermatozoiden dagegen aufgewunden.

4. Methodische Fragen

Chara-Spermatozoiden lassen sich ihrer geschraubten Gestalt wegen nicht parallel orientieren und zu Fasern bündeln. Dies ist, wie einleitend erwähnt, nur in besonders günstigen Fällen bei gestreckten tierischen Spermien möglich (Wilkins und Battaglia, 1953). Faseraufnahmen fallen damit ausser Betracht. Hingegen können wie von unorientierten tierischen Spermien Pulverdiagramme aufgenommen werden, wenn es gelingt, genügend Spermatozoiden anzureichern. Versuche zur Isolierung intakter, reifer, aber noch nicht geschlüpfter Spermatozoiden aus den spermatogenen Fäden verliefen jedoch unbefriedigend. Da trotz sorg-

fältiger Auslese unter den abgepflückten Antheridien immer nur einzelne die Spermatozoiden spontan entlassen, führte auch diese Sammelmethode nicht weit. Geschlüpfte Spermatozoiden sterben nach einigen Stunden ab und zersetzen sich unter dem Einfluss von Bakterien, die sich rasch entwickeln.

Somit blieb nur noch die Möglichkeit, ganze spermatogene Fäden samt Inhalt zu Präparaten für Pulveraufnahmen zu verarbeiten und für die Vergleichsobjekte dasselbe Verfahren anzuwenden. Pro Röntgenpräparat war jeweils der Inhalt von rund 500 Antheridien erforderlich. Um Material für Kontrollzwecke zu erhalten, mussten entsprechend grössere Mengen gesammelt werden. Auch auf diese Weise dauerte die Sammelzeit so lang, dass eine Fixierung nicht zu umgehen war. Vor dem Schlüpftermin isolierte Fäden sterben rasch ab, und ihr Inhalt zersetzt sich. Sie wurden deshalb laufend in 70% Alkohol eingebracht. Ausserdem sind die Knäuel spermatogener Fäden nach dem Öffnen der Antheridien mit Schleim vermenget. Dieser enthält Trümmer der zum Öffnen aufgestochenen Schildzellen, vor allem Chromoplasten. Mehrmals gewechselter 96% Alkohol fällt den Schleim und löst die Karotine heraus. Bei der anschließenden stufenweisen Überführung aus dem Alkohol in Wasser geht der gefällte Schleim in Lösung, und die spermatogenen Fäden können frei von Verunreinigungen erhalten werden. An den Spermatozoiden bringt Alkohol wie erwähnt keine polarisationsoptischen Veränderungen hervor.

Die Verwendung ganzer spermatogener Fäden hat ferner den Vorteil, dass verschiedene Reifestadien verglichen werden können. Die Auslese erfolgte im Polarisationsmikroskop zwischen gekreuzten Polars mit schwacher Vergrösserung. Als «reife» Fäden sollen im folgenden solche mit maximal doppelbrechenden, ganz aufgewundenen Spermatozoiden bezeichnet werden, als «unreife» jene mit Spermaticenkernen und sehr frühen Spermio-genese-stadien ohne Doppelbrechung. Noch nicht ausgewachsene Fäden sowie schwach doppelbrechende mittlere Spermio-genese-stadien wurden verworfen. Die Ausbeute reif:unreif unter den Antheridien der ältesten Quirle schwankt auf diese Weise zwischen 2:1 und 1:2, je nach Wachstumsgeschwindigkeit der verwendeten Pflanzen.

Um sicher zu sein, dass die beobachteten Effekte der DNS zuzuschreiben sind, wurde diese sowohl aus reifen wie aus unreifen Fäden entfernt. Dies geschah durch Extraktion mit 5% Trichloressigsäure (TCA) bei 90 °C während 15 min. Die Feulgensche Reaktion fiel hierauf aus, bei reifen Spermatozoiden verschwand jede Doppelbrechung, und die Kerngestalt war bis zur Unkenntlichkeit verändert.

Schliesslich muss bei der Verwendung von ganzen spermatogenen Fäden der Einfluss des Zellwandmaterials auf das Pulverdiagramm

berücksichtigt werden. Die Anwesenheit von Zellulose I in der Zellwand der Characeen war bis in neuere Zeit umstritten. Die Membranen zeigen meistens keine der üblichen Zellulosereaktionen, und die Angaben älterer Autoren widersprechen sich daher (Debsky, 1898). Selbst Nicolai und Preston (1952) zählten die Characeen aufgrund von Röntgenuntersuchungen zu einer Algengruppe mit Zellwänden unbekannter Gerüstsubstanz. Chemische Fraktionierungen für *Nitella* (Hough et al., 1952) und *Chara* (Amin, 1955) ergaben aber den Nachweis für eine baumwollähnliche Zellulose. Probine und Preston (1961) fanden schliesslich in *Nitella*-Zellwänden Zellulose I zu 17% des Trockengewichts. Sie zeigten, dass die Zellulose-Interferenzen auf den Röntgendiagrammen je nach Vorbehandlung der Zellwand auftreten oder fehlen, da die Zellulose offenbar durch amorphe Substanzen der Matrix mehr oder weniger maskiert werden kann. Die kristalline Komponente der Zellwand ist jedenfalls Zellulose I, doch ist der mengenmässige Anteil klein, und die Kristallinität ist schwach ausgeprägt. Es ist nicht ohne weiteres anzunehmen, dass die Zellwand der spermatogenen Fäden den gleichen Bau wie die Wand der untersuchten vegetativen Zellen (Internodien, Berindung usw.) besitzt. Man könnte sich vorstellen, dass sie im Hinblick auf die Freigabe der Spermatozoiden weniger fest und verquellbar ist. Daher mussten zum Vergleich auch Pulverdiagramme von vegetativen Zellen aufgenommen werden, wobei die gleiche Vorbehandlung zur Anwendung kam, das heisst das Material wurde in 70% Alkohol fixiert, in 96% Alkohol und anschliessend in Wasser übergeführt. Die Behandlung der spermatogenen Fäden mit TCA zur DNS-Extraktion könnte eventuell einen Einfluss auf die Zellwand und deren Röntgendiagramm ausüben. Deshalb wurde zum Vergleich auch Material vegetativer Zellwände mit TCA behandelt.

III. Röntgenuntersuchungen

1. Material und Methode

a) Objekte und Materialaufbereitung

Spermatogene Fäden von *Chara* (Armlauchteralge)

Man vergleiche hiezu auch Abschnitt II, 4. Methodische Fragen. Zur Verwendung kamen eine Art aus Gewächshauskulturen (Institut für Allgemeine Botanik der ETH) und eine Art aus Torfstichlöchern im Freiland (Katzenseeriet bei Zürich). Sie wurden bestimmt als (Corillon, 1957; Damska, 1964): *Chara vulgaris* L. (= *Ch. foetida* A.Br.), *Chara hispida* L.

Beide Arten wurden laufend abgeerntet beziehungsweise in grösseren Mengen eingebracht und sofort verarbeitet. Die fruktifizierenden Triebe

wurden gründlich gespült, die Antheridien abgenommen und die Schildzellen entfernt. Die spermatogenen Fäden wurden in der beschriebenen Art nach Entwicklungsstadien ausgelesen, in 70 % Alkohol fixiert und in 96 % Alkohol gebracht. Sowohl von Proben reifer wie unreifer Fäden wurde nach Überführung in Wasser je die Hälfte während 15 min bei 90 °C mit 5 % Trichloressigsäure (TCA) behandelt und ausgewaschen.

In analoger Weise wurden vegetative Zellen verarbeitet, alkoholfixiert und hälftig mit TCA weiterbehandelt.

Tierische Vergleichsobjekte

Die tierischen Vergleichsobjekte erhielten nach der Isolierung grundsätzlich die gleiche Vorbehandlung wie die spermatogenen Fäden.

Spermatophoren von *Sepia* (Tintenfisch)

Ungefähr 1 cm lange Spermatophoren von *Sepia officinalis* L. (*Decapoda*) wurden uns von der marinen Station der Université de Paris, Laboratoire Arago, Banyuls-sur-Mer, frisch aus der Spermatophorentasche präpariert, in 70 % Alkohol fixiert und in 96 % Alkohol zugesandt. Bei der Überführung in Wasser schlüpfen die Stränge gebündelter Spermien von selbst aus der Spermatophorenhülle. Pro Röntgenpräparat waren ca. 6 Spermatophoren notwendig.

Spermienzysten von *Locusta* (Wanderheuschrecke)

Aus einer Zucht der entomologischen Abteilung der Firma J.R. Geigy AG, Basel, erhielten wir lebende Männchen von *Locusta migratoria* L. (*Acrididae*). Die Testes wurden in Ringerlösung herauspräpariert, die Follikel isoliert, von der Peritonealhülle befreit, in 70 % Alkohol fixiert und in 96 % Alkohol gebracht. Die apikalen Hälften der Follikel sowie die Vasa efferentia wurden entfernt, so dass nur die ca. 1 mm lange Zone mit den in ihren Zysten gebündelten mehr oder weniger reifen, doppelbrechenden Spermien verblieb (einschliesslich der mesodermalen Epithelien der Zysten- und Follikelwände). Pro Röntgenpräparat wurden die Follikel eines Hodens verwendet.

Spermien von *Salmo* (Bachforelle)

Von der Fischzuchtanstalt R. Leemann in Pfäffikon ZH bezogen wir die Samenflüssigkeit einiger gestreifter Männchen von *Salmo trutta* f. *faria* L. (*Salmonidae*). Die Samenflüssigkeit wurde in 70 % Alkohol fixiert und in 96 % Alkohol aufbewahrt. Für ein Röntgenpräparat genügten wenige ml Suspension.

Desoxyribonukleinsäure (DNS), Na-Salz

Zur Verfügung stand ein sehr reines, faserig-flockiges, häufig zu Testen verwendetes Originalpräparat der DNS aus Kalbsthymus nach Signer und Schwander (1949). Verwendet wurden durch Zupfen im feuchten Zustand hergestellte Fäserchen mit kräftig doppelbrechenden Abschnitten. Eine optimale Orientierung wurde nicht angestrebt.

b) Herstellung der Röntgenpräparate, Feuchtigkeitskontrolle

Ausser der DNS wurden alle Proben aus 96% Alkohol stufenweise in Wasser gebracht, mehrmals gründlich gewaschen, im Polarisationsmikroskop kontrolliert und dann zunächst bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Das Trockengut wurde durch Zerzupfen unter der Lupe sehr fein zerkleinert und möglichst dicht in einseitig verschlossene Lindemannröhrchen von ca. 0,5 mm Durchmesser gebracht. Die gefüllten Röhrchen wurden am freien Ende auf die erforderliche Länge gekürzt und kamen für mehrere Tage über einer gesättigten Lösung von Natriumtartrat in eine Atmosphäre von 92% relativer Feuchtigkeit. Unmittelbar nach der Entnahme wurden sie sofort durch Zuschmelzen verschlossen und für die Befestigung in der Röntgenkamera in einen Präparatträger eingekittet. Die so verschlossenen Röhrchen hielten in der Kamera stets dem angelegten Vakuum stand.

c) Röntgenaufnahmen

Für die Röntgenaufnahmen konnte eine Anlage im Textilchemischen Laboratorium der ETH benützt werden.

Zur Verfügung stand eine Debye-Scherrer-Vakuum-Kamera (Rich. Seifert & Co., Hamburg) von 114,8 mm Durchmesser mit Vor- und Hauptblende von 0,6 mm Durchmesser. Strahlenausstrittsrohr bzw. Primärstrahlfänger von 2,5 mm Durchmesser erlaubten eine Filmlochung von 3 mm Durchmesser. Dies ermöglicht für Cu-K α -Strahlung die Erfassung Braggscher Winkel beziehungsweise von Netzebenenabständen in dem für DNS erforderlichen Bereich von rund 3–20 Å.

Die Kamera wurde betrieben an einer Röhrenhaube Typ M der Iso-Debyeflex-III-A-Feinstruktur-Röntgenapparatur (Rich. Seifert & Co.) mit einer MC-50-Cu-Feinstrukturrohre mit Normalstrichfokus $1 \times 10 \text{ mm}^2$ (= mittlere optisch wirksame Fläche von $1 \times 1 \text{ mm}^2$ am «Punktfokus»-Fenster) plus Nickelfilter. Die Röhrenbelastung betrug 20 kV/30 mA. Die Expositionszeiten lagen um 6–7 Stunden.

Die Aufnahmen erfolgten auf unbedeckten zweischichtigen Industrial-G-Ilford-X-Ray-Film $35 \times 355 \text{ mm}$. Entwickelt wurde während 7 min bei 16 °C in Kodak-DX-80-Entwickler 1:4 und fixiert in Kodak-FX-40-Fixierbad für Röntgenfilme.

d) Auswertung der Diagramme

Die Diagramme wurden mit einem JLC-Walker-Recording-Micro-Densitometer (Joyce, Loebel & Co. Ltd.) ausgemessen. Die Überprüfung von Präparat-Film-Abstand und Densitometerübersetzung erfolgte anhand eines Calcitdiagrammes.

2. Resultate

Abbildung 2 zeigt als Beispiel zwei umgezeichnete Densitometerkurven. Die aus den Densitogrammen ermittelten d -Werte in Å sind in den Kolon-

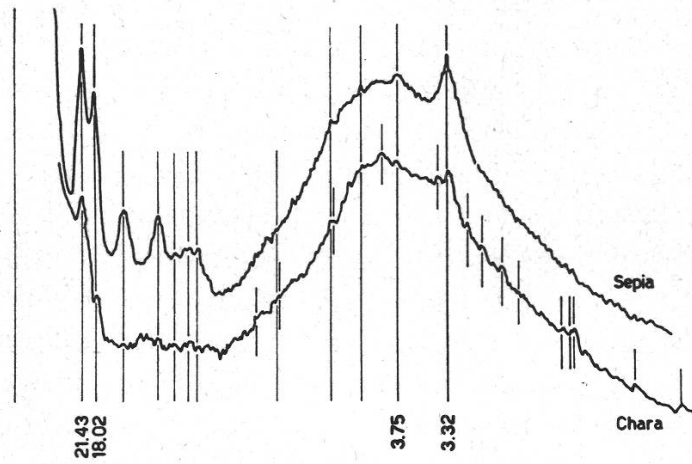


Abbildung 2

Umgezeichnete Densitometerkurven für Pulverdiagramme von *Sepia*-Spermien (Abb. 8 a) *Chara*-Spermatozoiden (Abb. 8 b) plus Zellwand

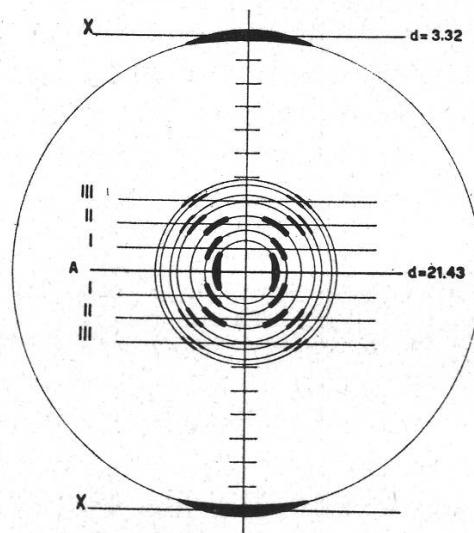
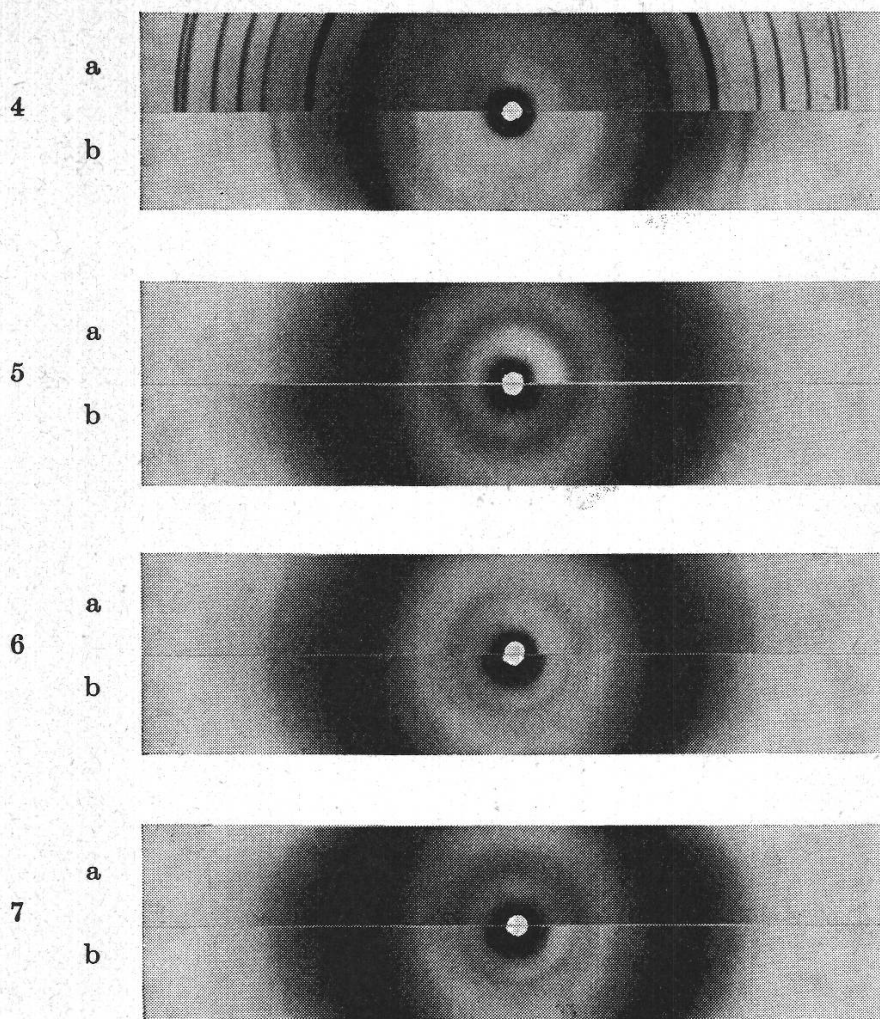


Abbildung 3

Schema eines Faserdiagramms orientierter *Sepia*-Spermien (Wilkins, 1956)
A Äquator, I, II, III, -, X Nummern der Schichtlinien



Abbildungen 4 bis 7

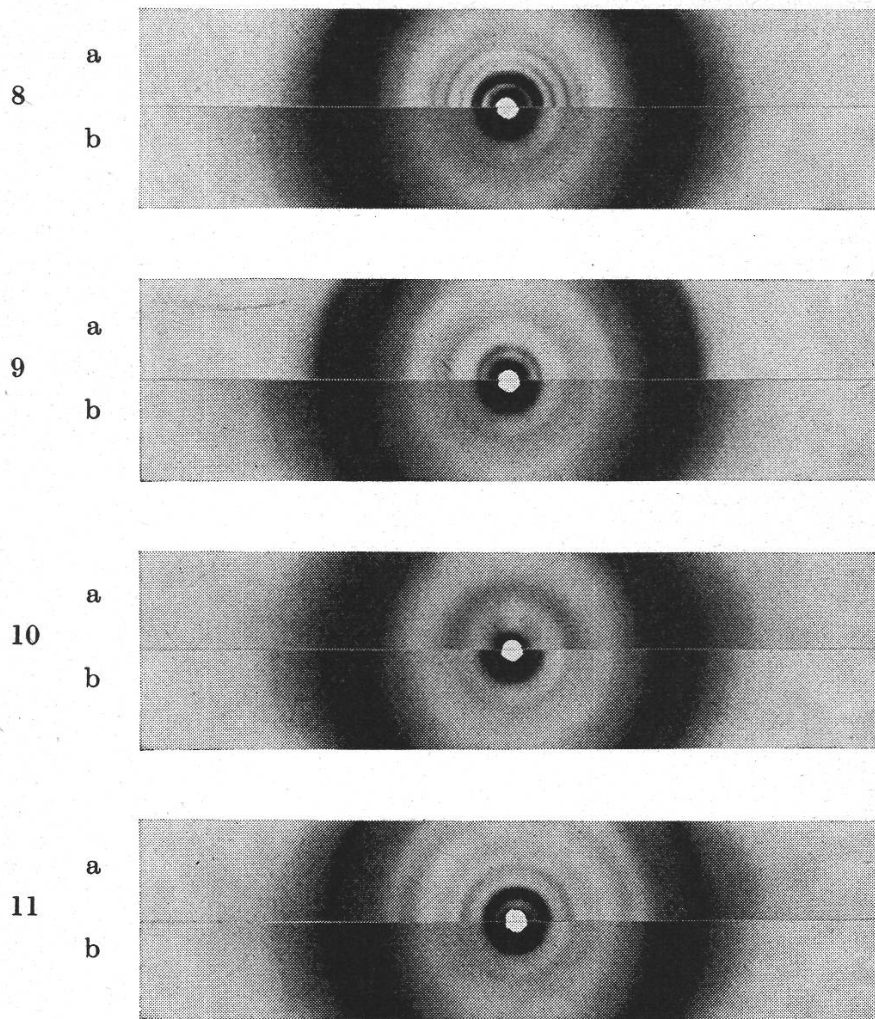
Pulverdiagramme der spermatozogenen Fäden von *Chara* (alkoholfixiert)
bei 92 % relativer Feuchtigkeit

- | | |
|---------------------------------|---------------------------|
| 4 vegetative Zellwand | a vor TCA (Tab. 1/3) |
| | b nach TCA (Tab. 1/4) |
| 5 unreife spermatozogene Fäden | a nach TCA (Tab. 1/5) |
| | b vor TCA (Tab. 1/5) |
| 6 reife spermatozogene Fäden | a nach TCA (Tab. 1/5) |
| | b vor TCA (Tab. 1/6) |
| 7a unreife spermatozogene Fäden | = Abbildung 5b (Tab. 1/5) |
| 7b reife spermatozogene Fäden | = Abbildung 6b (Tab. 1/6) |

Betreffend TCA vergleiche Abschnitt II, 4. Methodische Fragen

nen 3–10 der Tabelle 1 zusammengestellt. Kolonne 1 und 2 enthalten Standardwerte für Calcit und native Zellulose (X-Ray Powder Data File, Inorganic 5–0586, Organic 3–0289, ASTM, Philadelphia, 1960) zum Vergleich. Die Abbildungen 4–11 zeigen Beispiele der zugrunde liegenden Pulverdiagramme.

Relative Intensitäten (Schwärzungen) I/I_1 wurden nicht gemessen. Sie würden zu willkürlich ausfallen, da Überlagerungen von zum Teil



Abbildungen 8 bis 11

Pulverdiagramme von *Chara*-DNS (b) im Vergleich mit tierischer DNS (a)
(alkoholfixiert) bei 92 % relativer Feuchtigkeit

8b–11b	<i>Chara</i> , spermatogene Fäden reif	(Tab. 1/6)
8a	<i>Sepia</i> , Spermatophoreninhalt	(Tab. 1/7)
9a	<i>Salmo</i> , Spermien	(Tab. 1/8)
10a	<i>Locusta</i> , Spermienzysten	(Tab. 1/9)
11a	Na-DNS, Thymus	(Tab. 1/10)

diffusen Linien und Untergrundstreuung vorkommen. Einige qualitativ vergleichende Schätzungen ergeben sich aus den abgebildeten Diagrammen. Scheinbar kontinuierliche Schwärzungen können im Densitogramm anhand von Maxima, Nebenmaxima und mehr oder weniger deutlichen kleinen Schultern der Densitometerkurve zum Teil aufgelöst werden. In der Tabelle 1 sind solche zusammenhängende Schwärzungen durch grosse Klammern bezeichnet. Kursiv sind die *d*-Werte ihrer Maxima, ebenso sind auch alle distinkten Linien hervorgehoben. Undeutlichere Linien sind in kleine Klammern gesetzt, Werte, die nicht zugeordnet werden können, stehen in eckigen Klammern.

a) Der Einfluss der Zellwand

Kolonne 3 der Tabelle 1 enthält die d-Werte für Zellwandmaterial vegetativer Zellen. Für Characeen charakteristisch ist eine starke Inkrustation mit Ca-Karbonat. Die mikroskopischen Kristalle liefern eine Serie von Linien, die das Zellwanddiagramm überlagern (Abb. 4a). Ihre d-Werte sind in der Kolonne 3 entsprechend zur Seite gerückt worden. Durch einen Vergleich mit Kolonne 1 wird diese Serie als lückenloses Pulverdiagramm von Calcit identifiziert. In analoger Weise kann man versuchen, die verbleibenden Linien den d-Werten nativer Zellulose in Kolonne 2 zuzuordnen. Es ergibt sich eine recht gute Übereinstimmung, die beim Diagramm von TCA-behandeltem Material noch besser wird. Die TCA-Behandlung hat hier eine doppelte Funktion: Einerseits soll sie die gleiche Einwirkung auf die Zellwand gewährleisten, mit der man auch bei der Extraktion der DNS aus den spermatogenen Fäden rechnen muss, andererseits löst sie den Kalk. Ausser der Elimination der Calcit-Linien bewirkt sie aber keine Veränderung des Diagramms bezüglich der d-Werte. Hingegen werden einzelne Linien etwas deutlicher (Abb. 4b, Kol. 4).

Im Densitogramm identifizierbar sind vor allem Linien, denen gemäss den Standardwerten in Kolonne 2 eine relative Intensität (I/I_1) von 60 und mehr zukommt, also 5,94 (80), 5,37 (70), 4,30 (60) und die stärkste Zelluloselinie 3,89 (100) als deutliches Maximum des breiten Ringes. Anschliessend folgen 3,16, 3,07, 2,94, 2,86 (alle 40), die eben noch erkennbar der Densitometerkurve aufsitzen. Das Triplet 2,63, 2,59, 2,58 (60, 40, 80) bildet einen einzigen Ring. Von den restlichen Linien sind die stärkeren ebenfalls noch aufzufinden.

Der diffuse Ring mit [10,27] dürfte einem für Zellulose ungewohnten hohen d-Wert entsprechen, der aber bei Zellwänden von Algen und höheren Pflanzen in Erscheinung treten kann (Probine und Preston, 1961). Möglicherweise kann er auch mit den zwei andern abweichenden Werten [4,53] und [4,09] im breiten Ring in Verbindung gebracht werden, welche später besprochen werden sollen. Eine einzige Linie [3,35], die sich in allen *Chara*-Diagrammen zeigt, bleibt unerklärt.

Weiter ist nun zu untersuchen, ob die Zellwand der spermatogenen Fäden ein gleiches Diagramm liefert. Die Diagramme sowohl von unreifen wie von reifen Fäden nach TCA-Behandlung unterscheiden sich nicht (Abb. 5a, 6a). Deren Zellwand dürfte somit im Laufe der Spermiogenese keine strukturellen Veränderungen durchmachen. Die Fäden bleiben in der Tat auch nach dem Schlüpfen der Spermatozoiden bis auf je einen Längsriss pro Zelle völlig erhalten und sind nicht verquollen. Ein Vergleich der gemessenen d-Werte in Kolonne 5 mit den besprochenen d-Werten für vegetative Zellen in Kolonne 4 führt zur Annahme, dass die

Tabelle 1. d-Werte in Å

1		2		3		4		5	
CaCO ₃ Calcit		Native Zellulose		Abb. 4a <i>Chara</i> vegetative Zellen		Abb. 4b <i>Chara</i> vegetative Zellen		Abb. 5a, 5b, 6 <i>Chara</i> spermatogene Fäden unreif — unreif TCA reif TCA	
I/I ₁	ASTM 5-0586 d	I/I ₁	ASTM 3-0289 d	d Calc.	Zellw.	d Zellw.	TCA	d Zellw.	
					[10,27]		[10,27]		[10,27]
		20	6,28		6,30		6,29		6,28
		80	5,94		5,94		5,94		5,94
		70	5,37		5,37		5,37		5,37
		20	5,11		5,10		5,10		5,10
		60	4,30		4,30 [4,53]		4,30 [4,53]		4,30 [4,53]
		100	3,89		(3,90) [4,09]		3,89 [4,09]		3,89 [4,09]
12	3,86			3,86	[3,35]		[3,35]		[3,35]
		40	3,16		3,16		3,16		3,16
		40	3,07		(3,07)		3,07		3,07
100	3,04			3,04					
		40	2,94		(2,94)		2,94		2,94
		40	2,86		(2,86)		2,86		2,86
3	2,85			2,85					
		60	2,63		(2,63)		(2,63)		(2,63)
		40	2,59		(2,59)		(2,59)		(2,59)
		80	2,57		(2,58)		(2,58)		(2,58)
14	2,50			2,49					
		40	2,33		2,33		2,33		(2,33)
18	2,29			2,29					
		60	2,17		2,17		2,17		2,17
		20	2,12						
18	2,10			2,09					
		20	2,04						
		40	1,95		1,95		1,95		(1,95)
5	1,93			(1,92)					
17	1,91			1,92					
17	1,88			1,88					

I/I₁ relative Intensitäten der Interferenzen (Kol. 1 und 2) () umfassen zu diffusen Ringen vereinigte Interferenzen () betreffen undeutliche Interferenzen

	6 Abb. 6b-11b <i>Chara</i> spermatogene Fäden reif —	7 Abb. 8a <i>Sepia</i> Spermatophoren	8 Abb. 9a <i>Salmo</i> Spermien	9 Abb. 10a <i>Locusta</i> Spermienzysten	10 Abb. 11a <i>Thymus</i> Na-DNS
lw.	DNS	d	d	d	d
	21,43 (18,02) (12,62) (11,47)	21,43 18,02 12,99	20,34 (18,02) (12,99)	21,53 (18,02) (12,62)	21,53 (18,02) (12,91) 11,47
	[10,27] 10,04 (8,50) (8,04) (7,49)	9,93 8,93 8,26 7,76	(9,50) 8,66 8,26 7,89	(9,82) (8,93) (8,18) (7,76)	(9,93) 8,75 8,26 7,89
28	(5,40)	(5,40)	(5,40)	(5,40)	(5,40)
94	[4,53]	[4,53]	[4,53]	[4,53]	[4,53]
37	[4,09]	[4,09]	[4,09]	[4,09]	[4,09]
10	[3,75]	[3,75]	[3,75]	[3,75]	(3,75)
30	3,32	3,32	3,32	3,32	3,32
89					
16					
07					
94					
86					
63					
59					
58					
33)					
17					
3)					

treffen Interferenzen, die
cht zugeordnet werden können

*Kursive
Ziffern*

distinkte Linien und Maxima
der Densitometerkurven

spermatogenen Fäden als Gerüstsubstanz ebenfalls Zellulose I enthalten. Die Diagramme sind etwas weniger gut definiert, sonst aber nicht unterscheidbar. Der nicht einzuordnende Ring [4,53] ist besonders ausgeprägt (Abb. 5 a, 6 a).

Der nächste Schritt führt zu den unreifen spermatogenen Fäden ohne TCA-Behandlung. Entsprechend der Erfahrung mit vegetativen Zellwänden sind keine Änderungen zu erwarten. Falls neue Linien auftreten, müssten sie auf das hier nicht extrahierte Kernmaterial der Spermatiden zurückzuführen sein. Abbildung 5 b, verglichen mit 5 a, zeigt, dass keine zusätzlichen Linien erscheinen. Die gefundenen d-Werte entsprechen völlig den bisherigen (Kol. 5). Unreife spermatogene Fäden liefern also ein reines Zellwanddiagramm, nicht sehr gut definiert, aber interpretierbar als Zellulose-I-Diagramm.

Auch in den Diagrammen von reifen spermatogenen Fäden ohne TCA-Behandlung kommen diese Zellwandinterferenzen vor. Hier treten nun aber auffallende zusätzliche Reflexe auf, die vom Zellwanddiagramm separiert werden können, wie dies in Kolonne 6 der Tabelle 1 durch Auseinanderrücken der d-Werte geschehen ist und aus Abbildung 7 b, verglichen mit 7 a, hervorgeht. Die Interpretation dieser zellwandfremden Linien kann durch Vergleiche mit den Diagrammen tierischer Spermien und isolierter DNS erfolgen.

b) Tierische Vergleichsobjekte und DNS

Röntgendiagramme von orientierten und unorientierten Spermien und von extrahierten Nukleoproteinen sind infolge der Semikristallinität des Materials arm an Reflexen. Ihre mangelhafte Auflösung sowohl in Pulver- wie in Faserdiagrammen liefert wenig Daten für die erstrebte Strukturanalyse. In der Literatur findet man daher über einige Grundgrößen hinaus auch kaum detaillierte d-Wert-Angaben (wie z. B. für die kristalline A-Form), welche direkte Vergleiche ermöglichen würden. Die Qualität der erhaltenen Pulverdiagramme muss durch eine Gegenüberstellung mit publizierten Diagrammen beurteilt werden.

Dazu eignet sich das Pulverdiagramm der *Sepia*-Spermien (Abb. 8 a) mit der Densitometerkurve in Abbildung 2 und den dazugehörigen d-Werten in Kolonne 7 der Tabelle 1.

Ein Faserdiagramm orientierter *Sepia*-Spermien (Wilkins, 1956) ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Alle Interferenzen sind infolge der Semikristallinität der kristallinen Bereiche und infolge der unvollkommenen Orientierung der Kristallite im Spermienkopf sowie der Spermienköpfe im Faserpräparat selbst zu Bögen ausgezogen. Liesse man die Orientierung der Spermienköpfe fallen, so würden sich diese

Bögen weiter dehnen und zu den Ringen einer Pulveraufnahme schliessen. Bei Faserdiagrammen liegen die Interferenzen auf sogenannten Schichtlinien (I, II, III, —, X, —). Mit Hilfe der Schichtlinienwinkel, bezogen auf die Äquatorebene, lässt sich die Faserperiode b (Identitätsperiode des Kristallgitters in Richtung der Faserachse) bestimmen (s. z. B. Frey-Wyssling, 1959, S. 211):

$$b = \frac{k \cdot \lambda}{\sin \mu_k} \quad \begin{array}{l} k = \text{Nummer der Schichtlinie} \\ \mu_k = \text{Winkel der } k\text{-ten Schichtlinie} \end{array}$$

Diese wichtige Beziehung erlaubt mehrere unabhängige Messungen und liefert im Falle der DNS die Ganghöhe eines Umganges der Desoxyribosephosphathelices.

Der starke meridionale Reflex auf der 10. Schichtlinie verrät eine weitere Periodizität längs der Achse des DNS-Moleküls. Er kommt durch die stufenartige Abfolge der Basenpaarebenen senkrecht zur Achse zustande. Bei der B-Konfiguration beträgt die Faserperiode das Zehnfache dieses Basenpaarabstandes, so dass pro Schraubenumgang 10 Nukleotide vorliegen müssen. Ein weiterer, starker Reflex auf dem Äquator veranschaulicht eine Dimension quer zur Molekülachse. Er gibt ein rohes Mass für den Durchmesser der Moleküle oder genauer für ihren Achsenabstand. Die verbleibenden Reflexe auf den Schichtlinien I, II und III zeigen das für Faseraufnahmen typische 4-Punkt-Muster, bedingt durch Gitterebenen, die weder parallel noch senkrecht zur Schraubachse verlaufen. Die Konzentration der Reflexe auf die Arme einer Kreuzfigur ist charakteristisch für Helixstrukturen von der Art der Watson-Crick-Wendeltreppe, der Winkel der Kreuzarme zum Äquator spiegelt den Steigungswinkel der Desoxyribosephosphathelices.

Durch Desorientierung der parallelisierten kristallinen Bereiche wird das 4-Punkt-Faserdiagramm in ein Debye-Scherrer-Ringdiagramm übergeführt, wie Abbildung 3 zeigt. Man findet dann, dass in unserem Pulverdiagramm der *Sepia*-Spermien (Abb. 8a) die Reflexe nach Anzahl und Schwärzung mit jenen des Faserdiagramms aus der Literatur (Wilkins, 1956) übereinstimmen. Die Linien des Pulverdiagramms können durch ihren d -Wert genauer charakterisiert werden (Tab. 1, Kol. 7). Der innerste Ring mit $d = 21,43$ entspricht dem äquatorialen Reflex der Faseraufnahme. Der nächste Ring mit $18,02$ muss der Reflex der Schichtlinie I sein, weitere drei, $12,99$, $9,93$, $8,93$, sind der Schichtlinie II zuzuordnen, $8,26$ und $7,76$ gehören zur Schichtlinie III. Der äusserste starke Ring mit $d = 3,32$ schliesslich entspricht dem meridionalen Reflex der Schichtlinie X auf dem Faserdiagramm.

Die gemessenen d-Werte verteilen sich somit gemäss folgender Aufstellung:

Schichtlinie	X	— 3,32	_____
	III	_____	8,26 — 7,76 _____
	II	_____	12,99 — 9,93 — 8,93 _____
	I	_____	18,02 _____
Äquator	A	— 21,43	_____

Ein breiter diffuser Ring der Pulveraufnahme kann im Densitogramm (Abb. 2) durch ein Maximum bei 3,75 beschrieben werden. Auch die Faserdiagramme sind im Bereich der höheren Schichtlinien diffus. Dasselbe Maximum tritt auch bei den Diagrammen der weiteren Vergleichsobjekte auf. Ferner finden sich in unterschiedlicher Masse zwei Nebenmaxima, [4,53] und [4,09], die schon bei den *Chara*-Diagrammen erwähnt wurden.

Das Pulverdiagramm der *Salmo*-Spermien (Abb. 9a, Kol. 8) mit einem innersten Ring bei 20,34 (A – entsprechend der Zuordnung in der voranstehenden Aufstellung) und einem äussersten bei 3,32 (X) ist recht gut definiert. Die Ringe bei 18,02 (I) und 12,99 (II) sind viel schwächer als bei *Sepia*, die restlichen sind zwar nicht aufgelöst, decken sich aber wie der diffuse breite Ring gut mit denen von *Sepia*.

Das Pulverdiagramm der *Locusta*-Spermienfollikel ist sehr wenig ausgeprägt (Abb. 10a, Kol. 9). Einzig ein innerster Ring bei 21,53 (A) und ein äusserster bei 3,32 (X) sind eben noch erkennbar, der Rest kann mit dem *Sepia*-Diagramm nicht mehr eindeutig verglichen werden. Im breiten diffusen Band ist das Nebenmaximum [4,53] sehr ausgeprägt.

Das Pulverdiagramm von Na-DNS (Abb. 11a, Kol. 10) zeigt ebenfalls einen starken innersten Ring bei 21,53 (A), der den viel schwächeren bei 18,02 (I) beinahe überdeckt. Wie auch in entsprechenden Faseraufnahmen (Wilkins, 1956) sind im Vergleich zum *Sepia*-Diagramm auf der 2. und 3. Schichtlinie keine Reflexe aufgelöst. Sie bilden im Pulverdiagramm zwei diffuse Ringe. Der mittlere d-Wert des innern beträgt 11,47, im äussern deckt er sich mit 8,26 vom *Sepia*-Diagramm. Etwas anders sieht der breite Ring aus. Der Wert 5,40 ist abgesetzt, und neben dem schwach ausgeprägten Maximum bei 3,75 fallen die bisher gefundenen Nebenmaxima [4,53] und [4,09] weitgehend weg. Der äusserste Ring (X) ist wiederum sehr deutlich bei 3,32.

Alle Diagramme der Vergleichsobjekte haben somit mindestens zwei definierte Reflexe gemeinsam: einen innern Ring bei rund 21Å (im Faser-

diagramm äquatorialer Reflex) und einen äusseren bei 3,32 Å (im Faserdiagramm meridionaler Reflex der 10. Schichtlinie).

Zur Interpretation verbleiben die beiden mehrfach erwähnten Werte [4,53] und [4,09] der breiten diffusen Ringe. Da sie auch in den Diagrammen des Zellwandmaterials auftreten, dürfen sie nicht mit der DNS in Verbindung gebracht werden, um so weniger, als sie im Diagramm reiner DNS fehlen. Für diesen Diagrammanteil, der mehr den Charakter einer Untergrundstreuung trägt, könnten cytoplasmatische Proteine in Frage kommen. Auch amorphes Material verursacht diffuse Streuung. Derartige Fremdmaterial ist in den einzelnen Röntgenpräparaten in verschiedener Menge enthalten. Weder das Zellwandmaterial vegetativer *Chara*-Zellen noch die tierischen Spermien sind frei davon. Bedeutender ist der relative Anteil in den Präparaten spermatogener Fäden, vor allem nach TCA-Behandlung (Abb. 5a, 6a, Kol. 5). Am meisten Fremdmaterial findet sich wohl aufgrund der Anreicherungs-methode bei den *Locusta*-Follikeln (Abb. 10a, Kol. 9). Eine entsprechende Ausprägung der Intensität der genannten Ringe kann beobachtet werden.

c) Reife spermatogene Fäden

Reife spermatogene Fäden liefern ein Pulverdiagramm gemäss Abbildung 6b, 7b und 8–11b. Subtrahiert man die in Abschnitt a dargestellten Zellwandlinien, so verbleibt wie erwähnt ein Diagramm der reifen Spermatozoiden, das mit den in Abschnitt b beschriebenen Diagrammen verglichen werden kann. Kolonne 6 der Tabelle 1 enthält ausgesondert die betreffenden d-Werte. Abbildung 2 zeigt eine Densitometerkurve im Vergleich mit jener einer Pulveraufnahme der *Sepia*-Spermien. Die Abbildungen 8 bis 11 belegen die grundsätzliche Ähnlichkeit der Spermatozoidendiagramme mit denen der Vergleichsobjekte.

Völlig entsprechend sind die zwei starken Ringe bei 21,43 und 3,32. Die Auflösung der Überlagerung mit Zellwandlinien im Zwischenbereich ist zum Teil nur versuchsweise möglich. Die Densitometerkurve zeigt undeutliche Spitzen. Die Ähnlichkeit der Diagramme ist aber auffallend genug, um auf eine Kristallinität der Nukleoproteine in den reifen Spermatozoidenkernen zu weisen. Zusätzliche Gewissheit ergibt sich daraus, dass in den Diagrammen unreifer Fäden und reifer Fäden nach TCA-Extraktion der DNS die beiden wichtigen Linien 21,43 und 3,32 fehlen (Abb. 6, 7, Kol. 5).

IV. Diskussion

Die Eignung der beschriebenen Methode für die Untersuchung der *Chara*-Spermatozoiden hinsichtlich Fixation, Präparation und Aufnahmetechnik wird durch die Qualität des *Sepia*-Pulverdiagrammes belegt. Dieses stimmt mit dem um den Durchstosspunkt des Primärstrahls rotierten Faserdiagramm unfixierter, orientierter *Sepia*-Spermien (Wilkins, 1956) (Abb. 3) einwandfrei überein. Die Zuordnung der Pulverlinien zu Faserdiagrammreflexen bekannter Position ist damit möglich und kann auf die Pulverlinien in Diagrammen von Vergleichsobjekten ausgedehnt werden. Eine Übereinstimmung besteht für mindestens zwei entscheidende Reflexe, einen äquatorialen und einen meridionalen, die durch Ringe mit den d -Werten von rund 21 \AA und $3,32 \text{ \AA}$ vertreten sind.

Der erste, grosse d -Wert repräsentiert eine Dimension senkrecht zur parallelen Längsanordnung der DNS-Stränge. Es handelt sich dabei um den intermolekularen Helixachsenabstand, der gleichzeitig einen rohen Wert für die Dicke der gepackten Moleküle ergibt. Der zweite, kleine d -Wert ist eine intramolekulare Grösse. Er repräsentiert eine Periodizität in der Längsstruktur der Moleküle, die durch die regelmässige Folge von Nukleotiden beziehungsweise von Ebenen komplementärer Basenpaare zustande kommt. Da dieser äussere Ring einem meridionalen Reflex der 10. Schichtlinie entspricht, ist sein Winkelabstand gleich dem Schichtlinienwinkel der 10. Schichtlinie, und die eigentliche Identitätsperiode der Helices (Faserperiode) errechnet sich aus der Schichtlinienbeziehung zu $33,2 \text{ \AA}$. Dies ist der zehnfache Nukleotidabstand.

Das Pulverdiagramm reifer spermatogener Fäden von *Chara* erlaubt somit nach Elimination des störenden Zellwandanteils folgende Aussagen:

1. Die DNS im reifen Spermatozoidenkern der Characeen ist zu einem nicht näher bestimmbareren Teil kristallin.
2. Die Moleküle sind mindestens in einzelnen Bereichen mit einem Achsenabstand von $21,43 \text{ \AA}$ parallel gebündelt.
3. Der Nukleotidabstand beträgt $3,32 \text{ \AA}$.
4. Je Ganghöhe einer Helix folgen sich genau 10 Nukleotide.
5. Die DNS dürfte folglich in der B-Konfiguration vorliegen.

Einige weitere Fragen bleiben offen. Insbesondere fehlt eine eindeutige Beziehung zum Aufbau der Chromatiden in den Chromosomen. Aufgrund des DNS-Faserdiagrammes und des polarisationsoptischen Verhaltens der *Sepia*-Spermien scheinen dort kristalline Bereiche der Chromosomen-DNS parallel zur Achse des länglichen Spermienkopfes angeordnet, in den optisch isotropen isodiametrischen Köpfen der *Salmo*-Spermien, die ein

Ringdiagramm der DNS liefern, dagegen statistisch gestreut vorzuliegen. Auch sind Ausrichtungen der DNS-Fäden quer zur Spermienkopfachse bekanntgeworden (Schlote und Schin, 1962).

Mit der Röntgenmethode allein kann nur die Kristallinität festgestellt werden. Sie zeigt nicht, ob ein Spermienkern als Aggregat parallel geordneter kristalliner Bereiche oder als unvollkommener Einkristall mit einer über die ganze Länge kontinuierlichen Struktur ohne individualisierte Chromosomen aufgefasst werden muss. Um dies zu entscheiden, müssten Röntgendiffraktionsaufnahmen einzelner Spermienkerne durchgeführt werden können.

Die Entscheidung dieser Frage mit Hilfe der Doppelbrechungserscheinungen stösst wegen der Kleinheit der kristallinen Bereiche auf Schwierigkeiten. Inoué und Sato (1962) fanden zwar durch Verfeinerung des lichtmikroskopischen Auflösungsvermögens, dass der Spermienkern von *Ceutophilus* (*Raphidophoridae*, Höhlenschrecken) polarisationsoptisch nicht homogen erscheint. Obwohl dies ein Einzelbefund ist, darf nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei andern anisotropen Spermienköpfen mit einheitlicher Auslöschung (z. B. *Locusta*, *Acrididae*, Wanderschrecken) nur um lichtoptische Homogenität handelt. Gesamthaft würden dabei zwar Abschnitte der Kristallite gebündelter DNS-Moleküle in Richtung der Kernachse verlaufen, im übrigen aber würde ihnen eine kompliziertere tertiäre Schraubenstruktur zukommen.

In einem gewissen Widerspruch zu solchen Anschauungen stehen die elektronenmikroskopischen Beobachtungen. Im reifen, sehr dicht gepackten Spermienkern können allerdings keine Strukturen aufgelöst werden. Lediglich das Studium der vorangehenden Spermiogenesestadien gibt einigen Aufschluss über die Strukturbildung. Nachdem sich der Kern zu strecken beginnt, wird im Elektronenmikroskop eine fibrilläre Komponente sichtbar. Diese Mikrofibrillen ordnen sich in einigen Fällen in bemerkenswertem Grade parallel oder leicht geschraubt zur Spermienkopfachse, so bei Strudelwürmern (Silveira und Porter, 1964), Schnecken (z. B. Yasuzumi und Tanaka, 1958), Schildläusen (Moses und Coleman, 1964) und vor allem bei Heuschrecken (z. B. Yasuzumi und Ishida, 1957). Vergleichbare Strukturen an pflanzlichem Material fand Eggmann (1966) bei den Spermatozoiden der Characeen. Derartige Befunde machen es wahrscheinlich, dass sich die röntgenographischen und polarisationsoptischen Ergebnisse auf solche Fibrillen beziehen, erlauben aber keine Lokalisation der einzelnen DNS-Moleküle. Moses und Coleman (1964) stellen sogar die DNS-Natur der beobachteten Parallelstrukturen in Frage. Sie lassen sich übrigens auch nicht mit den Beobachtungen von Taylor (1964) an Heuschreckenspermien vereinbaren. Die parallelen Fibrillen können sich seitlich zu Bändern oder

Lamellen zusammenlagern. Diese erscheinen im Querschnitt als ein Mäanderwerk von Vorhangfalten, als Roulade (Bawa, 1964) oder als regelmässiges hexagonales Bienenwabenmuster (Yasuzumi und Ishida, 1957), dessen regelmässig verteilte Hohlräume im Lauf der weiteren Spermio-genese zusehends verschwinden. Eine solche Bienenwabenstruktur haben Riley und Oster (1951) aufgrund rein kristallographischer Überlegungen als bevorzugte Micellstruktur für wässrige DNS-Systeme eines bestimmten Feuchtigkeitsgehaltes abgeleitet. Ihre Resultate scheinen aber für die Deutung der elektronenmikroskopischen Bilder noch nicht herangezogen worden zu sein.

V. Zusammenfassung

Röntgendiffraktionsversuche an unorientierten spermatogenen Fäden von *Chara* (Armleuchteralge) kurz vor dem Entlassen der reifen Spermatozoiden liefern bei 92% relativer Feuchtigkeit Diagramme, welche nach Elimination der Interferenzen des Zellwandanteils (vorwiegend Zellulose I) grosse Ähnlichkeit mit Diagrammen unorientierter tierischer Spermienköpfe besitzen. Die zwei deutlichsten Linien mit d-Werten von 3,32 Å und 21,4 Å entsprechen einem meridionalen und einem äquatorialen Reflex in Faseraufnahmen orientierter DNS und stellen somit den Basenpaar- und den Helixachsenabstand der DNS-Moleküle dar. Diese dürften in der B-Konfiguration vorliegen, da je Schraubenumgang 10 Nukleotide vorhanden sind. Bei unausgereiften Spermatozoiden und nach Extraktion der DNS fehlen diese beiden hauptsächlichsten Reflexe.

Damit ist eine mindestens teilweise semikristalline Packung gestreckter Nukleoproteinmoleküle im Spermatozoidenkern der Characeen nachgewiesen und auch für andere polarisationsoptisch sich gleich verhaltende pflanzliche Spermatozoiden aus der Gruppe der Archegoniaten zu erwarten. Erstmals wird dadurch nachgewiesen, dass die für tierische Spermienkerne in vivo gefundene B-Konfiguration der DNS auch in pflanzlichen Zellkernen auftritt, so dass also tierische und pflanzliche begeisselte Gameten nicht nur morphologisch, sondern auch molekularbiologisch in ihrem Aufbau weitgehend miteinander übereinstimmen.

Literaturverzeichnis

- Amin E.S. 1955. The polysaccharides of *Chara*. J. Chem. Soc. 1955, 281.
- Bawa S.R. 1964. Electron microscope study of spermiogenesis in a fire-brat insect, *Thermobia domestica* Pack. I. Mature spermatozoon. J. Cell Biol. 23, 431.
- Becker W.A. 1937. Polarisationsmikroskopische Beobachtungen an den Antheridien von *Chara contraria* A.Br. Protoplasma 29, 355.
- Corillon R. 1957. Les Charophycées de France et d'Europe occidentale. Thèse, Toulouse, Rennes.
- Damska I. 1964. Charophyta - Ramienice. Flora Slodkowodna Polski, Tom 13, Warszawa.
- Debsky B. 1898. Weitere Beobachtungen an *Chara fragilis*. Jahrb. Wiss. Bot. 32, 635.
- Delay C. 1949. Observations cytologiques sur les Characées. I. L'évolution du noyau pendant la spermiogénèse de *Chara vulgaris* L. Rev. Cytol. Biol. Végét. 11, 315.
- Eggmann H. 1966. Über Kern- und Chromosomenstrukturen in Pflanzenzellen. Diss. ETH, Zürich, im Druck.
- Frey-Wyssling A. 1959. Die pflanzliche Zellwand. Springer, Berlin.
- Geitler L. 1948. Über die Teilungsrhythmen in den spermatogenen Fäden der Characeen. Österr. Bot. Z. 95, 147.
- Hough L., J.K.N. Jones und W.H. Wadman. 1952. An investigation of the polysaccharide components of certain fresh-water algae. J. Chem. Soc. 1952, 3393.
- Inoué S. und H. Sato. 1962. Arrangement of DNA in living sperm. A biophysical analysis. Science 136, 1122.
- Karling J.S. 1924. A preliminary account of the influence of light and temperature on growth and reproduction of *Chara fragilis*. Bull. Torrey Bot. Club 51, 469.
- Langridge R., H.R. Wilson, C.W. Hooper, M.H.F. Wilkins und L.D. Hamilton. 1960. The molecular configuration of deoxyribonucleic acid. J. Mol. Biol. 2, 19.
- Moses M.J. und J.R. Colemann. 1964. Structural pattern and the functional organization of chromosomes. In: The role of chromosomes in development. M. Locke ed., Acad. Press, New York, London.
- Nicolai E. und R.D. Preston. 1952. Cell-wall studies in the Chlorophyceae. I. A general survey of submicroscopic structure in filamentous species. Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B, 140, 244.
- Patri H.O.E. 1932. Über die Doppelbrechung der Spermien. Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat. 16, 723.
- Pfeiffer H.H. 1949. Polarisationsmikroskopische Untersuchungen an pflanzlichen Spermatozoiden. Planta 37, 96.
- Probine M.C. und R.D. Preston. 1961. Cell growth and the structure and mechanical properties of the wall in internodal cells of *Nitella opaca*. I. Wall structure and growth. J. Exp. Botany 12, 261.
- Riley D.P. und G. Oster. 1951. An x-ray diffraction investigation of aqueous systems of deoxyribonucleic acid (Na salt). Biochim. Biophys. Acta 7, 526.
- Sato S. 1954. Electron microscopical studies on reproductive cells of plants IV. Structure of spermatozoid in *Chara Braunii*. Cytologia (Tokyo) 19, 329.
- Schlote F.W. und K.S. Schin. 1962. Ordnungsprinzipien im Spermatischen Kern von *Gryllus domesticus* L. Hinweise auf polytäre Flaschenbürsten-Chromosomen. Z. Naturforsch. 17b, 559.

- Schmidt W.J. 1937. Die Doppelbrechung von Karyoplasma, Zytoplasma und Metaplasma. Protoplasma-Monogr., Bd. 11, Berlin.
- Signer R. und H.Schwander. 1949. Isolierung hochmolekularer Nucleinsäure aus Kalbsthymus. Helv. Chim. Acta **32**, 853.
- Silveira M. und K.R.Porter. 1964. The spermatozoids of flatworms and their microtubular systems. Protoplasma **59**, 240.
- Taylor J.H. 1964. The arrangement of chromosomes in the mature sperm of the grasshopper. J. Cell Biol. **21**, 286.
- Tschermak-Woess E. 1963. Strukturtypen der Ruhekerne von Pflanzen und Tieren. Protoplasmatologia V 1, Wien.
- Ullrich H. 1936. Einige Beobachtungen über Doppelbrechung am lebenden Protoplasten, an verschiedenen Zellorganellen sowie der Zellwand. Planta **26**, 311.
- Vazart B. 1963. Différenciation des cellules sexuelles et fécondation chez les cryptogames. Protoplasmatologia VII 3b, Wien.
- Watson J.D. und F.H.C.Crick. 1953. A structure for deoxyribose nucleic acids. Nature **171**, 737.
- Wilkins M.H.F. 1951. Ultraviolet dichroism and molecular structure in living cells. Pubbl. Staz. Zool. Napoli **23**, Suppl., 104.
- 1956. Physical studies of the molecular structure of deoxyribose nucleic acid and nucleoprotein. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **21**, 75.
 - und B.Battaglia. 1953. Note on the preparation of specimens of oriented sperm heads for x-ray diffraction and infrared absorption studies and on some pseudo-molecular behaviour of sperm. Biochim. Biophys. Acta **11**, 412.
 - und J.T.Randall. 1953. Crystallinity in sperm heads: Molecular structure of nucleoprotein in vivo. Biochim. Biophys. Acta **10**, 192.
- Yasuzumi G. und H.Ishida. 1957. Spermatogenesis in animals as revealed by electron microscopy. II. Submicroscopic structure of developing spermatid nuclei of grasshopper. J. Biophys. Biochem. Cytol. **3**, 663.
- und H.Tanaka. 1958. Idem. VI. Researches on the spermatozoon-dimorphism in a pond snail, *Cipangopaludina malleata*. J. Biophys. Biochem. Cytol. **4**, 621.