Nachdruck verboten.
Übersetzungsrecht vorbehalten.

(Aus dem Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten, Hamburg.
Direktor: Ober-Med.-Rat Prof. Dr. Nocht.)

Ergebnisse mit der Nuclealfärbung bei Protozoen.

Von
Eduard Reichenow.

(Hierzu Tafel 4).

Einleitung.

Von Feulgen und Rossenbeck wurde zuerst im Jahre 1924 eine Methode mitgeteilt, die dem mikrochemischen Nachweis der Thymonucleinsäure in den Zellkernen diente und die von ihnen als Nuclealreaktion bezeichnet wurde. An diese Mitteilung schlossen sich weitere Veröffentlichungen von Feulgen und seinen Mitarbeitern, und die Ergebnisse wurden schließlich von Feulgen (1926) in Abderhalden's Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden zusammengefaßt.

Als ich zuerst probeweise bei Protozoen einige Versuche mit dieser Methode anstellte, waren die Ergebnisse so günstig, daß ich mich veranlaßt sah, die Untersuchungen weiter auszudehnen und einigen bestimmten cytologischen Fragen mit Hilfe dieser Methode nachzugehen. Mit der Nuclealreaktion ist uns zum erstenmal ein Mittel in die Hand gegeben, um die alte Streitfrage zu entscheiden, inwieweit wir zu der Annahme berechtigt sind, daß die nach ihrem Verhalten als Chromatin bezeichnete Kernsubstanz mit den Nucleoproteiden identisch ist oder diese wenigstens enthält. Nicht nur unsere Kenntnisse von der Zusammensetzung des Kerns erfahren auf diese Weise eine Förderung, sondern auch die Frage

nach dem Vorkommen von Kernsubstanzen im Protoplasma (Chromidien), die vor allem in der Protozoencytologie eine große Rolle gespielt hat, läßt sich erfolgversprechend neu in Angriff nehmen. Ebenso die Frage, ob wir bestimmte Reservestoffe im Protoplasma, wie das Volutin, als Aufbaustoffe der Nucleoproteide des Kerns betrachten dürfen. Abgesehen von der Bedeutung der Nuclealreaktion als mikrochemischer Reaktion ergibt die durch sie hervorgerufene elektive Färbung gewisser Kernsubstanzen, die Nuclealfärbung, so klare Bilder, daß sich dieses Verfahren auch als Färbemethode neben unseren gebräuchlichsten Methoden einen gleichberechtigten Platz erwerben wird.

Die Feulgen'sche Methode beruht darauf, daß bei Abspaltung der Purinkörper aus dem Molekül der Thymonucleinsäure reduzierende Gruppen frei werden, die mit fuchsinschwefliger Säure, welche in der organischen Chemie zur Erkennung echter Aldehydgruppen dient, die Aldehydreaktion, nämlich lebhafte Violettfärbung geben. Andere Nucleinsäuren, wie die Hefenucleinsäure, geben diese Reaktion nicht, da ihr Kohlehydrat kein echtes Aldehyd, sondern ein „Zucker" (d-Ribose) ist. Bezüglich der Einzelheiten des Verfahrens muß ich auf die ausführliche Darstellung Feulgen's verweisen, die ohnehin jeder, der sich mit dieser Frage beschäftigen will, im Original lesen muß, um die verschiedenen in Betracht kommenden Fehlerquellen auszuschalten. Hier sei nur das wesentliche mitgeteilt, dessen Kenntnis eine Voraussetzung für die Beurteilung der Ergebnisse ist. Die Präparate werden einer Hydrolyse in Normalsalzsäure unterzogen und dann nach Auswaschen der Säure in fuchsinschweflige Säure übertragen, worauf sie nach erneutem gründlichen Auswaschen durch die Alkoholstufen und Xylol in Kanadabalsam überführt werden. Feulgen empfiehlt etwa 4 Minuten langes Verweilen der Präparate in der Salzsäure bei einer Temperatur von 60° und einen Aufenthalt von etwa 1 Stunde in der fuchsinschwefligen Säure bei Zimmertemperatur. Die Einwirkungsdauer sowohl der Salzsäure als der fuchsinschwefligen Säure läßt sich jedoch in ziemlich weiten Grenzen variieren, und die optimalen Zeiten sind für die einzelnen Objekte verschieden. So habe ich gefunden, daß die massigen Macronuclei der Infusorien im allgemeinen eine längere Hydrolyse vertragen; z. B. erhielt ich bei Vorticellenkernen nach 8 Minuten Salzsäureeinwirkung die intensivste Farbreaktion. Auch kann eine kürzere Einwirkungsdauer der Salzsäure durch einen längeren Aufenthalt in der fuchsinschwefligen Säure ausgeglichen werden, da auch die letztere eine

allmähliche Abspaltung der Purinkörper bewirkt, worauf bereits FEULGEN hingewiesen hat. Daher kommt es bei langem Aufenthalt der Präparate in der fuchsinschwefligen Säure auch ohne voraufgegangene Salzsäurehydrolyse zu einer Kernfärbung.

Einen positiven Ausfall der Nuclealreaktion zeigten in den Versuchen von FEULGEN und ROSSENBECK ausnahmslos die Kerne der verschiedensten Zellformen höherer Tiere: Leucocytenkerne und die Kerne der Erythrocyten von Huhn und Frosch, die Köpfe von Frosch- und Menschenspermatozoen und die Kerne der auf Schnitten untersuchten Organe von Ratte und Frosch. Gleichfalls ein positives Ergebnis wurde an den Kernen verschiedener höherer Pflanzen (Weizenembryonen, Zwiebeln, Pflanzenstengel verschiedener Art) erzielt. Dagegen gaben Hefezellen und Bakterien keine Nuclealreaktion. Auch einige Protozoen wurden von FEULGEN und ROSSENBECK untersucht. Bei Ciliaten aus Heuaufgüssen, deren Art sie nicht angeben, und bei *Nyctotherus cordiformis* aus dem Froschdarm erzielten sie Nuclealfärbung des Macronucleus, bei *Trypanosoma equiperdum* fanden sie dagegen keine Reaktion der Kerne. Sie schlossen daher aus ihren Ergebnissen, daß in den niedersten Organismen (Bakterien, Flagellaten) nur die Hefenucleinsäure, die zugleich chemisch die einfachere ist, vorkäme und daß in höher organisierten Zellen aus ihr die Thymonucleinsäure hervorgegangen sei.

Diese Hypothese hat sich bereits als unzutreffend herausgestellt. BRESSLAU und SCREMIN erbrachten bei *Trypanosoma lewisi*, *T. equinum*, *T. equiperdum* und *T. brucei* den Nachweis, daß der Kern dieser Flagellaten Nuclealreaktion zeigt. Es tritt eine ringförmige Färbung des Außenkerns auf, während der von dem Binnenkörper eingenommene Raum farblos bleibt. Auch bei den Blepharoplasten erzielten diese Autoren eine positive Reaktion, nur bei *T. equinum* nicht, bei dem dieses Gebilde ja auch bei gewöhnlicher Färbung (z. B. nach GIEMSA) nicht in Erscheinung tritt. BRESSLAU und SCREMIN sahen in diesem Befund eine Stütze der Auffassung von der Kernnatur der Blepharoplasten.

Ferner hat inzwischen VOIT bei einer Anzahl Bakterienarten eine positive Nuclealreaktion erzielt. Bei den Bakterien ist die Substanzmenge der Thymonucleinsäure so gering, daß eine Färbung morphologisch unterscheidbarer Gebilde nicht zustande kommt und daß das einzelne Individuum überhaupt keine Reaktion erkennen läßt. Nur wenn man die Bakterien so ausstreicht, daß sie in vielen Schichten übereinanderliegen, dann tritt eine diffuse Nuclealfärbung auf. VOIT hat ferner auch die Befunde von BRESSLAU und SCREMIN bei Trypanosomen bestätigt.

Über die Anwendung der Nuclealreaktion bei Protozoen haben noch einige weitere Autoren Angaben gemacht. WOODCOCK hat gleichfalls den positiven Ausfall bei Trypanosomen (nach Befunden von M. ROBERTSON an einem Trypanosom des Rochen) bestätigt und hat selbst eine positive Reaktion bei einer *Thelohania*-Art aus einer Mückenlarve, keine dagegen bei *Glugea lophii* und bei *Sarcocystis* erzielt. Bei den Entwicklungsstadien von *Trypanosoma melophagium* in der Schaflausfliege hat VAN THIEL Nuclealfärbung des Kerns und des Blepharoplasts festgestellt. Von den „Metachromatinkörnern" (Volutin) im Protoplasma dieses Flagellats gibt er an, daß sie keine Reaktion zeigen. Schließlich haben v. SCHUCKMANN und ZUELZER diese Methode auch bei Amöben angewandt. Bei einer *Hartmannella*-Art (v. SCHUCKMANN) zeigte der Außenkern eine diffuse zartviolette Färbung, während der Binnenkörper bis auf eine schmale Randzone farblos blieb; die bei der Kernteilung auftretenden Chromosomen gaben dagegen eine sehr intensive Reaktion. Bei *Amoeba biddulphiae* (ZUELZER) war auch im Ruhekern, aber auch hier wieder mit Ausschluß des Binnenkörpers, die Violettfärbung sehr lebhaft.

1. Nuclealreaktion der Protozoenkerne.

Als Ergebnis meiner bei zahlreichen Protozoenarten angestellten Prüfung des Verhaltens der Kerne gegenüber der Nuclealreaktion sei das eine im voraus bemerkt, daß das mikroskopische Bild insofern eine völlige Übereinstimmung mit dem durch irgendwelche Kernfarbstoffe erzielten ergab, als alle Bestandteile des Kerns, die mit letzteren als „Chromatinkörnchen" sichtbar gemacht werden, in gleicher Gestalt und ähnlicher Farbintensität auch bei der Nuclealreaktion als violett gefärbte Körperchen auftreten. Nur hinsichtlich der durch Kernfarbstoffe mehr oder weniger lebhaft färbbaren Binnenkörper ergab sich ein Unterschied; diese blieben bei den meisten Arten nach FEULGEN ungefärbt.

Wir wollen uns zuerst den Ciliaten zuwenden, deren große und chromatinreiche Macronuclei für den Vergleich der mit Kernfarbstoffen und der nach FEULGEN erzielten Bilder die günstigsten Objekte sind, die man bei den Protozoen findet. Mit Hämatoxylin nach DELAFIELD färben sich die Macronuclei der meisten Ciliaten sehr intensiv. Unter den von mir zum Vergleich benutzten Arten ist das z. B. der Fall bei *Vorticella* sp., *Lionotus fasciola, Chilodon cucullulus, Nyctotherus cordiformis, Balantidium entozoon* und *Urostyla weissei.* Bei allen diesen Formen zeigen die Kerne auch nach FEULGEN eine sehr lebhafte Violettfärbung (vgl. Taf. 4, Fig. 3—10).

Bei manchen Arten, wie *Colpoda steini* und *Colpoda cucullus*, färben sich dagegen die Macronuclei mit den Kernfarbstoffen nur blaß, und ganz entsprechend ist bei diesen auch die Nuclealreaktion nur schwach (Fig. 1 u. 2). Die Färbbarkeit der Micronuclei mit den Kernfarbstoffen ist gleichfalls je nach den Arten verschieden stark, und auch hier ist die Stärke der Nuclealreaktion dementsprechend.

Hinsichtlich der feineren Kernstrukturen will ich mich auf einige Beispiele beschränken. Bei *Urostyla weissei* setzt sich der Macronucleus aus zwei eiförmigen Teilstücken zusammen, die dadurch miteinander zusammenhängen, daß die Kernmembran eine enge schlauchförmige Verbindung zwischen ihnen bildet (Fig. 9). Obgleich in Präparaten nach FEULGEN die Kernmembran keine Färbung annimmt, erkennt man diesen Verbindungsfaden bei enger Blende infolge der verschiedenen Lichtbrechung. Bei der Mehrzahl der Tiere besitzt jedes Teilstück dem äußeren Pol genähert einen sog. Kernspalt, wie er sich bei den Hypotrichen so verbreitet findet. In die chromatische Substanz eingelagert sind zahlreiche Nucleolen. Von den Bestandteilen des Kerns zeigen Nuclealfärbung nur die Chromatinkörnchen, die in ziemlich gleichmäßiger Größe dichtgedrängt den Kernraum erfüllen. Kernspalt und Nucleolen erscheinen dagegen als farblose Zwischenräume zwischen den violetten Körnchen, ersterer als scheibenförmiger, das ganze Teilstück quer durchziehender Raum, letztere als kuglige Vakuolen. Jedem Teilstück liegt ein Micronucleus an, der ebenso wie mit Hämatoxylin auch bei der Nuclealreaktion eine gleichmäßige lebhafte Färbung annimmt.

Wenn sich *Urostyla* zur Teilung anschickt, so verschwindet in den Kernstücken zunächst der Spalt, und dann treten die beiden Stücke zu einem einheitlichen kugeligen Gebilde zusammen. Die färbbare Substanz ist jetzt flüssiger geworden, was darin zum Ausdruck kommt, daß die einzelnen Körnchen zusammenfließen und nun als unregelmäßige Schlieren den Kernraum durchsetzen (Fig. 10). Wenn sich der Macronucleus zur Durchschnürung in die Länge streckt, so bewirken die Strömungen in seinem Innern, daß diese fädigen Bildungen in zunehmendem Maße in die Richtung der Längsachse eingestellt werden. In Fig. 10 liegen neben dem Macronucleus die beiden Micronucleusspindeln, die ganz das gleiche typische Bild wie bei Hämatoxylinfärbung zeigen. Die Polkappen bleiben an ihnen völlig unsichtbar.

Wenden wir uns nun zur Betrachtung der beiden Arten *Colpoda steini* und *C. cucullus*, die, wie bekannt ist, bezüglich der

Morphologie des Macronucleus in auffallender Weise voneinander abweichen. Bei beiden Arten zeigt der Macronucleus den bläschenförmigen Typus mit einem zentralen Binnenkörper und peripher gelagerter chromatischer Substanz. Ihm sitzt der Micronucleus kappenförmig an. Der Großkern von *C. steini* besitzt einen annähernd kugeligen Binnenkörper und der Raum zwischen diesem und der Kernmembran ist von zahlreichen kleinen Chromatinkörnchen erfüllt. In dem Großkern von *C. cucullus* bildet das Chromatin dagegen eine homogen erscheinende Masse, die als eine unregelmäßig durchbrochene Kugelschale der Kernmembran anliegt. Dieses Bild kommt dadurch zustande, daß das Chromatin an verschiedenen Stellen der Kernwand größere Klumpen bildet, die tief in das Innere hineinragen und die durch schmale und flache Brücken miteinander verbunden sind. Der von dem Chromatin freibleibende Kernraum ist von dem Binnenkörper ausgefüllt, der an denjenigen Stellen, wo die Chromatinschale unterbrochen ist, bis an die Kernmembran herantritt und der infolgedessen eine ganz unregelmäßige Gestalt besitzt.

Mit Delafield's Hämatoxylin färbt sich der Binnenkörper bei beiden Arten kräftiger als das periphere Chromatin. Der schwachen Färbbarkeit des Chromatins mit Hämatoxylin entspricht auch sein Verhalten gegenüber der Nuclealreaktion (Fig. 1 u. 2). Die Violettfärbung der Körnchen bei *C. steini* und der homogenen Massen bei *C. cucullus* ist viel blasser als die Farbreaktion etwa bei *Urostyla* oder bei dem gleich zu besprechenden *Chilodon*. Der durch seine lebhafte Färbbarkeit mit Hämatoxylin ausgezeichnete Binnenkörper gibt dagegen bei beiden Arten gar keine positive Nuclealreaktion. Dadurch ist insbesondere bei *C. cucullus* die Verteilung der Chromatinmassen in den nach Feulgen behandelten Präparaten viel deutlicher zu erkennen.

Etwas ausführlicher wollen wir auf die eigenartigen Bauverhältnisse des Macronucleus von *Chilodon cucullulus* eingehen, da die Nuclealreaktion sich gerade hier als geeignet erwiesen hat, über die physiologische Bedeutung des morphologischen Bildes neue Aufschlüsse zu geben. Bei den *Chilodon*-Arten besitzt der Großkern eine Eigentümlichkeit, die schon frühen Untersuchern (v. Siebold, Stein) aufgefallen ist. Der große Binnenkörper, neben dem manchmal ein zweiter kleinerer vorhanden ist, besitzt im Zentrum ein dunkleres Körperchen, das von Bütschli (1889) als Zentralkörper bezeichnet worden ist. Dieser Zentralkörper ist nach Bütschli durch radiäre Fädchen mit der Oberfläche des Binnenkörpers ver-

bunden. In neuerer Zeit hat dieser Zentralkörper eine besondere Rolle gespielt, da er eines der klarsten Beispiele eines im Binnenkörper enthaltenen Centriols bei den Infusorien zu sein schien. Als Centriol wurde er zuerst von NÄGLER (1912) aufgefaßt. Nach NÄGLER's Beschreibung teilt sich dieses Centriol unter Bildung einer Centrodesmose und leitet damit die Kernteilung ein. Diese Angabe ist kürzlich von MAC DOUGALL (1925) bestätigt worden.

Auch im Zentrum des Micronucleus finden diese beiden Autoren ein Centriol. Auch hier wird eine Centrodesmose beschrieben; sie ist aber nur in Kernen zu sehen, die sonst noch gar keine Anzeichen der beginnenden Teilung erkennen lassen. Auf den Kernteilungsbildern von MAC DOUGALL mit Äquatorialplatte und Tochterplatten ist nichts von Centriolen zu entdecken. NÄGLER hat die Micronucleusteilung überhaupt nur mangelhaft beobachtet und nicht einmal die Chromosomen gesehen.

Die Form des Macronucleus von *Chilodon* ist ovoid. Der Raum zwischen der Membran und dem großen Binnenkörper ist von Chromatinkörnern erfüllt, die in der äquatorialen Region eine dünne Schicht bilden und hauptsächlich an den beiden Polen angehäuft sind. Sie sind von sehr wechselnder Größe, in manchen Kernen durchweg klein, in anderen größer und entsprechend weniger zahlreich; in wieder anderen kommen die verschiedensten Größen nebeneinander vor (vgl. Fig. 3, 5—8). Zwischen die Chromatinkörner gelagert findet man noch, meist der Kernmembran ansitzend, eine größere Anzahl kleiner Nucleolen. Sie wurden schon von BÜTSCHLI und neuerdings wieder von WETZEL (1925) beschrieben; auch BĚLAŘ (1926) bildet sie in seiner Fig. 1 ab.

Bei Anwendung der Nuclealreaktion färben sich die Chromatinkörner sehr lebhaft und geben vollkommen die gleichen Bilder wie in einem Hämatoxylinpräparat. Die zwischen sie gebetteten kleinen Nucleolen aber bleiben völlig ungefärbt und erscheinen daher nur als ausgesparte vakuolenartige Räume im Außenkern. Im Gegensatz zu diesen Nucleolen gibt der zentrale Binnenkörper eine zwar blasse, aber stets deutliche Nuclealfärbung. Er zeigt eine feinwabige oder feinvakuolisierte Struktur, was natürlich eine Gerinnungserscheinung sein kann. Radiäre Verbindungsfäden, die von BÜTSCHLI und nach ihm von anderen Autoren beschrieben worden sind, lassen sich bei Anwendung der Nuclealreaktion nicht nachweisen.

Das überraschendste Ergebnis der Nuclealreaktion ist nun, daß der in dem Binnenkörper gelegene Zentralkörper eine intensive Violettfärbung, ebenso wie die Chromatinkörner des

Außenkerns, annimmt. Dieser Zentralkörper kann von sehr verschiedener Größe sein (Fig. 5 u. 8). Ist er sehr groß, dann erscheint er gewöhnlich im Innern heller, genau so, wie das auch bei den ganz großen Chromatinkörnern des Außenkerns der Fall ist (vgl. Fig. 3 u. 6). Er ist keineswegs immer vorhanden. So fehlt er bemerkenswerterweise während der Kerndurchschnürung bei der Teilung (Fig. 4), also gerade zu der Zeit, wo er seine Rolle zu spielen hätte, wenn er seiner Natur nach ein Centrosom oder Centriol wäre. Aber auch bei nicht in Teilung begriffenen Kernen wird er manchmal vermißt (Fig. 3); am häufigsten ist dies naturgemäß bei jungen, eben aus der Teilung hervorgegangenen Individuen der Fall.

Dieses intensiv violett gefärbte Korn liegt oftmals nicht im Mittelpunkt des Binnenkörpers, sondern dem Rande mehr oder weniger genähert (Fig. 6 u. 7). Im Mittelpunkt kann dann jede besondere Differenzierung fehlen; meist ist in solchen Fällen aber ein bedeutend blasser gefärbtes Körperchen im Zentrum vorhanden.

Wenn das Korn den Rand des Binnenkörpers erreicht hat, dann tritt es aus diesem heraus. In den Präparaten kommt dieser Austritt dadurch zur Anschauung, daß man häufig unter den Chromatinkörnern des Außenkerns ein einzelnes der Oberfläche des Binnenkörpers dicht anliegen sieht (z. B. in Fig. 6 am oberen Rande), während alle anderen durch einen schmalen Hof von dem Binnenkörper getrennt sind. Wenn die Chromatinkörner des Außenkerns groß sind, dann entsprechen sie an Umfang dem gerade austretenden Korn und dieses fällt infolgedessen nicht besonders ins Auge. Ist aber das Chromatin fein verteilt, dann ist das dem Binnenkörper anliegende Korn durch seine Größe sehr auffällig. Ein solches Bild bietet der von Bělař (1926) dargestellte *Chilodon*-Kern. Bělař bemerkt zu seiner Abbildung, daß das dem Binnenkörper anliegende Korn typisch sei, äußert sich aber nicht weiter über dessen Natur.

Um die Bedeutung der mit der Nuclealreaktion erzielten Bilder richtig zu würdigen, müssen wir im Auge behalten, daß es sich bei der Färbung um eine spezifische chemische Reaktion handelt. Wir finden also, daß im Zentrum des Binnenkörpers eine nucleinsäurehaltige Substanz kondensiert wird und daß diese dann aus dem Binnenkörper auswandert. Wir haben hier ein klares Beispiel von Chromatinbildung im Innern eines Binnenkörpers vor uns. Der verschiedenen Intensität des funktionellen Kernwachstums entspricht die Verschiedenheit der Bilder. Zeitweise, wie z. B. im Verlauf des Teilungsvorganges, erfolgt gar keine Chromatinbildung, und der Binnenkörper ist dann frei von intensiver färb-

baren Körnchen. Ist die Chromatinbildung sehr lebhaft, dann kann man auch gleichzeitig zwei Körnchen in der peripheren Zone des Binnenkörpers neben einem dritten zentralen, noch in der Bildung begriffenen, finden.

MAC DOUGALL hat in Binnenkörpern von Kernen, die kurz vor der Teilung standen, auch noch eine größere Anzahl von Körnchen auftreten sehen. Allerdings ist es fraglich, ob alle diese durch HEIDENHAIN's Hämatoxylin geschwärzten Körnchen Chromatin in dem chemischen Sinne eines nucleinsäurehaltigen Stoffes sind. Doch ist es möglich, daß zu diesem Zeitpunkt die Chromatinbildung so gesteigert ist, daß vier oder fünf Körnchen gleichzeitig im Binnenkörper vorhanden sein können. Wissen wir doch aus den Untersuchungen von HERTWIG, POPOFF u. a., daß die Macronuclei der Infusorien eine sehr starke und schnelle Volumenzunahme kurz vor der Teilung erfahren.

Wenn die Chromatinkörner aus dem Binnenkörper in den Außenkern übergetreten sind, dann behalten sie dort entweder die gleiche Größe bei, oder sie zerfallen in kleinere Teilchen. So kommen die verschiedenen Kernbilder, teils mit grobscholligem, teils mit feinkörnigem Chromatin, zustande.

Diejenigen Autoren, die den „Zentralkörper" für ein Centriol gehalten haben (NÄGLER, MAC DOUGALL), sehen natürlich solche Kernzustände, wo der Binnenkörper zwei derartige Gebilde enthält, als Phasen beginnender Teilung an. Sie haben mit Heidenhainfärbung auch einen Verbindungsfaden zwischen den beiden Körpern, also eine Centrodesmose im Sinne ihrer Auffassung, gefunden. Dieser Faden braucht kein Kunstprodukt zu sein. Wenn er vorhanden ist, besteht er jedenfalls nicht aus Chromatin, da er bei der Nuclealfärbung nicht sichtbar ist. Man könnte sich aber vorstellen, daß infolge der Wanderung eines Chromatinkorns durch die zähflüssig zu denkende Masse des Binnenkörpers vom Mittelpunkt zur Peripherie ein feiner Kanal entsteht und einige Zeit erhalten bleibt, der die strukturelle Grundlage für den Farbniederschlag bildet. Für eine solche Deutung sprechen Bilder, wie die Fig. 8 von MAC DOUGALL, wo wir sehen, daß von einem in der Mitte des Binnenkörpers befindlichen schwarzen Körnchen drei Fäden zu drei mehr peripher liegenden Körnchen führen.

Der an dem Binnenkörper von *Chilodon* hinsichtlich der Chromatinbildung erhobene Befund läßt natürlich nicht ohne weiteres den Schluß zu, daß den Binnenkörpern anderer Protozoen die gleiche Rolle zufällt. Diese Einrichtung bei *Chilodon* steht zunächst ganz

isoliert da. Der Binnenkörper zeigt ja auch gegenüber denen anderer Protozoen die Besonderheit, daß er als Ganzes eine deutliche Nuclealreaktion gibt. Wir kommen auf diesen Punkt später noch einmal zurück.

Einige Worte noch über das Verhalten des Chromatins im Außenkern während der Teilung des Macronucleus. Mit beginnender Streckung und Durchschnürung des Kerns gehen Strukturveränderungen einher, die darauf hinweisen, daß auch hier, wie wir das schon bei *Urostyla* sahen, eine Verflüssigung der Chromatinsubstanz erfolgt. Die einzelnen Körnchen fließen zusammen, wobei in diesem Falle allerdings keine ausgesprochen fädigen Strukturen entstehen, sondern vielmehr eine spongiöse, mit farblosen Räumen durchsetzte Masse gebildet wird, die rings den Binnenkörper umhüllt. Fig. 4 veranschaulicht dieses Bild; der Kern des vorderen Tochtertieres ist dabei in Oberflächenansicht, der des hinteren im optischen Durchschnitt gezeichnet. Diesen Vorgang hat auch Mac Dougall bereits zutreffend beschrieben.

Infolge der Verflüssigung des Chromatins erscheint die Kernstruktur während der Teilung geradezu wie eine Umkehrung derjenigen des Ruhekerns: an Stelle von gefärbten Kugeln in einer farblosen Substanz sehen wir jetzt farblose Tröpfchen in einer gefärbten Masse liegen. Diese Verhältnisse haben Bělař, der den Teilungsvorgang bei *Chilodon uncinatus* an Heidenhain-Präparaten studiert hat, zu der eigenartigen Auffassung geführt, daß während der Teilung des Macronucleus eine „Inversion der Färbbarkeit" seiner Strukturen erfolge (Bělař 1926, auch schon erwähnt bei Hartmann 1921). Eine solche Meinung kann bei Untersuchung der Teilungsstadien in Präparaten mit Nuclealfärbung gar nicht aufkommen. Daß die spongiöse Masse tatsächlich dasselbe Material ist, welches im Ruhekern in Form von Körnchen vorhanden ist, beweist allein schon das eine von mir abgebildete Beispiel eines vorgerückten Kernteilungsstadiums (Fig. 4). Hier beginnt an den Kernenden das Chromatin sich schon wieder zu verfestigen, und infolgedessen treten in den Knotenpunkten des Maschenwerks wieder abgegrenzte Körnchen auf.

Der Micronucleus von *Chilodon* erscheint bei der Nuclealfärbung entweder ganz homogen oder mehr oder weniger fein vakuolisiert. Der „Zentralkörper", den Nägler und Mac Dougall in seinem Innern gefunden haben, tritt bei diesem Verfahren nicht hervor. Auch wenn er kein Kunstprodukt ist, so ist er also offenbar eine Bildung von ganz anderer Natur als der „Zentralkörper" des Macronucleus.

Es erschien mir von besonderem Interesse, auch die Kernverhältnisse der Opalinen mit der Nuclealreaktion zu prüfen. Die meisten Autoren sind der Ansicht, daß bei den Opaliniden nicht der für die Ciliophoren sonst durchweg typische Unterschied von Macronucleus und Micronucleus vorhanden ist, sondern daß diese Protozoen nur gleichartige Kerne besitzen. Dagegen vermutete TÖNNIGES, daß die bei Opaliniden in großer Zahl im Plasma vorhandenen „scheibenförmigen Körperchen" einen in kleine Teilstücke aufgelösten Macronucleus darstellen, da sie sich auf dem Wege der Durchschnürung vermehren. Den gleichen Standpunkt vertrat mit größerer Entschiedenheit KONSULOFF, der als weitere Stützen dieser Ansicht das Vorhandensein einer Membran bei diesen Gebilden, sowie ihre Degeneration bei der Gametenbildung (entsprechend dem Verhalten der Macronuclei anderer Infusorien bei der Konjugation) anführte, was natürlich beides auch nicht beweisend ist.

Während die Macronuclei der Infusorien durchweg einen reichlichen Chromatingehalt aufweisen, zeigen die „scheibenförmigen Körperchen" der Opaliniden keine ausgesprochene Affinität zu den Kernfarbstoffen. Sie färben sich mit DELAFIELD's Hämatoxylin oder mit Boraxkarmin nicht intensiver als das umgebende Protoplasma. Nur mit HEIDENHAIN's Hämatoxylin, das alle möglichen Zellbestandteile schwärzt, erhält man eine distinkte Färbung. Die Nuclealreaktion habe ich bei *Opalina ranarum* angewandt. In den zahlreichen bläschenförmigen Kernen dieser Art nehmen die winzigen im Kernraum verteilten Chromatinkörnchen eine deutliche Nuclealfärbung an. Die bei den gewöhnlichen Färbemethoden, z. B. mit DELAFIELD's Hämatoxylin sich färbenden größeren, der Kernmembran kalottenartig ansitzenden Massen bleiben dagegen unsichtbar. Sie verhalten sich also als binnenkörperartige Bildungen der Nuclealreaktion gegenüber ebenso wie die Binnenkörper der meisten anderen Protozoen. Die scheibenförmigen Körperchen ergeben gleichfalls keine positive Nuclealreaktion. Der Ausfall der chemischen Reaktion bestätigt also hier den rein färberischen Befund. In Hinblick auf die gerade den Macronuclei eigene besonders intensive Nuclealfärbung spricht dieses Ergebnis durchaus gegen die Kernnatur der fraglichen Plasmaeinschlüsse.

Wir wollen uns nun dem Verhalten der Kerne bei den Rhizopoden zuwenden. An erster Stelle gehe ich auf die Befunde bei einer auf Agarplatten gezüchteten *Chlamydophrys*-Art ein, da diese von den untersuchten Rhizopodenarten die deutlichsten Ergebnisse

mit der Nuclealreaktion geliefert hat. Mit DELAFIELD's Hämatoxylin erhält man eine lebhafte Färbung des Binnenkörpers, während die zahlreichen im Außenkern verteilten Chromatinkörnchen nur einen blassen Farbton annehmen. In Kernen, die kurz vor der Teilung stehen und bei denen sich die Substanz zu den Chromosomen zu kondensieren beginnt, wird die Färbung deutlicher und bei den ausgebildeten Chromosomen selbst ist sie sehr kräftig. Bei der Nuclealreaktion (Fig. 11) bleibt der Binnenkörper farblos, doch ist seine Umgrenzung infolge der Lichtbrechungsdifferenz deutlich erkennbar. Das Chromatin des Außenkerns gibt dagegen eine positive Reaktion, deren Intensität völlig der Färbbarkeit mit Hämatoxylin entspricht. In den Ruhekernen ist sie sehr schwach, kurz vor und nach der Teilung stärker, und die Färbung der Chromosomen ist sehr lebhaft (Fig. 12).

Von Amöbenarten habe ich die beiden Darmparasiten des Menschen, *Jodamoeba bütschlii* und *Entamoeba histolytica*, ferner zwei im Laboratorium auf Platten fortgezüchtete Arten, die von ARNDT (1924) benannte und genauer beschriebene *Hartmannella klitzkei* und eine Amöbe vom *verrucosa*-Typus untersucht. Das morphologische Kernbild ist bei allen Arten verschieden; gemeinsam ist allen diesen Amöbenkernen nur, daß im gefärbten Präparat nur wenig chromatische Substanz nachweisbar ist.

Am ungünstigsten liegen die Verhältnisse in dieser Hinsicht bei *Hartmannella klitzkei*. Der Kern dieser Art enthält einen großen stark färbbaren Binnenkörper, der von einer mäßig breiten Außenkernzone umgeben ist. Letztere enthält eine Schicht sehr feiner Granulationen, die mit DELAFIELD's Hämatoxylin eine schwache Färbung annehmen. Vielleicht handelt es sich dabei gar nicht um Chromatin, sondern um Gerinnungsprodukte, die bei der Konservierung auftreten. Jedenfalls ist bei Anwendung der Nuclealreaktion weder am Binnenkörper noch im Außenkern eine Violettfärbung zu erkennen. Nur wenn bei der Kernteilung die Chromosomen gebildet sind und in der Äquatorialplatte oder den Tochterplatten aneinandergereiht liegen, ist eine sehr schwache Reaktion dieser Bildungen bemerkbar. Die geringe Intensität der Nuclealfärbung beruht offenbar auf der Winzigkeit der Chromosomen bei dieser Art. Bei gewissen Färbungen, z. B. mit HEIDENHAIN's Hämatoxylin, werden sie wohl dadurch deutlicher, daß ihr Umfang durch Farbstoffniederschläge vergrößert wird. Die in der Einleitung erwähnte, von SCHUCKMANN untersuchte *Hartmannella*-Art ist augenscheinlich im Ruhekern chromatinreicher und besitzt größere Chromosomen.

Die Amöbe vom *verrucosa*-Typus besitzt einen Kern, dessen Membran zahlreiche tröpfchenförmige Gebilde von lebhafter Färbbarkeit ansitzen. Ferner enthält der Kernraum in feiner Verteilung äußerst winzige, nicht sehr zahlreiche Körnchen, die gleichfalls die Hämatoxylinfärbung annehmen. Bei der Nuclealreaktion bleiben die Tröpfchen an der Kernmembran völlig farblos, was dafür spricht, daß es sich um Bildungen von der Art der Binnenkörper handelt. Damit im Einklang steht auch ihr Verhalten bei der Teilung. Wie aus dem von BĚLAŘ (1926) beschriebenen Kernteilungsvorgang bei *Amoeba terricola* hervorgeht, die ganz den gleichen Kernbau besitzt, wird die Substanz dieser Tröpfchen nicht in die mitotische Teilungsfigur aufgenommen, sondern amitotisch auf die Tochterkerne verteilt. Der übrige Kern zeigt eine sehr blasse diffuse Violettfärbung; nur bei stärkster Immersionsvergrößerung läßt sich diese auflösen, indem man dann kleinste violett gefärbte Körnchen unterscheidet.

Von *Entamoeba histolytica* habe ich zur Vornahme der Nuclealreaktion Formen aus einer Kultur (nach dem Verfahren von DRBOHLAV) verwendet. Der Kern dieser Amöbe besitzt einen kleinen zentral gelegenen Binnenkörper und das Chromatin liegt hauptsächlich der Kernmembran an, während der übrige Kernraum gewöhnlich nur Spuren davon enthält. Bei der Nuclealreaktion bleibt auch hier wieder der Binnenkörper ungefärbt; das periphere Chromatin tritt dagegen als blasser aber deutlicher violetter Ring in Erscheinung.

Jodamoeba bütschlii wurde in Stuhlpräparaten untersucht, wo diese Amöbe gewöhnlich in bereits encystiertem Zustande auftritt. Der Kern enthält wie bei *Hartmannella* und anderen Amöben vom Limaxtypus einen großen, mit Hämatoxylin stark färbbaren Binnenkörper. Der Außenkern ist aber, besonders im Cystenstadium, bei dieser Art chromatinreicher. Die Chromatinkörner bilden im Cystenkern eine Anhäufung von sichelförmiger Gestalt neben dem etwas nach der Seite verschobenen Binnenkörper. Diese sichelförmige Bildung gibt eine deutliche Nuclealreaktion, während der Binnenkörper farblos bleibt.

Von Flagellaten habe ich nur wenige Beispiele untersucht. Meine Beobachtungen an *Trypanosoma lewisi* und *T. equinum* haben lediglich die zuerst von BRESSLAU und SCREMIN festgestellte Reaktion des Kerns, sowie des Blepharoplasts bei ersterer Art, bestätigt. Ich gehe daher nicht weiter darauf ein und will nur bemerken, daß ich nicht wie diese Autoren eine starke Färbung nach stundenlangem Aufenthalt (6—10 Stunden) in der fuchsinschwefligen Säure fand, sondern die deutlichsten Bilder nach $^1/_2$—$1^1/_2$ Stunden erhielt.

In dem Froschdarminhalt, der zur Untersuchung des Verhaltens von *Opalina ranarum* verwendet wurde, fand ich auch eine *Trichomonas*-Art, deren Kern sehr deutliche Nuclealreaktion zeigte. In Fig. 14 sehen wir die einzelnen Chromatinkörnchen lebhaft violett gefärbt.

Sehr bemerkenswert ist das Verhalten des Kerns von *Polytoma uvella* gegenüber der Nuclealreaktion. Im Ruhekern von *Polytoma* färbt sich mit Delafield's Hämatoxylin der im Mittelpunkt gelegene Binnenkörper sehr lebhaft, im Außenkern sind keine deutlichen Chromatinkörnchen nachzuweisen. Erst wenn sich der Kern zur Teilung anschickt, tritt in der Zone um den Binnenkörper reichlich Chromatin auf, das sich zu den verhältnismäßig großen Chromosomen verdichtet, während gleichzeitig der Binnenkörper aufgelöst wird. Bei Anwendung der Nuclealreaktion zeigt in Übereinstimmung mit diesen Bildern der Ruhekern überhaupt keine Färbung; sobald aber Chromosomen vorhanden sind, treten diese so lebhaft violett gefärbt hervor, daß sie bei günstiger Lage ohne Schwierigkeit zu zählen sind. In Fig. 15 sehen wir zwei Individuen, die aus einer Teilung hervorgegangen sind, noch miteinander vereinigt und in erneuter Kernteilung begriffen; die Äquatorialplatte der einen Teilungsfigur ist dabei von der Seite, die der anderen von einem Spindelpole aus sichtbar, und bei der letzteren sind deutlich 8 Chromosomen zu unterscheiden.

Es bleiben nun noch ein paar Beobachtungen bei Sporozoen mitzuteilen. Bei den mehr oder weniger stark herangewachsenen Individuen von *Gregarina polymorpha* im Mehlwurmdarm, die ich untersucht habe, zeigen die großen Bläschenkerne keine deutliche Nuclealreaktion. Sie erscheinen ja auch bei den gewöhnlichen Färbungen äußerst chromatinarm. Eine etwa vorhandene schwache Reaktion würde hier nicht erkennbar sein, da bei den Gregarinen das Protoplasma nicht vollkommen farblos bleibt, sondern eine diffuse Violettfärbung annimmt, auf deren Ursache wir in dem Abschnitt über das Volutin zu sprechen kommen. Die jüngsten Stadien der Gregarinen, die Sporozoiten, zeigen im Gegensatz zu den herangewachsenen Formen kompakte Kerne mit dicht gelagerten großen Chromatinkörnern. Diese Kerne geben auch eine lebhafte Nuclealreaktion. Ich habe in einem meiner Präparate von Froschdarminhalt zufällig Sporen einer Gregarinenart (offenbar mit der Nahrung aufgenommen) gefunden, in denen die Sporozoiten stark violett gefärbte Kerne aufwiesen.

Wie eingangs erwähnt wurde, konnte Woodcock bei einer *Sarcocystis*-Art keine positive Nuclealreaktion erhalten. Dagegen

habe ich gefunden, daß *Sarcocystis tenella* sowohl in Ausstrichpräparaten von Sporen wie auch in Schnittpräparaten durch ganze Cysten eine sehr deutliche Reaktion gibt. In den Schnitten zeigen nicht nur die Kerne der Sporen, sondern auch die der mehrschichtigen Cystenhülle eingelagerten Kerne Violettfärbung. Da aber die Cystenhüllen dieser Art höchstwahrscheinlich nicht von dem Parasiten, sondern von dem Wirtsgewebe herstammen, so ist die Farbreaktion der in ihnen enthaltenen Kerne nicht weiter bemerkenswert.

Hinsichtlich der Kernstruktur der Spore stehen die Angaben von ERDMANN (1910) denen aller anderen Untersucher gegenüber. Meiner Meinung nach kann in einem nach DELAFIELD gefärbten und gut differenzierten Präparat ein Zweifel gar nicht aufkommen, was in der Spore als Kern anzusprechen ist; denn er ist mit der gleichen Deutlichkeit als solcher erkennbar, wie etwa in einem Coccidienmerozoiten. Die sichelförmig gebogene Spore ist an dem einen Ende etwas zugespitzt, an dem anderen breit abgerundet. An dem spitzen Ende liegt eine große mit einer homogenen Masse angefüllte Vakuole. Der Kern, dessen Länge etwa ein Viertel der ganzen Sporenlänge beträgt, liegt in der breiteren Sporenhälfte und reicht etwa bis zur Körpermitte oder nicht ganz so weit. Er ist ein ovales Bläschen, in dessen Raum zahlreiche gut färbbare Chromatinkörnchen verteilt liegen. Außerdem enthält der Kern einen kugligen Binnenkörper; der sich durch größeren Umfang und schwächere Färbbarkeit (schiefergrau mit DELAFIELD's Hämatoxylin) deutlich von dem Chromatin abhebt. Dieser Binnenkörper liegt in der Regel, aber nicht immer, an dem der Sporenmitte zugekehrten Kernende. Der Kern hat also ganz denselben Bau, den wir bei Coccidienmerozoiten so häufig antreffen.

In derselben Weise, wie ich den Sporenkern hier beschrieben habe, ist er auch von den verschiedenen Autoren, zuletzt noch von BREINDL (Vortrag auf dem X. Internationalen Zoologenkongreß in Budapest), dargestellt worden. Nur ERDMANN sieht allein in dem Binnenkörper mit einem ihn umgebenden schmalen hellen Hof einen kleinen Caryosomkern und faßt den ganzen übrigen Kern als einen Fadenapparat (eine Polkapsel) auf. Wenn es noch eines Beweises bedarf, daß ERDMANN's Deutung irrtümlich ist, so liefert ihn uns die Nuclealreaktion. Bei deren Anwendung finden wir, daß der Binnenkörper farblos bleibt, daß aber alle die Körnchen, die bei Hämatoxylinfärbung als Kernchromatin erscheinen, eine lebhafte Violettfärbung annehmen (Fig. 17).

Man pflegt bei den Binnenkörpern der Protozoen je nach

der Intensität der Färbung, die sie mit den Kernfarbstoffen annehmen, von einem mehr oder weniger starken Chromatingehalt dieser Gebilde zu sprechen. Wenn wir uns heute, wo uns eine mikrochemische Reaktion zur Verfügung steht, auf den Standpunkt stellen, nur solche Kernsubstanz als Chromatin zu bezeichnen, in der Thymonucleinsäure enthalten ist, so lehren uns die hier angeführten Beispiele von Protozoenkernen, daß wir fast durchweg in den Binnenkörpern keine Spur von Chromatin nachweisen können. Das ist besonders auffällig bei Binnenkörpern, die sich, wie etwa bei *Hartmannella, Jodamoeba* oder *Chlamydophrys*, mit den basischen Farbstoffen sehr stark färben. Diese starke Färbbarkeit könnte auf dem Vorhandensein irgendeiner anderen sauren Substanz beruhen, während Thymonucleinsäure tatsächlich in den Binnenkörpern fehlte. Der negative Ausfall der Nuclealreaktion beweist aber keineswegs, daß dies der Fall ist. Ebensowohl ist es möglich, daß die leicht in Wasser lösliche Thyminsäure, die bei der Abspaltung der Purinkörper aus der Thymonukleinsäure entsteht, während des Verfahrens völlig herausgelöst wird, weil sie in den Binnenkörpern vielleicht noch nicht fest an Eiweißkörper gebunden ist. Eine solche Annahme wird gestützt durch die Erfahrungen über das Verhalten des Volutins gegenüber der Nuclealreaktion, die wir in dem folgenden Kapitel erörtern wollen.

Daß der die Färbbarkeit bedingende Bestandteil der Binnenkörper, welcher Art er immer sein mag, durch die Hydrolyse tatsächlich herausgelöst oder doch in seiner Farbreaktion verändert wird, zeigt sich, wenn wir die betreffenden Protozoen, nachdem wir sie der Salzsäureeinwirkung bei 60° ausgesetzt haben, mit einem Kernfarbstoff behandeln. Bei *Chlamydophrys* fand ich nach einer Hydrolysedauer von 3 Minuten den Binnenkörper nur noch schwach, nach einer Dauer von 6 Minuten gar nicht mehr mit Delafield's Hämatoxylin färbbar, und ebenso zeigte bei *Jodamoeba bütschlii* der Binnenkörper nach 5 Minuten Hydrolyse keine Färbbarkeit mehr.

2. Das Verhalten des Volutins gegenüber der Nuclealreaktion.

Seitdem ich im Jahre 1909 auf Grund meiner Untersuchungen an *Haematococcus pluvialis* die Auffassung vertreten habe, daß das Volutin ein Aufbauprodukt der Nucleoproteide, also ein Reservestoff für den Kern sei, habe ich immer wieder dieser im Protoplasma der Protozoen mit Ausnahme der Ciliophoren, ferner der Algen, Bakterien und Pilze auftretenden Substanz besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Was damals über das Volutin bereits bekannt war

und was seither darüber bekannt geworden ist, steht mit dieser Auffassung in gutem Einklang.

Das Volutin wurde zuerst von A. MEYER (1904) hinsichtlich seiner chemischen Natur untersucht und als eine Nucleinsäureverbindung angesprochen. Diese Auffassung konnte ich durch den Nachweis stützen, daß das Volutin Phosphor enthält; denn bei *Haematococcus* zeigte sich, daß das Auftreten der Substanz von dem Phosphorgehalt der Nährlösung abhängig ist. In einem phosphorfreien Medium wird das Volutin schnell verbraucht und nicht wieder neugebildet; es folgt Encystierung oder Absterben der Flagellaten. In einem phosphorreichen Medium kommt es dagegen zur Speicherung ungewöhnlich großer Volutinmassen, die später bei der Erschöpfung der Nährlösung wieder abgebaut werden. Diese Abhängigkeit der Volutinbildung vom Vorhandensein des Phosphors haben VAN HERWERDEN und DOFLEIN an anderen Objekten bestätigt.

Die Rolle des Volutins als Reservesubstanz für den Kern kommt darin zum Ausdruck, daß wir es regelmäßig besonders reichlich entstehen sehen, ehe sich der Organismus zur Kernvermehrung anschickt und daß es dann während der Kernteilung allmählich verbraucht wird. Auch das läßt sich bei *Haematococcus* beobachten. Am deutlichsten kommt dieses Verhalten aber zum Ausdruck bei Protozoen, bei denen zahlreiche Kernteilungen aufeinander folgen, z. B. bei den Coccidien. Sehr lehrreich sind die Vorgänge in den Microgametocyten der Coccidien. Wenn die sehr chromatinreichen Microgameten sich differenzieren und frei werden, dann lassen sie fast das ganze Protoplasma des Muttertieres als Restkörper zurück. Dieses noch eine zeitlang weiterlebende kernlose Protoplasma fährt fort mit der Volutinbildung, auf die es einmal eingestellt ist, und so kommt es, daß wir die Restkörper von besonders großen Massen dieses Reservestoffes angefüllt sehen (vgl. REICHENOW 1913, S. 333). Ein weiteres Beispiel, bei dem ich die Bedingungen des Auftretens von Volutin auf seine Rolle als Reservestoff des Kerns zurückführen konnte, sind die Trypanosomen (REICHENOW 1921, S. 278).

Von SCHUMACHER wird das Volutin neuerdings auf Grund seiner von ihm als spezifischer Nachweis für Nucleinsäure betrachteten Methylenblau-Phosphin-Methode nicht für eine Nucleinsäureverbindung, sondern für freie Nucleinsäure erklärt. In Hinsicht auf die Rolle, die wir dem Volutin im Zellhaushalt zuschreiben, macht das keinen Unterschied. Wenn es aber zutrifft, daß diese Substanz entweder freie Thymonucleinsäure oder eine Verbindung

derselben ist, dann müssen wir erwarten, daß bei ihr auch die FEULGEN'sche Nuclealreaktion positiv ausfällt. Das ist jedoch nicht ohne weiteres der Fall. Erwähnt wurde bereits die Angabe VAN THIELS, daß die Volutinkörnchen im Protoplasma von *Trypanosoma melophagium* keine Nuclealreaktion zeigen. Unter den von mir untersuchten, in dem vorigen Kapitel hinsichtlich der Reaktion ihrer Kerne besprochenen Protozoen sind einige reichlich mit Volutin versehene Arten, nämlich *Hartmannella klitzkei*, *Chlamydomonas*, *Polytoma uvella*, *Trypanosoma equinum* (in Mäuseblut) und *Gregarina polymorpha*. In DELAFIELD-Präparaten tritt diese Substanz in Form von Körnchen auf, die durch ihren rötlichen Farbenton scharf von den blauen Chromatinkörnchen des Kerns abstechen. Dagegen ist in den nach der Vorschrift von FEULGEN hergestellten Präparaten bei allen genannten Arten nichts von diesen Körnchen zu finden.

Wenn wir die Präparate nach der Salzsäurehydrolyse mit DELAFIELDS Hämatoxylin färben, dann zeigt sich, daß die Körnchen jetzt auch mit diesem Farbstoff nicht mehr darzustellen sind. Sie werden durch die Hydrolyse also vollständig aus der Zelle herausgelöst. Bringen wir dagegen die Präparate ohne vorherige Salzsäurebehandlung für etwa $^1/_2$ Stunde in fuchsinschweflige Säure, dann erhalten wir eine elektive Volutinfärbung, wie Fig. 13 für *Chlamydophrys*, Fig. 16 für *Polytoma* und Fig. 18 für *Gregarina polymorpha* zeigt. Bei der Gregarine handelt es sich um ein sehr junges Individuum, das noch einen Epimerit besitzt, also noch an der Darmwand des Wirtes festsitzt. In diesem Stadium ist das Volutin vorwiegend in dichten Massen im Protomerit gespeichert, während es bei den erwachsenen Formen ziemlich gleichmäßig im ganzen Körper verteilt liegt.

Da nun die Salzsäurehydrolyse die Aufgabe hat, die Thymonucleinsäure durch Abspaltung der Purinkörper in Thyminsäure überzuführen, welche erst die Farbreaktion gibt, so könnte man aus dem Verhalten des Volutins den Schluß ziehen, daß dieses keine Nucleinsäure, sondern noch ein Aufbauprodukt derselben, vielleicht also Thyminsäure sei. Diese Schlußfolgerung scheint mir nicht berechtigt. Wir erinnern uns, daß ja auch die fuchsinschweflige Säure selbst hydrolysierend wirkt und daß die Kerne nach langem Aufenthalt in derselben schließlich auch ohne vorherige Salzsäurebehandlung eine Färbung annehmen. Das erfolgt allerdings erst nach mehreren Stunden, und zu der Zeit, wenn das Volutin deutlich erscheint, zeigen die Kerne noch keine Reaktion. In Fig. 13 ist der Kern von *Chlamydophrys* völlig farblos und auch

bei dem Teilungsstadium von *Polytoma*, welches Fig. 16 darstellt, ist von den Chromosomen nichts zu entdecken. Aber auch die Volutinfärbung tritt in der fuchsinschwefligen Säure nicht sofort auf; nach 10 Minuten ist gewöhnlich noch nichts zu entdecken, nach 20 Minuten ist die Reaktion schwach, und nach 30—40 Minuten ist sie am kräftigsten. Wir sehen also bei dem Volutin die Nuclealreaktion nur schneller auftreten, als bei dem Kernchromatin.

Mir scheint das Ergebnis der Nuclealreaktion die Auffassung von SCHUMACHER zu bestätigen, daß das Volutin freie Nucleinsäure und zwar, wie wir genauer sagen können, Thymonucleinsäure ist. Weil die Thymonucleinsäure noch nicht an Eiweißkörper gebunden ist, beginnt sie sofort, wenn sie durch Spaltung in die Thyminsäure übergeführt worden ist, sich aufzulösen; auch die Abspaltung der Purinkörper erfolgt offenbar aus demselben Grunde viel schneller. Man erhält also eine Nuclealreaktion des Volutins nur, wenn man den Zeitpunkt abpaßt, wo die Abspaltung erfolgt, aber die Substanz noch nicht in Lösung gegangen ist. Da die Auflösung unmittelbar im Anschluß an die Spaltung beginnt, so finden wir selbst im günstigsten Augenblick die Substanzmenge geringer als etwa in einem Hämatoxylinpräparat.

Bei längerem Aufenthalt in der fuchsinschwefligen Säure wird dann die Reaktion immer schwächer. Zuerst sehen die Volutinkörner verwaschen aus, und später sind sie ganz verschwunden. Wie lange es dauert, bis das Volutin völlig herausgelöst ist, das hängt natürlich von seiner Menge und von der Größe des Zellkörpers ab. Bei *Trypanosoma equinum* habe ich schon nach 50 Minuten nur noch geringe Spuren von Volutin gefunden. Andererseits stellt das volutinreiche Bild in Fig. 18 eine Gregarine dar, die $1^1/_2$ Stunden in fuchsinschwefliger Säure belassen wurde. Der große Gregarinenkörper hält überhaupt das Volutin lange fest; die diffuse Färbung des ganzen Körpers, die wir in Fig. 18 beobachten, beruht ohne Zweifel darauf, daß ein Teil der Substanz bereits in Lösung gegangen ist und nun das ganze Protoplasma durchsetzt. Daher findet man bei diesen Protozoen selbst nach voraufgegangener Salzsäurebehandlung zwar keine geformten Körnchen mehr, aber doch noch eine diffuse Violettfärbung des ganzen Protoplasmas. Auch bei *Chlamydophrys*, wo das Volutin eine dichte Körnchenschicht am Rande des Chromidialapparates bildet, kann man oftmals nach Salzsäureeinwirkung noch eine diffuse Violettfärbung dieser Randpartie beobachten (Fig. 11).

3. Chromidien und Nuclealreaktion.

Die HERTWIG'sche Chromidienlehre, d. h. die Lehre von dem Austritt chromatischer Substanz aus dem Kern, welche unter Umständen den Kern funktionell ersetzen und in bestimmten Fällen wieder neue Kerne, sog. Sekundärkerne, aus sich hervorgehen lassen kann, hat in der Protozoenforschung eine große Rolle gespielt. Eine Hauptstütze dieser Lehre bilden die Thekamöben, bei denen wir regelmäßig wohlentwickelte, den Kern oder die Kerne umgebende „Chromidialapparate" antreffen. In einer ganzen Reihe von Arbeiten wurde hier die Entstehung von Sekundärkernen aus dem Chromidialnetz beschrieben. An Kritik hat es diesen Angaben allerdings nicht gefehlt. Erst kürzlich hat BĚLAŘ in seiner umfassenden Darstellung der Kernverhältnisse bei den Protozoen darauf hingewiesen, daß in keinem dieser Fälle der Vorgang wirklich einwandfrei festgestellt, daß vielmehr die Fehlerquelle einer Infektion durch Parasiten nirgends ausgeschaltet wurde.

Insbesondere erwähnt BĚLAŘ unveröffentlichte Untersuchungen von JOLLOS an *Arcella*, die auch bei HARTMANN (1925) aufgeführt sind, in welchen nachgewiesen wird, daß in den sog. Chromidialtieren die Kerne durch den stark entwickelten Chromidialapparat lediglich verdeckt sind. Man kann nämlich durch Verdauung mit Trypsin und Pepsin das Chromidialnetz zur Auflösung bringen, und dann treten die Kerne wieder deutlich hervor. Die leichte Löslichkeit durch Pepsinverdauung spricht überhaupt gegen die Chromatinnatur der Substanz, da das Chromatin gerade durch seine Unlöslichkeit bei Magensaftverdauung ausgezeichnet ist.

Die Nuclealreaktion, die ich bei *Chlamydophrys* und *Arcella* angewendet habe, bestätigt dieses Ergebnis. In beiden Fällen bleibt der Chromidialapparat völlig farblos. Wenn wir bei *Chlamydophrys* manchmal in seiner Randzone eine diffuse Violettfärbung bemerken (Fig. 11), so haben wir diese bereits auf das in Lösung gegangene Volutin zurückführen können. Setzen wir die Präparate zuerst der Salzsäurehydrolyse aus und färben sie dann mit DELAFIELD's Hämatoxylin, so zeigt sich, daß die färbbare Substanz des Chromidialapparats durch die Salzsäure herausgelöst wird. Nach 3 Minuten Salzsäureeinwirkung färbt sich das Chromidialnetz mit Hämatoxylin bereits viel blasser, und die färbbare Substanz ist in verwaschener Form teilweise auch in dem vorderen Körperabschnitt, der nicht von dem Chromidialapparat eingenommen wird, enthalten. Nach 6 Minuten Hydrolyse nimmt der Apparat die Färbung nicht mehr stärker an als das übrige Protoplasma.

Man könnte nun noch an das Vorkommen freier Nucleinsäure, wie bei dem Volutin, in dem Chromidialapparat denken. Wenn wir aber ohne vorherige Salzsäurebehandlung die fuchsinschweflige Säure einwirken lassen, dann erhalten wir ebensowenig eine Farbreaktion. Das zeigt uns Fig. 13, in der das Volutin lebhaft gefärbt, das Chromidialnetz aber unsichtbar geblieben ist. Der sog. Chromidialapparat der Thekamöben enthält also keine Thymonucleinsäure. Offenbar ist er ein Stoffwechselprodukt, wofür auch der von ZUELZER (1904) bei *Difflugia* erbrachte Nachweis spricht, daß ihm eine glykogenartige Substanz eingelagert ist. Vielleicht handelt es sich um ein Material, das bei der Schalenbildung Verwendung findet.

Ich habe ferner mit der Nuclealreaktion die in der Cyste von *Entamoeba histolytica* auftretenden als Chromidialkörper bezeichneten Gebilde geprüft, von denen gleichfalls angegeben worden ist, daß ihre Substanz wenigstens zum Teil aus dem Kerne stammt. Es handelt sich um einen oder mehrere im Protoplasma gelegene große stabförmige Körper, die sich nicht nur mit HEIDENHAIN's Hämatoxylin schwärzen, sondern mit den verschiedenen basischen Farbstoffen eine sehr lebhafte Färbung annehmen. Auch diese Einschlüsse geben weder mit noch ohne Salzsäurehydrolyse eine positive Reaktion, sie enthalten also weder Chromatin, noch freie Thymonucleinsäure. Ganz ebenso verhalten sich übrigens die in der Cyste von *Jodamoeba bütschlii* in größerer Anzahl im Protoplasma auftretenden kleinen kugeligen Gebilde, entgegen meiner Erwartung, daß sie sich als Volutin erweisen würden.

Wenn uns die Nuclealreaktion hinsichtlich ganz bestimmter im Protoplasma auftretender und als Chromatin angesprochener Bildungen gelehrt hat, daß diese tatsächlich nichts mit Chromatin zu tun haben, so führt das natürlich nicht zu der Schlußfolgerung, daß es extranucleäres Chromatin überhaupt nicht gibt. Im Gegenteil haben wir ja schon ein Beispiel von solchem in den Blepharoplasten der Trypanosomen kennen gelernt, sofern wir uns nicht der Anschauung derjenigen Autoren anschließen, die den Blepharoplast als einen zweiten Kern betrachten. Es bleiben vor allem noch die degenerativen Vorgänge bei Protozoen in dieser Richtung zu untersuchen. Ich möchte in diesem Zusammenhang noch auf einen Fall bei pathologisch veränderten Metazoenzellen hinweisen, nämlich auf die bei der Lymphocystiskrankheit der Fische auftretenden Bilder. Die riesenhaft vergrößerten Zellen enthalten rings um den Kern herum eine ausgedehnte Differenzierung von spongiösem Bau, von der WEISSEN-

BERG annimmt, daß sie ein Reaktionsprodukt der Zelle darstelle, in dem die unsichtbaren Parasiten eingeschlossen liegen. Diese als „Netzkörper" bezeichnete Bildung, die sich mit Kernfarbstoffen lebhaft färbt, gibt nach unveröffentlichten Beobachtungen von Dr. A. NEWSAD auch eine kräftige Nuclealreaktion.

Literaturverzeichnis.

ARNDT, A.: Rhizopodienstudien. I. Arch. f. Protistenk. Bd. 49 p. 1 1924.

BĚLAŘ, K.: Der Formwechsel der Protistenkerne. Ergebn. u. Fortschr. d. Zool. Bd. 6 1926.

BRESSLAU, E. u. SCREMIN, L.: Die Kerne der Trypanosomen und ihr Verhalten zur Nuclealreaktion. Arch. f. Protistenk. Bd. 48 p. 509 1924.

BÜTSCHLI, O.: Protozoa, Abt. III. 1887—1889.

DOFLEIN, F.: Studien zur Naturgeschichte der Protozoen. X. Über Polytoma agilis Aragao. Zool. Jahrb., Abt. Anat. Bd. 41 p. 1 1918.

ERDMANN, RH.: Kern und metachromatische Körper bei Sarkosporidien. Arch. f. Protistenk. Bd. 20 p. 239 1910.

FEULGEN, R.: Die Nuclealfärbung. ABDERHALDEN's Handb. d. biol. Arbeitsmeth., Abt. V Bd. 2 p. 1055 1926.

HARTMANN, M.: Praktikum der Protozoologie. 4. Aufl. G. Fischer, Jena 1921.

—: Allgemeine Biologie. I. G. Fischer, Jena 1925.

VAN HERWERDEN: Über das Volutin und seine chemische Zusammensetzung. Fol. microbiol. Bd. 5 p. 19 1917.

KONSULOFF, S.: Untersuchungen über Opalina. Arch. f. Protistenk. Bd. 44 p. 285 1922.

MAC DOUGALL, M. St.: Cytological observations on gymnostomatous ciliates with a description of the maturation phenomena in diploid and tetraploid forms of Chilodon uncinatus. Quart. J. micr. Sci. Bd. 69 p. 361 1925.

MEYER, A.: Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie und Chemie des Volutins. Bot. Zeitung Bd. 62 p. 113 1904.

NÄGLER, K.: Caryosom und Centriol beim Teilungsvorgang von Chilodon uncinatus. Arch. f. Protistenk. Bd. 24 p. 142 1912.

REICHENOW, E.: Untersuchungen an Haematococcus pluvialis. Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt Bd. 33 p. 1 1909.

—: Karyolysus lacertae, ein wirtwechselndes Coccidium der Eidechse Lacerta muralis und der Milbe Liponyssus saurarum. Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt Bd. 45 p. 317 1913.

—: Untersuchungen über das Verhalten von Trypanosoma gambiense im menschlichen Körper. Zeitschr. f. Hyg. Bd. 94 p. 266 1921.

SCHUCKMANN, W. v.: Über eine aus dem Darm eines Meerschweinchens gezüchtete Amöbe. Arb. a. d. Reichsgesundheitsamt Bd. 57 p. 801 1926.

SCHUMACHER, J.: Über den Nachweis des Bakterienkerns und seine chemische Zusammensetzung. Zentralbl. f. Bakt. Abt. I Orig. Bd. 97 p. 81 1926.

VAN THIEL, P. H.: Was ist Rickettsia melophagi? Arch. f. Protistenk. Bd. 52 p. 394 1925.

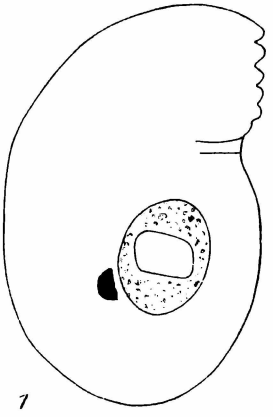
Tönniges, C.: Die feineren Bauverhältnisse von Opalina ranarum. Sitz.-Ber. Ges. z. Beförd. d. ges. Naturw. Marburg, Jahrg. 1898.
—: Nachtrag zu den Untersuchungen über die feineren Bauverhältnisse von Opalina ranarum. Ebenda, Jahrg. 1899.
Weissenberg, R.: Lymphocystiskrankheit der Fische. Prowazek-Nöller: Handb. d. path. Protoz. Bd. 3 p. 1344.
Wetzel, A.: Vergleichend cytologische Untersuchungen an Ciliaten. Arch. f. Protistenk. Bd. 51 p. 209 1925.
Woodcock, H. M.: A micro-chemical test for chromatin. J. Roy. Army med. Corps Bd. 46 p. 354 1926.
Zuelzer, M.: Beiträge zur Kenntnis von Difflugia urceolata Carter. Arch. f. Protistenk. Bd. 4 p. 240 1904.
—: Über Amoeba biddulphiae n. sp., eine in der marinen Diatomee Biddulphia sinensis Grèv. parasitierende Amöbe. Arch. f. Protistenk. Bd. 57 p. 247 1927.
(Jirovec, O.: Protozoenstudien. II. Die Nuclealreaction bei einigen Protozoen. Arch. f. Protozoenk. Bd. 59 p. 550 1927. — Während des Druckes erschienen.)

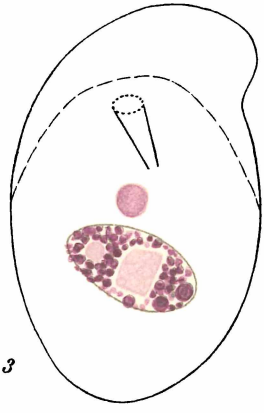
Tafelerklärung.

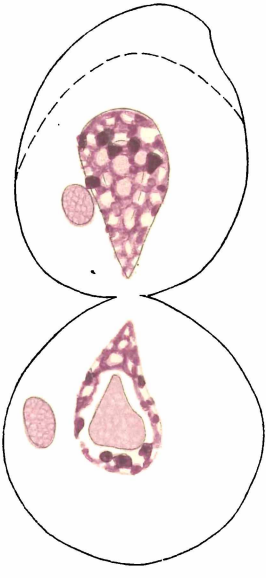
Tafel 4.

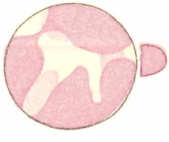
Alle Abbildungen zeigen die Feulgen'sche Nuclealfärbung, Fig. 13, 16 und 18 ohne Salzsäurehydrolyse.

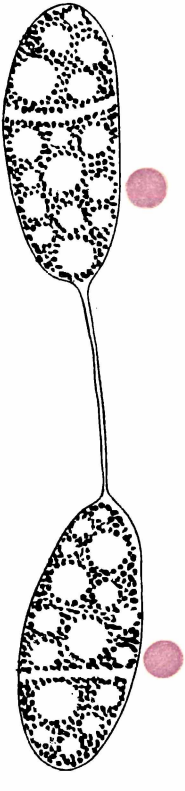
Fig. 1. *Colpoda steini.* Vergr. 1800 ×.
Fig. 2. Kern von *Colpoda cucullus.* Vergr. 1800 ×.
Fig. 3. *Chilodon cucullulus.* Vergr. 1800 ×.
Fig. 4. Teilung von *Chilodon cucullulus.* Vergr. 1800 ×.
Fig. 5—8. Kerne von *Chilodon cucullulus*, in Fig. 5 u. 8 auch Micronucleus. Vergr. 1800 ×.
Fig. 9. Macronucleus und Micronuclei von *Urostyla weissei.* Vergr. 1800 ×.
Fig. 10. Kernteilung von *Urostyla weissei.* Vergr. 1800 ×.
Fig. 11. *Chlamydophrys* sp. Vergr. 1800 ×.
Fig. 12. Kernteilung von *Chlamydophrys* sp. Vergr. 1800 ×.
Fig. 13. Volutinreaktion in *Chlamydophrys* sp. Vergr. 1800 ×.
Fig. 14. *Trichomonas* sp. aus dem Froschdarm. Vergr. 2600 ×.
Fig. 15. *Polytoma uvella*, Kernteilung. Vergr. 2600 ×.
Fig. 16. *Polytoma uvella*, Volutinreaktion. Vergr. 2600 ×.
Fig. 17. Spore von *Sarcocystis tenella.* Vergr. 2600 ×.
Fig. 18. *Gregarina polymorpha*, Volutinreaktion. Vergr. 900 ×.


1


3


4


2

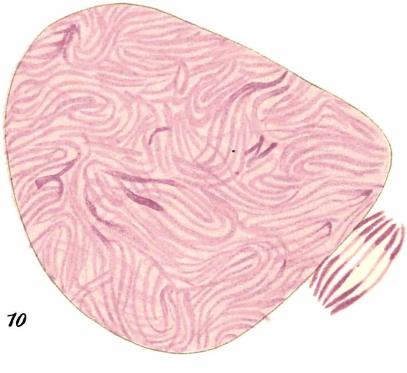

9

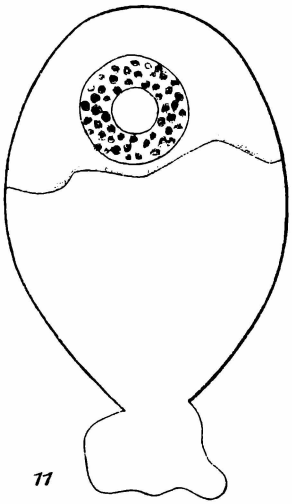
5

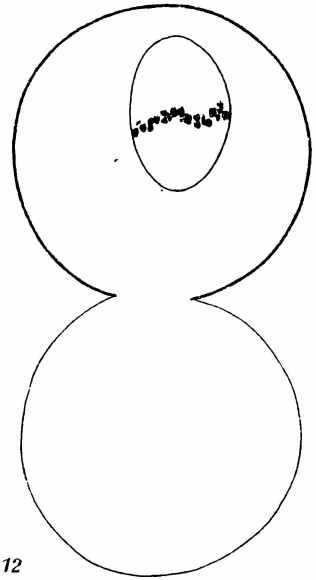
6

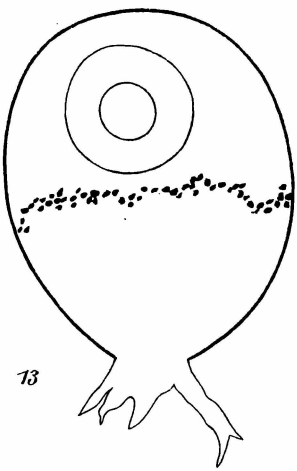
7

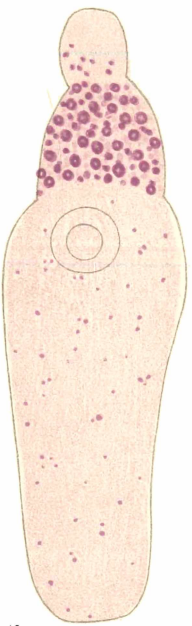
8

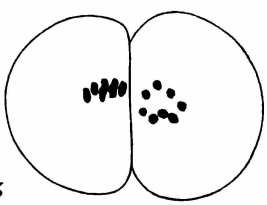

10

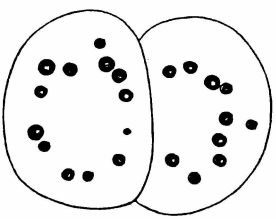












ıer in Jena

Lith. Anst. v. E. A. Funke Leipzig.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Archiv für Protistenkunde

Jahr/Year: 1928

Band/Volume: 61_1928

Autor(en)/Author(s): Reichenow Eduard

Artikel/Article: Ergebnisse mit der Nuclealfärbung bei Protozoen 144-166