Nachdruck verboten.
Übersetzungsrecht vorbehalten.

La coniugazione e il differenziamento sessuale negli Infusorî.

Paolo Enriques (Bologna).

(Colle tavole V—VIII e 2 figure nel testo.)

Indice.

pag.

I. Introduzione 196
II. Metodi 197
III. Condizioni determinanti la coniugazione nel *Colpoda Steinî* 203
1. Influenza dello spessore della cultura 203
2. Influenza dei liquidi: scambî tra *Colpoda* e liquidi di varie culture 209
3. Influenza delle generazioni agame sulla produzione di coniugazioni 212
IV. Condizioni determinanti la coniugazione nel *Chilodon uncinatus* . . . 214
V. *Opercularia coarctata.* Condizioni della coniugazione 216
1. Allevamento di questa specie 216
2. Coniugazioni tra parenti, dopo poche generazioni agame dalla coniugazione precedente 217
3. La divisione sessuale 217
4. Partenogenesi dei macrogameti 220
5. Alcuni raffronti 222
VI. *Opercularia coarctata.* I fenomeni minuti della coniugazione 223
1. Divisione comune e divisione sessuale 223
2. Individui neutri e macrogameti 225
3. Prima divisione, nel microgamete 228
4. Prima divisione di maturazione 228
5. Seconda divisione di maturazione 237
6. Ultima divisione, prima della fusione nucleare 239
7. Avvicinamento e fusione dei nuclei 241
8. Ulteriori divisioni e modificazioni, fino al ritorno alle condizioni normali 243
9. Il numero e la riduzione dei cromosomi 246

pag.
10. Modificazioni dei vecchi macronnclei 247
11. Le coniugazioni osservate snl vivo 249
12. L'accordo degli stadî nei gameti. Precedenza del macrogamete 251
13. Variazioni della cromaticità nelle divisioni di matnrazione . . 252
14. Omologie delle divisioni conducenti alla formazione dei pronnclei 253
VII. *Opercularia coarctata.* Orientazione dei nnclei nella coningazione . . 257
1. Orientazione in generale 257
2. Misnre degli angoli trai fnsi omosessuali 259
3. Ipotesi per spiegare le orientazioni dei fusi mitotici 264
VIII. Il differenziamento sessnale nella *Vorticella microstoma* 267
IX. Il differenziamento sessnale nel *Carchesium polypinum* 270
X. La degenerazione senile 272
XI. A che serve la fecondazione 281
XII. Conclnsioni più importanti 287
XIII. Bibliografia 288
XIV. Spiegazione delle Tavole 293

I. Introduzione.

Lo studio delle condizioni d'ambiente capaci di indnrre a coniugarsi gli Infnsorî, anche se discendenti prossimi di exconiuganti, anche se legati da vincoli stretti di parentela, è stato il punto di partenza di queste ricerche, colle quali volevo in certo modo portare una controprova a quanto affermai in precedenti pnbblicazioni: dopo aver dimostrato sperimentalmente che la cosi detta degenerazione senile degli Infusorî, si prodnce per condizioni esterne, batteriche — mentre non si produce anche per centinaia di generazioni agame, purchè le culture siano mantenute in condizioni quasi invariabili e buone, con un metodo scrupoloso — dopo ciò, la controprova che desideravo di fare — e che è riuscita — mi pare debba portare l'ultimo colpo alla teoria della degenerazione senile e della maturità sessuale prodotta da una serie lunga di generazioni agame.

Ma nel corso di queste ricerche, altri problemi si aprirono, ed ecco quali sono i principali:

1. Apparve l'influenza di una condizione non mai snpposta prima, lo spessore verticale dello strato liquido della cultura, nella determinazione della coniugazione, per il *Colpoda Steini.*

2. L'esistenza di individui femminilmente differenziati, nei Vorticellidi che anatomicamente mostrano soltanto differenziati i microgameti; l'esistenza — di una „divisione sessuale", colla

quale si produce da un individuo neutro, uno differenziato in senso maschile, l'altro in senso femminile.

3. A questo punto, la ricerca sperimentale si intrecciò talmente coll'osservazione minuta, citologica, dei fenomeni di coniugazione nell' *Opercularia coarctata*, che fui condotto a studiare in questa specie tali processi sistematicamente, nei più piccoli dettagli; ed a trattare di tutte quelle questioni annesse e connesse in cui sempre ci si imbatte, studiando i processi di cariocinesi e di coniugazione.

I resultati di indole più generale si trovano in ultimo, come conclusione; i resultati di indole più particolare, alla fine di ciascun argomento.

Queste ricerche son state eseguite in gran parte nell' Istituto zoologico dell' Università di Göttingen, ed al Prof. G. R. Ehlers, direttore dell' Istituto, ed al Prof. Rhumbler, sento il dovere di esprimere qui tutta la mia gratitudine per la cordiale ospitalità ricevuta, e gli intelligenti consigli.

II. Metodi.

Negli studî biologici sui Protozoi, come è generalmente riconosciuto, la tecnica è quasi tutto; devo dunque spiegare in qual modo preparavo le mie culture, per quanto ciò differisce dai sistemi da me precedentemente adottati (Enriques 1905).

Grandi culture. — In generale si descrive una cultura di Protozoi come qualche cosa che ha un' esistenza solo temporanea, e deve essere spesso rifatta. A me premeva invece di avere, di ciascuna specie, culture che non deperissero, fossero sempre ricche, ed in condizioni poco mutevoli. Ciò non presenta difficoltà pratiche, una volta trovato il metodo. Il deperimento graduale delle culture deriva evidentemente dalle grandi modificazioni che il liquido subisce, per effetto delle specie coltivate, e degli altri organismi che gli servono di alimento, o che inevitabilmente vi si trovano insieme.

Per evitare queste modificazioni, si deve cambiare continuamente il liquido, senza aspettare che gli Infusorî diano segni di depressione; non si deve prendere gli Infusorî depressi e porli in buono ambiente a formare nuove culture, ma avere sempre una cultura, in cui gli Infusorî restino, ed il liquido sia tolto ogni giorno. Così gli Infusorî, sempre molti ed abbondantemente nutriti, ed in buone condizioni di salute, si trovano in uno stato d' equilibrio poco mutevole.

La tecnica di queste culture continuative, richiede naturalmente certi accorgimenti, che variano secondo la specie coltivata. Preparo di solito gli infusi nutritizî, facendo bollire del fieno nell'acqua potabile, e lasciando stare poi il liquido a sè per qualche giorno, in un recipiente originariamente sterilizzato, ma che non vien pulito ogni volta, ed in cui l'estratto è versato dopo raffreddamento; sì che i Batterî e piccoli Flagellati che in esso già si trovavano, servono a rendere presto la cultura ricca di questa microfauna e microflora. Ed ora, consideriamo di avere già una cultura ricca di Opercolarie, ad esempio. Esse stanno in nnmero immenso alla superficie libera del liquido, poche al fondo. Con un sifone, tolgo la massima parte del liquido, cercando di evitare quanto è possibile di trascinar dietro gli Infusorî, che sono alla superficie. Nel recipiente quasi svuotato, aggiungo il liquido alimentare, fino al livello primitivo. Tale operazione si ripete ogni due o tre giorni, o più spesso, se si vuole che le condizioni della culture siano fisse.

Una forma particolare di queste culture, che possiamo chiamare culture al massimo, si ottiene quando, insieme col liquido, la maggior parte degli Infusorî si toglie pure via. Allora i rimanenti trovano maggiore quantità di alimento e proliferano attivamente, e sono al massimo grado di alimentazione. Tecnicamente non vi è nulla di più semplice: basta versar via la maggior parte del liquido, direttamente senza sifone, ed aggiungere nuovo infuso, facendo questa operazione tutti i giorni.

Naturalmente bisogna per ogni specie coltivata trovare il grado di concentrazione che più le si confà. Con questo intento, io faccio sempre gli estratti a caldo mediante una quantità approssimativamente uguale di fieno e di acqua. Cambio invece il rapporto tra questo infuso e l'acqua potabile bollita (senza fieno) che aggiungo o sostituisco nei vasi delle culture. Cambio anche la freschezza dell'infuso. Per le specie, come *Opercularia coarctata*, che tollerano un grande sviluppo batterico, è bene adoperare infusi preparati alcuni giorni avanti. In altri casi, massime per certe specie di Vorticellidi difficili a coltivare, la *Vorticella nebulifera* per esempio, si devono adoprare infusi più freschi. Son solito in questi casi adoprare un infuso che, dopo bollitura, è rimasto un solo giorno in riposo col suo fieno (in maniera da arricchirsi di sostanze disciolte), ma nel recipiente stesso in cui è stato bollito, od in altro in cui è stato messo caldo; in tal maniera lo sviluppo di Batterî è scarsissimo.

Con questi accorgimenti, i Chilodon, Colpoda, Vorticelle, Opercularie, Parameci ecc. ho mantenuto in condizioni poco mutevoli e

buone, per mesi e mesi. Di una specie, il *Carchesium polypinum*, non ho ottenuto cultnre continnative, essendo solo rinscito a ritardare il deperimento di quelle culture che si formano naturalmente, con acqua ed erbacce pescate nei fossi. Certamente non è una difficoltà di principio che qui si oppone; è solo che questa specie ha condizioni di esistenza piuttosto ristrette, le quali non ho potuto fin qui esattamente determinare. Ma devo anche dire che gli ultimi perfezionamenti di questa tecnica, qnale sopra è descritta, non li ho potuti esperimentare su qnesta specie, perchè non sono riuscito a trovarla a Bologna, — dato che la lotta contro la malaria ha fatto spargere nelle acque stagnanti dei veleni, micidiali per le larve delle zanzare e per gli studiosi di Protozoi.

Piccole culture. — Per trasportare sotto il microscopio le piccole cultnre dove gli Infusorî vengon posti in isolamento ed esperimento, ho adottato delle piccole camerette umide composte di due parti (Fig. 1 nel testo). La inferiore è formata di un vetrino portaoggetti contornato di uua bacchetta di vetro, che vi è saldata con ceralacca; la parte superiore, di un coprioggetti ugualmente contornato, e capovolto sulla prima, dove è versata un poco d'acqua. La piccola cnltnra sta in goccia pendente, aderente al coprioggetti. Piccole avvertenze son necessarie: di coprire con paraffina la ceralacca, nella scodellina superiore, per evitare che la goccia pendente si spanda snlla ceralacca medesima; sulla paraffina non si spande; di porre acqna distillata nella vaschetta di sotto, quando la goccia pendente è molto piccola; di spargere un minimo strato di albumina glicerinata (la miscela di Mayer per attaccare le sezioni microscopiche) snl vetro che fa da fondo, perchè l'acqua lo bagni bene fino ai bordi; ciò è importante perchè l'acqna nou invada la cultura, quando si solleva il vetrino di sopra onde fare alla cultura stessa qualche operazione. Queste camerette, che si posson osservare per ore di seguito al microscopio, pur di non lasciar disseccare l'acqua esterna, permettono di conservare gocce addirittura minime, p. e. che abbiano nn diametro minore di mezzo mm., quando la temperatnra della stanza è nelle varie ore della giornata assai costante; altrimenti le gocce devon essere un poco più grandi. Una grande camera umida, capace di contenere molte di queste camerette, serve per conservarle giorni o mesi se occorre. L'osservazione con obbiettivi ad immersione riesce molto comoda, perchè si pnò facilmente togliere l'olio di cedro rimasto sulla cameretta, senza minimamente danneggiare la piccola cultura.

Qualche volta ho adoperato per fondo un vetrino da orologio poco curvo ed a fondo piano (Fig. 1 del testo) o, per scopi speciali, ho posto un vetrino coprioggetti sopra uno da orologio, pieno di liquido di cultura tanto da bagnare la faccia inferiore, ma non la superiore del coprioggetti. Questo metodo serve per fare attaccare molte Vorticelle ad un vetrino; ed uno analogo consiste nel porre alcuni coprioggetti a galla, in un liquido di cultura di questi Infusorî; dopo un giorno, dopo due o tre al più, si trovano numerosissime

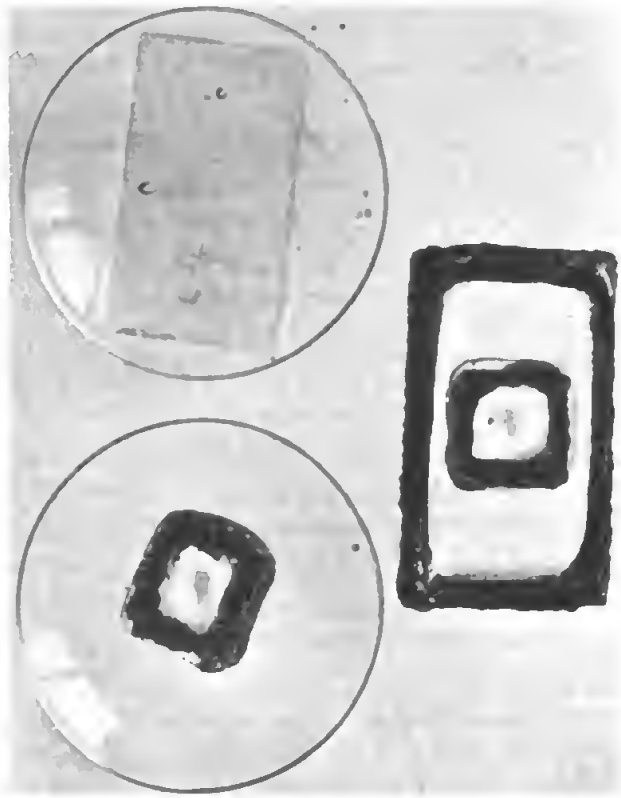


Fig 1.

Vorticelle attaccate alla faccia inferiore del vetrino, ciò che è comodo per fare i preparati. Colle Opercularie riesce invece meglio un altro sistema: mettere un vetrino coprioggetti al fondo di una base da cameretta umida, che serve questa volta da sola; versatavi la cultura di Opercularie, queste si attaccano numerose al vetrino che è in fondo, mentre, come sopra abbiamo avvertito, nelle grandi culture esse stanno più volentieri alla superficie superiore.

Anche nella tecnica per la confezione dei preparati microscopici ho da indicare alcuni metodi particolari.

Per far sezioni di Infusorî che non siano in straordinaria abbondanza nella cultura, o di cui si voglia avere un numero grandissimo nei preparati, c'è sempre il problema di non perderne troppi durante le varie manipolazioni. A questo scopo ho spesso adoprato con buon esito una scatoletta di carta da filtro o di carta da scrivere, molto piccola (6—8 mm. di lato), il cui fondo è reso ben piano coll'attaccarvi di sotto un vetrino coprioggetti. Perchè la scatoletta non si apra nelle varie operazioni, passo uno spillo fino attraverso di essa, in alto, e precisamente attraverso a quelle due facce opposte dove si trovano le rivoltature della carta. Posto il tutto in una vaschetta di vetro a fondo piano, porto dentro la scatoletta gli Infusorî, il cui numero può venire aumentato lasciando che un poco di liquido filtri attraverso la carta, e riempendo sempre la scatoletta. Dopo ciò, aggiungo il fissativo, lascio parzialmente filtrare, aggiungo nella scatoletta il liquido che dopo il fissativo deve sostituirlo, mentre al di fuori di essa vuoto sempre la vaschetta di vetro, mediante una pipetta. Così si possono successivamente cambiare tutti i liquidi, pur di non lasciare mai completamente vuota la scatoletta di carta, e si perdono pochissimi Infusorî; si può sostituire anche più volte la paraffina, mediante una pipetta scaldata, oppure si aggiunge paraffina solida dentro al toluolo e si lascia che questo evapori. Per raffreddare la paraffina, si porta la scatoletta di carta nell'acqua, e poi si toglie vetrino e carta, e rimane un blocchetto pronto ad esser sezionato, e con molti Infusorî al fondo.

Come fissativo ho adoperato per lo più il sublimato in soluzione satura acquosa, con un po' d'acido acetico, ed a caldo. Come coloranti, o l'ematossilina ferrica secondo Heidenhain (sola o seguita da una lieve colorazione alla fucsina) oppure una doppia colorazione al carmino boracico e verde metile, che mi ha dato resultati assai buoni sia nei preparati *in toto*, sia nelle sezioni, e assai strani confrontandoli con quelli dell'ematossilina ferrica. Questa colorazione al carmino e verde metile si può fare come segue. Prima si colora col carmino boracico, fino ad un rosa debole, poi si lava in alcool non acidulato. Se il carmino tinge molto, è bene allungarlo con alcool a 70 %. Poi si lascia nel verde metile (sciolto all' 1 % nell' alcool a 70) fino a un bel colore verde, che nei lavaggi successivi, in alcool, va via per la maggior parte. I tempi non posso indicarli con precisione, giacchè, ripetendo il metodo in laboratorî differenti, mi è accaduto di trovare delle differenze enormi; se però le soluzioni sono molto attive, bastano 2—4' nel carmino boracico allungato con alcool a 70 a parti uguali, e 5—10' nel verde metile, seguito da

lavaggio abbondante; che deve essere invece rapidissimo certe volte che il verde metile colora poco. Forse ci influisce la purezza delle sostanze, od anche il fissativo adoperato.

I preparati *in toto* devono essere chiusi in glicerina, le sezioni in balsamo del Canadà. Facendo preparati con questo metodo, ed altri con ematossilina ferrica, si hano nell' *Opercularia coarctata* degli strani contrasti; si tingono:

1. il micronncleo in riposo pochissimo nei preparati all' ematossilina — in verde o leggermente viola, col carmino boracico e verde metile.

2. Il citoplasma pochissimo o punto coll' ematossilina — in rosa coll' altro metodo.

3. I corpi interni del macronucleo, intensamente coll' ematossilina — in verde coll' altro metodo.

4. Il resto del macronucleo pochissimo coll' ematossilina — in rosa coll' altro metodo.

5. I cromosomi nella piastra equatoriale, intensamente coll' ematossilina — in verde coll' altro metodo.

Come si vede, dne doppie colorazioni — in fondo anche il metodo dell' ematossilina ferrica è nna doppia colorazione, perchè si ha il colore dell' ematossilina e qnello del mordente, che può essere sostituito dal rosa o rosso, se si aggiunge il trattamento colla fucsina — due doppie colorazioni distinguono i corpi dell' Opercnlaria, ciascuna in due categorie, ma in modi assolutamente diversi.

Per fare i preparati *in toto*, di *Opercularia* od altri Vorticellidi, mi sono esclusivamente servito dei metodi di autoattaccamento al vetrino, descritti poco sopra, a proposito delle piccole culture. Desiderando di non aver fenomeni di compressione, interponevo dei capelli tra il porta ed il coprioggetti; ed il metodo dell' autoattaccamento, oltre il vantaggio della comodità delle manipolazioni, ha quello di permettere l' esistenza di un discreto intervallo trai due vetrini — onde impossibilità di schiacciamento — ed insieme la possibilità dell' osservazione coi più forti obbiettivi ad immersione, giacchè gli Infusorî son rimasti vicini al coprioggetti.

Fissare in estensione i Vorticellidi non era richiesto in modo speciale dalle mie ricerche; pure studiai un poco la questione, e potei accertarmi che il sublimato acetico riscaldato verso 80° fissa il peduncolo delle Vorticelle bene spesso in estensione; non tutti gli individni si trovano estesi, ma molti sì; il metodo di CERTES e BEAUCHAMP (04) non mi ha dato buoni resultati per il corpo dell' *Opercularia*.

III. Condizioni determinanti la coniugazione nel Colpoda Steini (Mps.).

1. Influenza dello spessore della cultura.

Questa specie, sviluppata in straordinaria abbondanza in un infuso di fieno, mi fornì delle coningazioni, avendo posto alcune gocce nelle mie camerette umide, per produrre e provare quelle condizioni di diginno in piccole culture, che, secondo il Maupas (89), R. Hertwig ed altri, sono condizioni determinanti la coniugazione negli Infusori. Ciò accadde verso la metà di Gennaio 1906, e la reazione era così regolare, che una goccia pendente in una cameretta umida, oppure un preparato uso Maupas (88) (un portaoggetti ed un coprioggetti sovrapposto, ma tenutone discosto con un filo di vetro) contenevano sempre coniugazioni, anche in gran numero, dopo breve tempo. Riporto un esempio:

21. 1. 06. 3 vetrini uso Maupas, ed uno a goccia pendente son preparati coll' infuso ricco di *Colpoda*. — 22. 1. Epidemia di coniugazioni in tutti i vetrini. — 23.—26. 1. Seguitano le epidemie, ma tendono a diminuire di intensità. — 28. 1. Moltissime cisti, liberi pochi, piccoli, non coniugazioni. Dopo questo tempo le culture seguitano una vita stentata, ossia aumentano sempre le cisti, diminuiscono i *Colpoda* liberi. Il 26. 2. 06 si cessa l'esperimento.

Tale reazione così immediata che si produceva senza fallo mentre nella cultura madre, da cui erano tolte le gocce, non vi era nemmeno una coniugazione, mi fece dubitare che non si trattasse soltanto del digiuno, come causa determinante la coniugazione nei piccoli vetrini, ma che la piccolezza delle culture potesse avere una influenza come tale. Allora feci il seguente esperimento:

22. 1. 06. Sopra alcuni portaoggetti saldo con ceralacca delle bacchette di vetro, sì da avere degli scompartimenti delle seguenti grandezze: mm. 43×23; 23×21; 2,1×4,5; vi metto infuso con *Colpoda*, per una profondità, in tutti, di circa $^1/_4$ mm.; in un altro simile, largo pure 23×21 mm., metto infuso per una profondità di mm. 0,4, ed in uno un poco più piccolo, per una profondità di circa mm. 2,3; di più, preparo una delle solite camerette con goccia pendente. Il liquido, tolto dalla superficie della cultura madre, mescolato in un vetrino da orologio, è suddiviso in queste varie culture, in modo da avere per quanto è possibile una grande uniformità nelle sue proprietà, compresa la percentuale di Infusori ed alimento. Il 23. 1., molte coniugazioni dappertutto, tranne nel vetrino dove il liquido era profondo mm. 2,3; ve ne sono, in questo, solo poche, che si trovano a fatica. L'epidemia dura ancora nei giorni seguenti.

Da questo esperimento sorge subito il dubbio che l'elemento importante, che ha la maggiore influenza, sia la profondità dei recipienti. Allora il giorno seguente preparo le seguenti culture:

23. 1. Scompartimento di mm. 21×23, con nn sottile strato di infuso; scompartimento piccolo, circa mm. 2,1×4,5, liqnido per una profondità di mm. 1,9. — Il 24. 1., trovai una ricca epidemia nel vetrino largo con infuso poco profondo, e nessuna coniugazione nel piccolo scompartimento.

Contemporaneamente il 23. 1. preparai una cultnra, versando l'infnso ricco di *Colpoda* in nn coperchio di vetro circolare, di diametro circa di 67 mm., e per una profondità di circa 1,5 mm. — Il 24 nessnna coningazione, il 25, epidemia. Alle $10^1/_2$ nn po' di liquido di qnesto coperchio viene posto in un tubo verticale largo 6 mm., e per nna profondità di 15 mm. Alle 16 nessuna coningazione vi è più, mentre ancora vi è nna ricca epidemia nel coperchio, ed in nna goccia pendente in cameretta umida, pure trasportata dal coperchio, a ora $12^1/_2$, ed in nn sottile strato a snperficie scoperta, trasportato come sopra. Allora il liquido senza coningazioni lo rimetto in snperficie larga ed in sottile strato, versandolo in nno degli scompartimenti sopra citati, e nel tubo metto nuovo liqnido dal coperchio, fino all' altezza di prima (mm. 15). Alle $17^1/_2$, il liqnido rimesso nel tnbetto contiene un numero straordinario di cistl, e poche coppie, i cni individni tendono ad incistidarsi. Rimesso il liqnido in strato poco profondo, dopo mezz' ora non ci son più le nnmerose cisti prima osservate, e si osservano invece già parecchie coppie in formazione. Nei giorni seguenti, poche coningazioni negli strati sottili, e moltissime cisti, che vanno sempre anmentando. Il 29 provai a prendere di qnesto liqnido ricco di cisti dal coperchio, metterlo in gocce pendenti ed in tuhi sottili verticali ed orizzontali, agginngendo anche infnso più ricco di alimento od acqna potabile; ma non rinscii a prodnrre nuovamente coningazioni.

L'influenza dello strato alto come impedimento alla coniugazione. resulta da questo esperimento evidente. E giacchè, ripetendolo in vario modo, ebbi lo stesso resultato, rimane chiaramente spiegato perchè nella cultura madre non si formassero coniugazioni, che invece divenivano abbondantissime nelle piccole gocce, appena un giorno o due dopo la loro preparazione.

Sospettai anche, da questi esperimenti, che ponendo il liquido coi *Colpoda* entro tubetti, si potesse forse più brillantemente dimostrare la stessa cosa, secondochè i tubi fossero tenuti orizzontali o verticali. Ed in questo senso feci un numero grandissimo di esperimenti, prendendo dei tubetti di pochi cm. di lunghezza, chiusi ad un estremo, aperti all' altro, di diametro vario, e posti ora orizzontalmente ora verticalmente. Quando il diametro era di 4,5 mm, coniugazioni non si formavano nè nei tubi orizzontali nè nei tubi verticali. In quelli invece che avevano un diametro di 1--2 mm, o qualche cosa di più, si formavano epidemie di coniugazioni, da un giorno all' altro, se erano posti orizzontalmente; nemmeno una coniugazione era visibile in quelli tennti verticalmente. L'osservazione positiva nel primo caso era facile a farsi, bastava versare su un vetrino una goccia del liquido contenuto nel tubetto; nel secondo caso. l'osservazione negativa richiedeva naturalmente

maggiori precanzioni. Osservavo tutto il liquido del tubetto, versandolo sopra un vetrino, ma diviso in piccole gocce: gocce tanto piccole, da potersi osservare con un obbiettivo debole in modo da acquistare la sicurezza assoluta che esse non contenessero nemmeno una coppia di coniuganti. L'esperimento divenne poi ancora più dimostrativo, modificandolo nel senso di adoperare un sol tubetto, messo successivamente in posizione orizzontale e verticale, per più volte, mutando la sua posizione una volta al giorno; ed il resultato fu nettissimo, cioè più volte di seguito in uno stesso tubetto mi riuscì di osservare la comparsa e la sparizione delle coniugazioni, secondo la posizione; naturalmente in nessun caso è possibile di prolungare molto l'esperimento, perchè dopo alcuni giorni ed in qualunque posizione sia tenuto il tubetto, l'epidemia diminuisce e cessa. I tubetti orizzontali — è necessario a questo proposito dare qualche schiarimento — non lasciavano scorrer via il liquido che contenevano, dato il loro diametro ristretto. Poteva sorgere il dubbio che il liquido, bagnando un poco la parete del vetro, si estendesse a formare uno strato sottilissimo, ove potesse essere l'origine delle coniugazioni. Ma anche questo pericolo potei eliminare completamente, cospargendo la parete interna del tubo di un sottile strato di paraffina; allora il tubetto, posto verticalmente od orizzontalmente, non mostrava all' occhio variazione alcuna nel menisco del liquido, il quale cercavo che fosse piano quanto era possibile; in ogni caso, era affatto evitata la possibilità che il liquido bagnasse la parete del tubo Con questi piccoli perfezionamenti tecnici, l'esperimento, molte volte ripetuto, non variò affatto nel suo decorso.

Che un tubetto posto verticalmente permetta ai Colpoda di coniugarsi, è anche possibile, e ciò in due casi differenti: o che il liquido in esso contenuto non superi un' altezza di circa 2 mm. — e questo caso conferma senz' altro la solita regola, in quanto anche qui si tratta di uno strato verticalmente sottile — o che il tubetto sia un capillare molto sottile. Allora la cultura deperisce rapidamente, e presenta un decorso molto irregolare, mostrandosi coniugazioni talora in tubi verticali, talora in tubi orizzontali, talora non negli uni nè negli altri. Non è molto degno di nota il fatto che il tubo orizzontale sottilissimo, in cui palesemente i *Colpoda* vivono male, non sia sempre ricco di coniugazioni. Anche versando del sublimato corrosivo sopra ad una cultura si impedisce che in essa si formino coniugazioni, e così, senza andare all' esagerazione, tutte le volte che per una ragione o per un' altra una condizione nociva limita o interrompe la vitalità degli Infusori. Quanto all' altra

eccezione, ricordiamola per un momento, mettendola da parte per trattarla insieme con un altro caso analogo tra poco.

Con questi esperimenti non si rende ancora chiara la ragione per la quale i *Colpoda* si coniugano soltanto in strati sottili. Si è dimostrato questo fatto, ma non trovata la sua causa; differenti supposizioni si possono fare. Quando lo strato è grosso in senso verticale, può essere che la qnantità di alimento che si raccoglie alla snperficie libera dove vivono i *Colpoda*, sia maggiore che nel l'altro caso; insomma, le condizioni nutritizie potrebbero essere diverse nei due casi, se p. e. i Batterî si portassero più facilmente alla superficie libera quando essa è superiore (tubetto verticale) che quando essa è laterale (tubetto orizzontale). D' altra parte si potrebbe supporre che realmente la profundità della cultura abbia una diretta influenza sopra al *Colpoda*. Queste varie supposizioni mi condussero a fare un esperimento tale da scindere i varî elementi. Preparai delle cellette fatte nel seguente modo: su un vetrino portaoggetti sono saldate delle bacchette di vetro, in maniera da formare due lati opposti di un quadrato o di un rettangolo; sopra. è saldato un copriogetti. Rimane cosi trai due vetrini uno spazio che può esser riempito di liquido; e se il copriogetti non è più grande di 2 cm. q. e la profondità dello spazio (ossia il diametro delle bacchettine) è qualche cosa meno di 2 mm., il liquido non si versa in qualunqne posizione sia messo il tutto, e siamo per l' appunto nelle condizioni buone per fare esperimenti col *Colpoda*; ponendo il vetrino orizzontalmente, lo strato di 2 mm. è tale da permettere loro la coniugazione; ponendo il vetrino verticalmente, la profondità del liquido in direzione verticale — circa 1 cm. $^1/_2$ — dovrebbe esser tale da impedire la coningazione. Ma si può mettere il vetrino verticalmente in due modi diversi: o colle superfici libere del liquido orizzontali ed allora veramente il liquido cade; ma si può fare l'esperimento in condizioni poco variate, chiudendo un lato di più della celletta, e lasciandone libero uno solo, che sarebbe in questo caso quello superiore; — oppure si può mettere il vetrino colle superfici libere verticali, ed in questo caso possono essere veramente due libere, od una, a volontà. Nel caso della celletta aperta di sopra, siamo in condizioni che corrispondono a quelle del tubetto posto verticalmente, quanto nel caso della celletta posta orizzontalmente siamo in condizioni simili a quelle del tubetto orizzontale. Ma nell' ultimo caso, del vetrino verticale colle superfici libere laterali, siamo in condizioni nuove e molto significative per il nostro scopo; le superfici libere sono laterali, non superiori, sono laterali

$1^1/_2$ cm., come lo sono nel caso in cui esso è di soli 2 mm. (vetrino orizzontale).

Molto incuriosito di sapere se in queste nuove condizioni i *Colpoda* si coniugassero o no, preparai parecchi vetrini, mettendoli in tutte le condizioni che ho accennato sopra, ed uno stesso cambiandolo successivamente di posizione nei tre versi indicati, e così via. Ebbene, gli esperimenti dettero un resultato, anche qui, sempre concorde: che le superfici libere siano orizzontali o verticali non ha nessuna influenza; soltanto la grossezza dello strato in direzione verticale ha importanza, ossia la coniugazione non si è mai prodotta nei vetrini posti verticalmente, comunque fossero girati, ed avessero uno oppure due lati liberi. Cito un solo esempio, per non fare ripetizioni inutili:

11. 2. 06. Una celletta con un vetrino di diametro di 1 cm., fissato da due lati opposti, con due bacchettine di 2 mm. di spessore, è posta orizzontalmente, coll' infuso ricco di *Colpoda*. È messo invece verticale un vetrino che porta tre cellette: una simile a quella di sopra, con i due lati liberi verticali. Una che differisce dalla precedente solo per le dimensioni del vetrino, che è lungo 2 cm. e largo mm. 8,5; in questo caso le superfici libere non sono variate sensibilmente, ma soltanto la quantità del liquido, che è aumentata. Infine, una terza colletta ha solo il lato superiore aperto, pur essendo delle stesse dimensioni della prima. Queste tre cellette si riempiono collo stesso liquido di cultura del vetrino orizzontale.

12. 2. Nel vetrino orizzontale, coniugazioni, epidemia forte; in quello verticale nessuna, in nessuna celletta. L'osservazione si fa a lungo, per esame diretto dei vetrini al microscopio. A ore 12 si rivoltano i due vetrini, cioè si mette il primo verticale (superfici libere verticali, ossia laterali), e il secondo orizzontale. Dopo tre ore ci sono ancora coniugazioni nel primo vetrino, e si vedono incominciare anche nel secondo.

13. 2. Nel primo vetrino non c'è nessuna coniugazione; nel secondo ve ne sono molto numerose in tutte e tre le collette. Nei giorni seguenti tutte queste piccole culture vanno lentamente deperendo.

Quando adoperavo cellette molto sottili, con uno strato liquido di una frazione di mm., allora le coniugazioni si formavano tanto in posizione orizzontale che in posizione verticale, esperimento questo che corrisponde a quello dei tubicini verticali capillari, nei quali ho talora osservato coniugazioni.

Facile è raccogliere i resulati di questi esperimenti in un unico enunciato: in tutti, i Colpoda si sono coniugati solamente quando lo strato liquido in direzione verticale era sottile, esclusi i tubetti e le cellette capillari. Ciò va d'accordo colle osservazioni degli altri autori, i quali non hanno conosciuto la coniugazione di questo Infusorio, giacchè generalmente

nel caso in cui lo strato liquido in direzione verticale è di circa si fanno culture assai più in grande. E nelle mie culture madri, nelle quali lo strato era profondo almeno qualche centimetro, non ho mai osservato coniugazioni.

L'ultimo esperimento, delle cellette, non lascia campo a supporre che modificazioni delle condizioni alimentari possano essere causa del formarsi o no delle coniugazioni. Non saprei affatto immaginare come esse possano prodursi in una celletta la quale da orizzontale vien posta verticale, sempre conservando i suoi due lati aperti laterali. Mi sembra che la influenza più probabile sia quella diretta, dello spessore dello strato; quando esso è piccolo, gli Infusorî, impacciati nei loro movimenti, si coniugano. Questo modo di considerare le cose spiega anche l'eccezione, dei tubetti e cellette capillari, giacchè in questo caso anche i movimenti verticali dei *Colpoda* — verticali, certamente non in senso esatto, geometrico! — devono venire impacciati, nonostante che lo strato in direzione verticale sia grosso.

Quanto al significato di questa reazione, rispetto alle abituali condizioni di vita dei Colpoda, si possono anche trarre delle conseguenze. Abbiamo visto, che l'epidemia di coniugazioni è precednta da ancistidamento dei grossi individui; appena messe le culture in strato sottile, dopo poche ore, tutti i più grossi individui sono o in via di incistidarsi, o incistidati. Si tratta, esclusivamente di cisti di divisione, le quali, come è noto (RHUMBLER 88) sono ben differenti dalle cisti conservative, e costituiscono in questa specie l'unico modo di scissione. Viene dunqne in mente l'idea di considerare questi più grossi individui come quelli che producono, coi loro discendenti, l'epidemia di coniugazioni; però essi non sono indispensabili; anche da culture che non contengono questi individui di straordinaria grossezza — il polimorfismo del *Colpoda Steinî* è ben noto — si possono avere coniugazioni; ma in numero ben limitato; onde a questi si deve almeno attribuire la parte principale nella produzione della epidemia. Le divisioni osservate corrispondono perciò alle divisioni di digiuno osservate negli altri Infusorî, ma anzichè esser prodotte dal digiuno — un abbondante nutrimento non impedisce la formazione dell' epidemia — son causate dallo spessore piccolo della cultura. Una volta formate le coniugazioni, una volta in via di terminare l'epidemia, il numero degli individui liberi nella cultura diminuisce progressivamente, aumentando invece le cisti, le cisti durature questa volta, oltre quelle di divisione; e ciò indipendentemente da ogni disseccamento. L'epidemia di coniugazioni seguita dall' incistidamento ci ricorda

quei Protozoi in cui la copulazione avviene sotto ciste; o siano i *Colpoda* uno stadio di avviamento verso questa condizione, o piuttosto da qnesta verso quella degli Infusorî che si coniugano indipendentemente da ogni fenomeno di incistidamento, essi costitniscono in ogni modo un anello di congiungimento tra le due forme diverse di unione sessuale, rimaste fino ad ora — a quanto mi sembra — disgiunte da nn salto.

Da un' altra parte possiamo anche considerare le particolari condizioni nelle quali l'epidemia si prodnce. Evidentemente il modo di reagire del *Colpoda*, non deve ritenersi abbia la sua ragion d' essere nella risposta a quelle particolari forme di cnlture, in cni gli Infusorî sono stati posti negli esperimenti; bensì deve essere in accordo colle condizioni biologiche normali di questi Infusorî. Ora, è evidente che in natura lo strato del liquido in cui vivono i *Colpoda* non è sempre sottile, ma soltanto quando si avvicina il momento del disseccamento; ed a questo segue per lo più una diffusione delle cisti in altri ambienti; dato ciò, che non è altro che nna semplice constatazione di fatto, ne seguono due interessanti considerazioni. Se le coniugazioni — come discuteremo più avanti — hanno per effetto principale il mantenimento della fissità della specie, si capisce bene che esse si producano al momento in cui più facile è la separazione degli individui che prima erano vissuti insieme. D'altra parte, vediamo che qui si produce la coniugazione in condizioni perfettamente analoghe e quelle in cni si produce in un numero grandissimo di Protozoi e di altri organismi; se consideriamo p. e. i parassiti, in essi è fenomeno ordinario quello dell' intercalazione di generazioni sessuali, in mezzo a generazioni agame, quando da un' ospite passano in un altro. O reciprocamente, il che è lo stesso, per passare da un ospite ad un altro è necessaria la produzione di un germe fecondato. Tutto l'insieme di questi fatti ci conduce sempre più a ritenere la nostra specie come connessa coi Protozoi più semplici, assai più che non lo siano gli altri ciliati; si hanno in particolar modo dei pnnti di somiglianza colle Gregarine.

2. Influenza dei liquidi: scambî tra Colpoda e liquidi di varie culture.

Gli esperimenti sopra riferiti, la reazione dei *Colpoda*, per la qnale essi si coniugano negli strati sottili, non avviene sempre; se le culture son capaci di dare coniugazioni, le dànno solo nelle condizioni suddette; ma spesso non le dànno in nessun modo; lo strato sottile

è cioè condizione necessaria, ma non sufficiente, ed ogni cultura non continuativa di *Colpoda Steini*, dopo un periodo in cui è capace di fornire coniugazioni, cessa di reagire agli strati sottili; in ciò dunque si comportano questi Infusorî come gli altri, nei quali un' epidemia di coniugazioni è seguita dall' impossibilità, almeno finchè non si rinnova o varia la cultura, di nuove coniugazioni. Ma la differenza particolare, consistente nell' aggiunta di quella condizione necessaria che abbiamo studiato, getta viva luce sul perchè, dopo una epidemia, le coniugazioni cessino. Si poteva pensare che ciò dipendesse da che, gli Infusorî essendosi coniugati, i discendenti, individui giovani, non maturi sessualmente, non possano più coniugarsi. Il Colpoda realizza di per sè un bell' esperimento di distinzione dei varî elementi causali: in esso infatti le coniugazioni non si formano in atto nella cultura grande, che invece questa attraversa un periodo nel quale può darle — se gli individui vengon messi in strato sottile — L' influenza delle coniugazioni avvenute, non si può far sentire nella cultura del Colpoda, come in quelle degli altri Infusorî, giacchè nel nostro caso coniugazioni non sono avvenute nella cultura in questione, ma soltanto sappiamo della possibilità che esse avvengano, per gli esperimenti collaterali, fatti con piccole gocce tolte al vaso, ed ivi non rimesse. Eppure, dopo il periodo della possibilità di coniugarsi, questa possibilità cessa, nè più nè meno come dopo le coniugazioni avvenute, nelle culture degli altri Infusorî. È evidente da ciò che negli Infusorî in genere, non sono le coniugazioni avvenute, la causa per cui cessa l'epidemia coniugativa; bensì altre condizioni, che si devono svolgere nel liquido culturale, indipendentemente dal fatto delle coniugazioni.

A conferma di questo modo di vedere, pensai di fare il seguente esperimento: avendo due culture di *Colpoda Steini*, delle quali una reagisca, dando coniugazioni in strato sottile, e l'altra no, unire i Colpoda dell' una al liquido dell' altra, e viceversa, e vedere poi se ed in quale di queste unioni si formino coniugazioni. La realizzazione pratica di questo esperimento è piuttosto difficile, ma si riesce con qualche accorgimento a mettersi nelle condizioni volute, con grande approssimazione. Non è possibile trasportare da una cultura i soli *Colpoda*, senza un poco del loro liquido; ma se la cultura è molto ricca, si può ridurre questo liquido ad una quantità minima; basta prendere una minutissima gocciolina dalla superficie superiore della cultura, col polpastrello del dito; osservando al microscopio il resul-

tato del tentativo eseguito, spesso si trova per così dire una massa di organismi viventi, addossati talmente, da formare quasi un corpo solo. Per prendere invece il liquido senza gli Infusorî, si immerge una pipetta nella cultura, qualche cm sotto la superficie superiore, e si aspira lentamente, senza scuotere affatto; la cultura stessa, sarebbe inutile dirlo, non doveva esser mossa almeno da qualche ora. Il liquido raccolto contiene pochi o punti *Colpoda*; si divide in minute goccioline sopra ad un vetrino, e si scartano, esaminandole al microscopio, tutte quelle che contengono *Colpoda* o sue cisti. Si riesce così con un poco di pazienza a mettere insieme una certa quantità di liquido senza *Colpoda*, ricco invece di Batterî, un liquido che non corrisponde proprio esattamente a quello in cui si trovano i *Colpoda* nella cultura, ma che gli assomiglia; le sostanze disciolte sono probabilmente le stesse, ed approssimativamente in uguale proporzione; la differenza maggiore dipende dal fatto che alla superficie, dove vivono i *Colpoda*, si trovano Batterî e Flagellati in maggior quantità che nello strato sottostante da cui il liquido é stato preso. Ma, come vedremo, questa differenza, che non saprei davvero come meglio evitare, non impedirà la riuscita dell' esperimento.

Comincio col riferire uno degli esperimenti, come esempio:

8. 2. 06. Ho 4 culture di *Colpoda* di cui, per le prove fatte negli ultimi giorni scorsi, una reagisce dando coniugazioni (cultura A), le altre no (culture B, C, D). Preparo una coppia di tubetti (uno orizzontale ed uno verticale), con ciascuna delle culture B, C, D, e 5 coppie colla cultura A.

Il 9. 2., c' è epidemia di coniugazioni nei 5 tubetti orizzontali di A., nemmeno una in tutti gli altri. I tubetti di B non han dato mai coniugazioni, nemmeno nei giorni seguenti, quelli di C e di D (orizzontali!) ne hanno date alcune, respettivamente il 14 e il 16 del mese; ciò non potevo prevederlo il 10, ma per l' appunto scelsi per l' esperimento che segue, la cultura B, che non reagì affatto.

Il 10. 2., prendo da un tubetto della cultura A, orizzontale e ricco di coniugazioni, una certa quantità di liquido senza *Colpoda*, e ne pongo due gocce rispettivamente in due vetrini da cameretta umida. In una delle gocce aggiungo *Colpoda* dalla cultura A, nell' altra dalla cultura B (che non dà coniugazioni). Faccio poi l' inverso, prendendo i *Colpoda* dal tubetto orizzontale di A, e mettendoli in una goccia del tubetto orizzontale di B; per riprova, in un' altra goccia pongo *Colpoda* e liquido B. Ho ottenuto coniugazioni, il giorno seguente, in tutte le gocce, tranne nell' ultima. Ossia, la cultura che non dava di per sè coniugazioni, non le ha date veramente, nemmeno in questa prova di confronto. Quella che le dava, ha seguitato a darle, anche prendendo il liquido ed i *Colpoda* con quella tecnica speciale, adoperata per fare le mescolanze di culture diverse. I *Colpoda* della cultura che reagiva si sono coniugati anche nel liquido della cultura cattiva; e quelli della cultura cattiva — e che non si sono coniugati nel proprio liquido, si sono invece coniugati nel liquido della cultura buona.

Lo stesso esperimento feci due giorni dopo, colle stesse culture e con molti vetrini. Questa volta il resultato fu diverso nella mescolanza dei *Colpoda* della cultura buona, mescolati col liquido della cultura cattiva: mancarono anche qui le coniugazioni.

Esperimenti analoghi li feci ponendo le solite 4 mescolanze in altrettanti tubetti orizzontali; liquidi e *Colpoda* son tolti direttamente dalle culture madri. Ho trovato coningazioni nei tubetti con liquido della cultura buona, e *Colpoda* dell' nna o dell' altra; non ne ho trovate in qnelli del liquido cattivo, più *Colpoda* della stessa o dell' altra cnltnra.

Riassumendo questi ed altri nnmerosi esperimenti similmente condotti, posso concludere che il liqnido di una cultura che dà coniugazioni, è capace di indurre a coniugarsi i Colpoda di una che di per sè non ne dà; viceversa, i Colpoda di una cultura che dà coniugazioni, non si coningano più quando vengon messi nel liquido di una cultura che non ne dà. Ambedue questi fenomeni si producono molto spesso, ma non sempre; ciò però evidentemente non toglie il loro valore; l' influenza del liquido ambiente nella produzione delle coniugazioni ne resulta direttamente dimostrata. Devo anche dire che le eccezioni riguardanti il caso dell' unione di *Colpoda* di cultura buona con liquido di cultura cattiva, si sono verificate quando per l' appunto avevo osservato che i *Colpoda* non erano tanto privi di liquido come di consueto; e che la mancanza delle coniugazioni nelle mescolanze di *Colpoda* della cultura cattiva con liquido di qnella buona, ben si può spiegare con il fatto accennato sopra, che il liquido raccolto in uno strato un poco profondo, non è esattamente lo stesso di quello raccolto direttamente alla snperficie della cultura.

Ecco dnnque che, come ci proponevamo, con questi resultati veniamo a mettere in più chiara luce il fatto che una cultura lasciata a sè, prima non dà coniugazioni, poi traversa un periodo in cui è capace di darle, poi di nuovo cessa di darle. Ciò non dipende da misteriose condizioni svolgentesi negli Infusorî, ma le modificazioni del liquido ambiente giuocano la prima parte nelle differenze osservate.

3. Inflnenza delle generazioni agame snlla produzione di coniugazioni.

Un altro punto abbiamo anche trattato per il *Colpoda*, secondo il programma propostoci, cioè la formazione di coniugazioni

dopo poche generazioni agame da alcuni exconiuganti. Isolando delle coppie di *Colpoda* in piccole culture, non sempre si riesce ad avere in esse presto delle coniugazioni, data la gran tendenza alla produzione di cisti durature. Ma gli insuccessi non tolgono valore ai casi positivi, in cui l' esperimento è riuscito. Cito qualche esempio.

5 coppie isolate e riunite in nna goccia, hanno dato origine a circa 50 individni dopo 5 giorni, avendo ricevuto per alimento un bnon infuso di fieno; a qnesto punto se ne lasciano nella goccia 12, che nei giorni seguenti non formano coningazioni, tendendo invece all' incistidamento; degli altri se ne mettono alcuni in tre gocce, e precisamente 14 in nna, 4 e 3 nelle altre dne; in tntte e tre si trasportano i *Colpoda* con pochissimo del loro liqnido, allungando con acqna potabile. Il giorno seguente, le dne gocce con 4 e 3 sono andate in malora, per cause estranee all' esperimento, in qnella che aveva 14 *Colpoda* ce ne sono circa 30, ed alcune coningazioni son contenute. È difficile che qnesti individui si trovassero più che alla sesta generazione, a partire dalle coppie che erano state isolate.

Un altra volta ottenni coniugazioni tra 100—150 individni derivanti da 1 sola coppia dopo 8 giorni, ed avendo dato per alimento nell' ultimo giorno il liqnido di nna cultnra che dava coningazioni in strati sottili. Qui si era circa all' 8ª generazione.

È interessente notare come le coniugazioni si siano ottenute appunto facendo agire sulle piccole culture quelle condizioni di ambiente che sono in generale atte a produrle; rimane insomma dimostrato che, pur di avere determinate condizioni esterne, i Colpoda possono coniugarsi dopo pochissime generazioni dalle coniugazioni precedenti.

Con questi esperimenti, altrettanto difficili e lunghi a condursi ad effetto, quanto facili e brevi a raccontarsi, ho terminato di riferire le principali ricerche che ho fatto con questa specie.

Si spiega dunque per essa quale influenza abbiano le piccole culture, al confronto delle grandi, ed indipendentemente dalla maggior rapidità con cui gli Infusorî finiscano il cibo che è a loro disposizione.

Clara Hamburger dice che Bütschli (76) e Maupas (89), ed essa stessa hanno osservato l' influenza delle piccole culture, ma non ne dà spiegazione; anzi si meraviglia che in condizioni apparentemente uguali le cose vadano diversamente. Forse le ricerche future metteranno in evidenza sempre nnovi elementi causali e determinanti della coniugazione, condizioni che si possono svolgere nei piccoli ambienti più presto che nei grandi. Veramente il Maupas dice ripetutamente che la più rapida scarsezza del cibo che in esse si

produce debba essere la causa della differenza. Ma non è probabilmente la sola; dei Parameci che si trovino in una grande cultura di cui non venga rinnovato il liquido, si moltiplicano con tanta rapidità, che in pochi giorni il loro numero, rispetto al volume od alla superficie del liquido diventa straordinario, anche molto maggiore che non in un esperimento in piccola cultura che venga preparato per ottenere coniugazioni; eppure nel caso della cultura grande esse non vengon affatto, o si fanno attendere molto più che nella piccola. Invano però ho fino ad ora tentato esperimenti con questa specie per cercare di scindere nei suoi elementi la diversità di condizioni nelle diverse culture. La relativa rarità di successo nell' ottenere con essa coniugazioni mi ha impedito di trarre delle conclusioni.

IV. Condizioni determinanti la coniugazione nel Chilodon uncinatus (EHRBG).

Questo genere offre, come è noto, una particolare difficoltà nei trasporti degli individui da un vetrino ad un altro, massime delle coppie in coniugazione, perchè quando si applica la pipetta per trarli su con un poco di liquido, essi aderiscono invece fortemente al vetro. Non però che sia impossibile il vincere tale difficoltà; bisogna osservare attentamente al microscopio la posizione dell' individuo che si vuole aspirare, e poi avvicinare la pipetta rapidamente, con mossa sicura e decisa, andando proprio sopra all' individuo stesso; allora per lo più esso viene su; altrimenti si può ritentare le prova, dopo però avere atteso qualche istante, perchè esso si sia rimesso in moto.

Per gli esperimenti che ho fatto con questa specie ho adoperato esclusivamente una cultura continuativa, derivata da un individuo isolato l' 1. 2. 06. — La cultura divenne presto ricca, grazie al buon nutrimento, che però non era tale da far moltiplicare i *Chilodon* in numero straordinario. Allora l' 1. 3. 06 sostituii un infuso più ricco del solito, anzi ricchissimo di Batterî, ed il 2 notai un aumento grande del numero dei Chilodon, ed un gran numero di divisioni. Il 3 l' aumento è più notevole, e si trovano coniugazioni. Anche il 19 sostituii un infuso ricchissimo, ed osservai già il 20 una coniugazione, il 21 molte. Quando veniva sostituito un infuso non molto ricco di alimento, non si palesava tale intensa reazione. Essa era apparentemente dovuta all' aumento dell' alimentazione, ma in

realtà alla diminnzione che ne seguiva. Infatti, prendendo nna piccola qnantità di *Chilodon*, e mettendoli in una discreta quantità di quello stesso infuso ricchissimo che causava le coniugazioni nella cultura originaria, gli Infusorî si moltiplicarono rapidamente, con molte forme di divisione visibili, ma senza coniugarsi per molti giorni. Vuol dire che in qnelle cnlture già ricche di *Chilodon*, nelle quali si aumenta notevolmente il mangiare, l'aumento rapido degli Infusorî, che ne consegue, stabilisce tosto la formazione di condizioni opposte, di scarsa alimentazione.

Cultnre in piccoli vetrini dànno facilmente coniugazioni con questa specie, togliendo gli individui da nna cultura ben nntrita. È da notarsi però che coniugazioni sporadiche si possono trovare anche in vasi che contengon liquido poverissimo di alimento, ove i *Chilodon* vivono stentatamente da mesi.

Gli esperimenti che ho fatto, sistematicamente, sono i seguenti:

1. Tentativi di produzione di coniugazioni tra parenti molto prossimi; essi sono riusciti, partendo da un individuo isolato in una goccia, avendo io potnto osservare più di nna volta coningazioni qnando i discendenti non erano più di 64. La cosa è difficile, e gli esperimenti con esito positivo li feci circa un paio d' anni fa, mentre in alcuni più recenti, fatti colla cultura continuativa di cui sopra è detto, non riuscii ad avere nn' epidemia altrettanto sollecita.

2. Tentativi di produzioni di coniugazioni con discendenti prossimi di exconiuganti. Anche qnesti non riescono sempre, essendo difficile di produrre rapidamente ed in piccolo le condizioni volute. Il caso migliore è quello di una cultura derivata da 3 exconinganti, riuniti in una piccola goccia; ebbi coniugazioni dopo 6 giorni, quando gli individui erano circa 96, ossia tra la 5ª e la 6ª generazione. Altra volta ebbi coniugazioni da una coppia che aveva dato luogo a poco più di 100 individui (7ª—8ª generazione); gli altri esperimenti hanno avuto un resultato sempre meno rapido.

Anche qui dunque, come nel *Colpoda Steinî*, si possono ottenere coniugazioni, senza che una lunga serie di generazioni agame sia trascorsa dalla coniugazione precedente.

V. Opercularia coarctata. Condizioni della coniugazione.

1. Allevamento di questa specie.

Anche con questa specie ho fatto gli esperimenti traendo tutti gli individui da una cultura continuativa, derivata da un individno isolato il 6. 2. 06. La cnltura ha avnto vita rigogliosa durante le principali ricerche qui riferite, ed anche dopo, soltanto dne volte per pochi giorni la ridnssi ad un piccolo vasetto con cibo non mntato, essendo io in viaggio. Questo piccolo Vorticellide è prezioso per la ricerca, data la sua grande resistenza; resiste senza difficoltà al disseccamento anche rapido, ma, quello che più conta, quando si trasporta nn individuo da nn liqnido ad un altro, esso non muore; nelle piccole culture, che dànno sempre colle altre specie una percentuale di insnccessi all' atto di formarle, con questa specie ben possiamo dire che non esistono insnccessi. Non ricordo di averne mai avuti, nè ne trovo segnati nei miei appnnti. Ciò non è dovnto a cure più speciali che avessi coll' Opercularia, anzi talora per prova trasportai espressamente alcuni individui da un liquido ad un altro assai diverso, ed essi rimasero sempre in vita.

Lasciando la cultura senza sostituire il liquido per qualche giorno, in modo che più facilmente si formi alla snperficie un ricco strato di Infusorî, e poi sostituendo un infuso ricco di Batterî e piccoli Flagellati, talvolta sorgono epidemie di coniugazioni già il giorno seguente, e per più volte di seguito si possono avere delle abbondanti epidemie, con tale pronta reazione, che parrebbe qnasi inverosimile esse si debbano al digiuno anzichè alla ricca alimentazione. Ma anche qui l'esperimento decide la cosa nel senso del diginno, e molto nettamente. In primo luogo, si può assai bene osservare che dopo poche ore dall' aggiunta di nuovo cibo, le Opercnlarie sono ingrassate, ed invece il giorno seguente, se vi sono coniugazioni, sono anche più magre; ma meglio risponde l'esperimento. Quando le Opercularie sono grasse, dopo poche ore dall' aggiunta dell' infnso alimentare, prendo una piccola quantità del liquido di cultura, e lo diluisco con molta acqua potabile. Un' altra dose circa uguale la diluisco con lo stesso infuso alimentare. Allora succede che il giorno seguente le Opercularie dell' acqua potabile sono magre, e tra esse si trovano molti microgameti e coningazioni; mentre invece quelle che son state poste in scarso numero entro gran quantità di infuso alimentare, sono grasse e senza coniugazioni; qneste cominciano soltanto dopo alcuni giorni, quando anche in questo vaso le Opercnlarie sono dimagrate e divennte moltissime e fitte.

2. Coniugazioni tra parenti, dopo poche generazioni agame dalla coniugazione precedente.

I primi esperimenti che intrapresi a fare colle Opercularie, avevano il solito scopo, di produrre coniugazioni dopo una corta serie di divisioni, partendo da exconiuganti. Per qnesto scopo procedei all' isolamento di coniugazioni; cosi da nna isolata il 26. 2, il 4. 3. si hanno 71 individni, e parecchi microgameti che corrono; due giorni dopo la cnltura non è più rigogliosa, ossia le Opercnlarie smagrite sono in uno stato di inattività ben riconoscibile, e caratteristico del diginno; allora aggiungo un poco di infuso alimentare, ed esse, dopo essere rapidamente ingrassate, il 7. 2. contengono microgameti e coniugazioni. Una di qneste, di nuovo isolata, dà luogo ad un' altra piccola cultura dove il 16. 2. tra circa 120 individui, sono di nuovo microgameti e coniugazioni, dopo 7—8 generazioni dalla coningazione precedente. È da notarsi che questi individni che si coniugano nelle piccole cnlture, sono anche tra loro stretti parenti, derivando tutti da nn' unica coniugazione.

3. La divisione sessuale.

Stavo facendo nnovi esperimenti di qnesto genere, di cni alcuni erano già riusciti con buon esito, qnando, per procurarmi più facilmente delle coniugazioni — non sempre facili ad isolarsi anche se ce ne sono parecchie, — pensai di riunire in una piccola goccia nna *Opercularia* qualunque, presa dalla cnltnra, con due o tre microgameti. Però, con mia grande sorpresa, sebbene ripetessi la prova più volte, non ebbi nessun resultato positivo; cosicchè, mentre abbandonai senz' altro la cosa, come mezzo per avere coniugazioni, cominciai a cercare di chiarire il fenomeno di qnesta fecondazione artificiale non riuscita. Dopo alcuni giorni, osservando attentamente le culture che erano ricchissime di coniugazioni, potei scorgere alcnne formazioni molto caratteristiche, che mi misero sulla strada dell' esperimento.

Come è noto, nell' *Opercularia* si formano i microgameti da una divisione ineguale, che dà origine a 2 individui di diversa dimensioue; il piñ piccolo si divide in due microgameti, che presto si staccano; qnalche volta — io lo ho osservato rarissimamente — si divide ancora, sì da prodnrre 4 microgameti anzichè 2.

Due Opercularie, una grande normalmente ed una piccola — padre dei microgameti — si trovano spesso attaccate tra loro, ed isolate da ogni altra cosa, nel liquido delle cnltnre; o, in stadio poco

più avanzato, una *Opercularia* di apparenza normale, con i 2 microgameti che ancora non si sono staccati, o con uno solo, essendo già distaccato l'altro. Mi capitò di vedere una Opercularia in coniugazione, la quale aveva ancora uno o tutti e due i suoi microgameti attaccati; e queste curiose formazioni trovai ripetutamente. Allora pensai che ciò non fosse un caso, ma che appunto fossero destinate alla coniugazione, come macrogameti, quelle Opercularie che eran sorelle dei microgameti. Sottoposi la cosa ad esperimento, nel modo seguente:

Andai in cerca di individui che avessero attaccati i microgameti, in stadi più o meno avanzati di formazione, ciò poco importava; e ne isolai parecchi, ciascuno in una goccia, osservando poi cosa avveniva, continuatamente sotto il microscopio. Seguii la formazione ed il distacco dei microgameti, ed osservai, come fenomeno costante, che uno dei due microgameti si coniugava subito coll' *Opercularia* sua zia. Anzi, spesso accadeva che uno non fosse ancora distaccato, mentre l'altro era già in coniugazione; e mi accadde perfino di osservare che tutti e due i microgameti si attaccassero all' *Opercularia*, conducendo avanti la coniugazione, in quella forma anormale corrispondente alla polispermia, che si osserva non di rado nei Vorticellidi. Di fronte a questo fenomeno constante, ripetuto in moltissimi esperimenti, sta l'altro pure costante della mancata coniugazione, unendo microgameti ed Opercularie prese a caso nel liquido. Combinai anche le due cose: un' *Opercularia* con due microgameti non ancora staccati è unita, in una piccola goccia, con un' altra *Opercularia* qualunque; si staccano i microgameti, uno entra in coniugazione colla zia, l'altro seguita a correre per la goccia, restando qualche ora indifferente di fronte alla *Opercularia* straniera. Un' altra *Opercularia* con due microgameti, dà luogo allo stesso fenomeno, di coniugazione, mentre uno dei due microgameti resta a spasso; allora prendo i due microgameti avanzati da questi due esperimenti, e li unisco con una nuova *Opercularia*, presa dalla cultura; non avviene coniugazione. Altre volte unii parecchie Opercularie con parecchi microgameti, sempre senza poter avere coniugazioni. Naturalmente potei produrre senza difficoltà alcuna la coniugazione tra Opercularie che avevano a fianco i microgameti, ed altri microgameti estranei, non loro parenti.

Questi esperimenti sono affatto sicuri; nel corso di un anno li ho ripetuti ogni tanto, sempre collo stesso resultato. È evidente che, se nel pescare una *Opercularia* dalla cultura, si prendesse per l'appunto una che avesse avuto a lato i microgameti, ormai distaccati, allora si dovrebbe produrre la coniugazione; ma questo caso non si

verifica in pratica, sia perchè le Opercularie con microgameti rappresentano anche nei migliori casi, di forte epidemia, una percentuale assai piccola tra le altre, sia perchè quelle che hanno formato microgameti si coniugano subito, prima che questi siano distaccati, essendoci nel liquido dove si svolge l'epidemia numerosi microgameti che girano. Osservo incidentalmente che questo fenomeno ricorda il caso di fiori ed animali ermafroditi, in cui o per una disposizione anatomica, oppure per la maturazione in tempi successivi delle cellule germinali dei due sessi, è impedita o resa quanto mai improbabile la fecondazione tra i germi dello stesso individuo. Qui, nelle Opercularie, tale fatto non è impedito assolutamente, tanto che si può produrre negli esperimenti di isolamento, ma reso poco probabile, nella vita ordinaria della specie.

Vi è dunque una divisione, che possiamo chiamare „sessuale", per la quale da un individuo neutro — incapace di coniugazione — si forma contemporaneamente un maschio (che si riduce in due microgameti) ed una femmina.

Un fatto di tal genere era stato intraveduto da Engelmann nell' *Epistylis*, ma non da altri raccolto, nè da lui dimostrato; egli aveva osservato che nelle grandi colonie di *Epistylis*, le coniugazioni ed i microgameti si formano non in tutta la colonia contemporaneamente, ma prima da un lato; e dallo stesso lato si trovano contemporaneamente le une e gli altri. Queste osservazioni però non dimostrano nulla, perchè la differenza tra un lato e l'altro è manifesta di per sè, dato che in uno solo si formino i microgameti; e dipenderà evidentemente dalle diverse condizioni di alimentazione. Ora, sarebbe molto strano che fossero differenti le condizioni capaci di produrre microgameti, da quelle che ne permettono l'unione coi macrogameti; chè se tali condizioni determinanti debbano essere le stesse, allora è evidente che dallo stesso lato ove si formano microgameti, si debbano trovare anche le coniugazioni e reciprocamente; l'osservazione di Engelmann toglie la possibilità che in *Epistylis* vi siano grossi rami differenziati in sesso maschile e femminile, *in toto*, ma non implica nulla sulla natura particolare e sulla particolare origine di quei determinati individui che entrano in coniugazione. — Più notevole è l'altra osservazione, che le coniugazioni avvengano in individui che già hanno eliminato microgameti. Ma come si può avere tale certezza? Forse non è possibile che si distacchino dalla colonia altri individui, a cui attribuire i posti vuoti? E come

riconoscere in ogni caso nella grossa colonia, che l'individno in coniugazione abbia accanto i rametti vuoti dei microgameti distaccati da lui? Infatti, ENGELMANN stesso esprime il dubbio che il fenomeno non sia costante, ed il BÜTSCHLI, nel dire della coniugazione dei Vorticellidi (Protozoa pag. 1628) nega che sia dimostrato che fungano da macrogameti speciali individui, tranne nel caso di qnelle specie che li hanno morfologicamente riconoscibili; però, agginnge, sembra che nell' *Epistylis* la coniugazione avvenga sempre o solo preferibilmente con quegli individui ecc.:

„Als Makrogonidien funktionieren bei allen Gattungen mit Ausnahme von *Zoothamnium* die gewöhnlichen Individuen. Wenigstens ergaben die seitherigen Beobachtnngen keine Anzeichen, daß nnr bestimmte Individuen normaler Größe hierzn dienen. Dennoch weisen ENGELMANN's Untersuchungen (1876) vielleicht auf etwas derartiges hin. Bei *Epistylis plicatilis* konstatierte er nämlich, daß die Mikrogonidien sich immer oder doch vorzugsweise mit solchen Individuen (Makrogonidien) vereinigten, deren Schwestersprößling durch Teilnng in Mikrogonidien zerfallen war."

Il BÜTSCHLI stesso, che aveva isolato nello stesso anno 1876 individui di *Vorticella nebulifera* nell' atto della gemmazione, non aveva osservato coniugazione trai derivati di questa divisione, probabilmente perchè il suo scopo era diverso, cioè soltanto qnello di distinguere gli stadî della formazione dei microgameti da quelli della coningazione.

Tanto per la storia. Quanto a me, in seguito agli esperimenti fatti, non ritengo possibili eccezioni, non ritengo che si tratti di una vaga preferenza dei microgameti per una certa categoria di individui, ma vedo nella storia della divisione sessuale un fatto che è l'espressione di qualche cosa di molto intimo e molto profondo, e che probabilmente in qualche modo deve avere corrispondenza in moltissimi altri organismi, riguardo alla formazione dei sessi.

Gli esperimenti hanno anche dimostrato la possibilità di coniugazione tra parenti strettissimi. Onde riconoscere se essa decorresse normalmente, conservai alcune delle coniugazioni così ottennte, formando altrettante piccole culture, ove presto si riformarono microgameti e coniugazioni, ed anche tra parenti, al solito, mediante l'isolamento.

4. Partenogenesi dei macrogameti.

D'altra parte si è aperta anche la qnestione se quelle Opercularie che fungono da macrogameti, siano destinate necessariamente

alla coniugazione, oppure possano dividersi come tutte le altre, senza essersi coniugate.

Onde risolvere tale questione, isolai alcune Opercularie che avevano a fianco i due microgameti non ancora staccati, e quando questi si staccarono, li tolsi, lasciando ciascuna *Opercularia* femmina sola in nna goccia. Il giorno seguente la divisione era avvennta in ogni cultura; allora aggiunsi microgameti tolti da altre Opercnlarie, ma non si formò nessuna coniugazione; ritolti i microgameti dopo alcune ore, osservai che in uno dei casi si formarono microgameti di nnovo, alla seconda gcuerazione dall' individuo femmina primitivamente isolato; pochi giorni dopo se ne formarono numerosi in tutte queste piccole culture.

Questo esperimento mostra all' evidenza che l' Opercularia femmina può dividersi normalmente, e che già quando essa è divisa in due ha perduto completamente la sua femminilità, tanto che essa non è più suscettibile di coniugazione; ma più caratteristico ancora in questo senso è il fatto che già dopo la seconda generazione si è potuto un individuo dividere sessualmente; questa è prova chiarissima che la femmina si era di nuovo trasformata in un essere non differenziato sessualmente. Se si voglia interpretare la sna prima divisione come partenogenesi, è però da osservare che si tratta di una partenogenesi *sui generis*; nella quale da una femmina si producono dne ermafroditi, o meglio due neutri, capaci di formare i due sessi al momento opportuno.

La questione analoga per i microgameti, se essi pnre possano, isolati, ricostitnirsi ad individni completi, pareva già a priori che dovesse avere risposta negativa; pure la sottoposi a varie prove, che ebbero appnnto resultato negativo.

Questa partenogenesi dei macrogameti, ricorda un fenomeno analogo riscontrato in altri Protozoi, p. e. dal Pittaluga nella *Laverania*; ma da quel caso differisce, in quanto qui come abbiamo detto, e non in *Laverania*, la divisione toglie al macrogamete la facoltà di essere fecondato; in ciò si può dire che il macrogamete differisce anche dal microgamete della stessa Opercularia stessa, in quanto che, se non è mai stato possibile di osservare nna divisione dei microgameti liberi, il primo prodotto della divisione sessuale si divide, per formare i due microgameti, anzi questi stessi possono andare incontro ad una divisione ulteriore, in rari casi, formando una rosetta di quattro microgameti, che poi si distaccano.

5. Alcuni raffronti.

Qui dobbiamo ricordare alcuni fatti, relativi ad altri Protozoi, nei quali la coniugazione tra stretti parenti torna in ballo; e, evidentemente, se essa sia connessa colla anisogamia, allora il problema della divisione sessuale si mostra come probabilmente risoluto in senso affermativo. Se in alcuni casi l'origine dei gameti che si uniscono è chiaramente dimostrata avvenire da individui diversi, in altri, come nelle Gregarine studiate dal CUÉNOT, che le cose passino in questo modo è ritenuto probabile forse più per l'applicazione al caso singolo di un principio generale, che per una verificazione diretta; non si ha in ogni modo la prova della necessità del fatto.

R. HERTWIG, nell'*Actinosphaerium eichhorni* (99, 1) ha invece dimostrato che normalmente avviene una copulazione tra cellule sorelle (cisti secondarie); questo è però un caso del tutto particolare, che non si avvicina al nostro della *Opercularia*, perchè questa coniugazione dell'*Actinosphaerium* non è l'unica che in esso si produca; l'A. non ritiene inverosimile che animali diversi si copulino, e che dopo questa copulazione provvisoria ne avvenga una definitiva tra sorelle, nei discendenti della coniugazione tra estranei. Siamo dunque in presenza di fenomeni complicati e per il momento incomprensibili nei loro intimi meccanismi, nonostante le lunghe e belle ricerche di R. HERTWIG; ma l'unione sessuale segue in fondo le leggi generali. Non così nelle Desmidiacee (citate da R. HERTWIG), nelle quali DE BARY ritiene verosimile che le cellule che si uniscon per formare la spora duratura, derivino da una stessa madre; e KARSTEN (97) venne per l'*Achnantes brevipes* allo stesso resultato. Recentemente anche LOEWENTHAL descrive in *Basidiobolus lacertae* la copulazione, che avviene tra sorelle; una certa differenza di grandezza, ma non notevole, sembra l'unico differenziamento sessuale riconoscibile.

Questi casi sono da HERTWIG paragonati a quelli di partenogenesi, nei quali, secondo BRAUER 93, l'uovo maturo viene fecondato dal secondo globulo polare. Io però mi permetto di manifestare un dubbio; ed è che, come la partenogenesi non è spesso un fenomeno normale, nè unico anche nelle specie che la presentano, come nell'*Opercularia* la coniugazione tra strettissimi parenti è possibile, e così nel *Chilodon*, ma pur non costituisce la regola, come nell'*Actinosphaerium* è la regola la copulazione tra sorelle, ma non è verosimilmente l'unica che esista nel ciclo vitale di questo organismo, — così anche nei casi sopra citati sia da ricercare se non esista nel ciclo vitale una forma diversa di copulazione, la quale si compia tra

ematossilina Heidenhain, e col metodo della doppia colorazione ai individui di diversa origine, e che venga in certo modo alternata con l'unione sessuale tra sorelle. Quest' ultima forma di unione sessuale, si mostra insomma come possibile, in molti casi, ma costituirebbe l'unico modo possibile solo in pochissimi; e sembra che questa eccezione contraddica alla regola generale, ed allo *scopo* per così dire dell' unione sessuale stessa. Ma di questo discorreremo più avanti.

VI. Opercularia coarctata. I fenomeni minuti della coniugazione.

Il primo punto di collegamento tra gli esperimenti fatti fin qui, ed i minuti processi che vado a descrivere, è stato quello di ricercare se il gamete femminile sia differente o no dalle comuni Opercularie. Di più, lo studio del micronucleo poteva collegarsi in modi imprevedibili a priori con le questioni fino ad ora trattate. E ciò avvenne infatti, come vedremo. Ma ora devo in certo modo rompere la catena dei ragionamenti, per descrivere con ordine i processi citologici.

I metodi di osservazione che ho adoperato sono i seguenti: Osservazione sul vivente, seguendo il processo della coniugazione sopra ad uno stesso individuo. Ciò ho potuto fare mediante le mie camerette umide, ponendo una Opercularia in goccia pendente, durante la coniugazione; avevo prima sparso uno strato sottilissimo di albumina glicerinata sul vetrino, dove ho posato la goccia; così la goccia si è sparsa e la ho resa anche più sottile aspirando un poco di liquido con una pipetta. In tali condizioni ho potuto osservare molte volte i processi minuti, con i più forti obbiettivi ad immersione, dal di sopra. — Osservazione di preparati *in toto*. — Osservazione delle sezioni, colorate coi metodi indicati nei cenni tecnici.

1. Divisione comune, e divisione sessuale.

Cominciando a dire poche parole della divisione sessuale, dirò che non mi è stato possibile riconoscere in essa alcuna differenza dalle ordinarie divisioni, tranne quello che è dovuto alla sua asimmetria. Come cominci la divisione in generale, è qui molto interessante. Se noi osserviamo un macronucleo nelle sezioni all' infuori della divisione, notiamo in esso una grande quantità di corpi rotondeggianti più o meno grandi, che si tingono intensamente coll'

carmino boracico e verde metile sono debolmente verdi — io li ho rappresentati più in chiaro nella Fig. 47. Il micronucleo non lascia distingnere struttura. A nn certo momento accade che la forma generale del macronucleo si altera, divenendo esso bitorzoluto e più grosso; nello stesso tempo i corpi interni si ridncono più piccoli, e perdono in parte la differenziabilità dal resto della sostanza, per mezzo dei colori (Fig. 48). In questo stadio il micronucleo è perfettamente normale. Soltanto più tardi, quando nel macronncleo le modificazioni indicate sono proseguite ancora nello stesso senso, si comincia a vedere il micronucleo allnngato un poco, e differenziato internamente, si da mostrare nn fuso (Fig. 49). Ma la cromatina non si distingue ancora in questo fuso, che non prende verde di metile nè molta ematossilina. Più avanti si differenziano i cromosomi che dalla piastra equatoriale si portano in due masse laterali, rimanendo connessi coi filamenti riunienti (Fig. 1). Intanto anche il macronncleo ha continnato a modificarsi, allnngandosi, e riunendo nuovamente la sostanza cromatica interna in corpicciòli più grandi, che dopo la divisione del micronncleo si scorgono allnngati, in atto di dividersi; dapprima, nelle primissime osservazioni mi era sembrato che questo stadio fosse incompletamente rappresentato nella divisione sessuale; ma invece potei poi trovarne molti casi, di cui ne è rappresentati nelle Fig. 50 e 3; osservando che la 50 rappresenta proprio il principio del fenomeno. Invece la Fig. 51 e la 52 ne rappresentano la fine. Non so come interpretare un nocciolo di sostanza più cromatica che compare nei micronuclei figli a un certo momento; è di durata transitoria (Fig. 51).

A R. HERTWIG — il cni nome ricorre così di frequente in questo scritto! — dobbiamo l'osservazione (88) che il micronucleo comincia a modificarsi nei Parameci, prima del macronucleo. Dobbiamo però confessare che colle mie osservazioni sull' *Opercularia coarctata*, la questione torna di nuovo nn passo indietro. Non abbiamo potuto cogliere un micronucleo manifestamente modificato — inizio della divisione — senza che il macronucleo già lo fosse, e ciò nonostante che il micronucleo sia in questa specie, quando è nel così detto stato di riposo, più lontano dalla divisione che non quello dei Parameci, ove una distinzione tra parte cromatica ed acromatica esiste sempre. Evidentemente, qni come dappertutto, non si possono stabilire leggi generali.

Citiamo anche l'osservazione di STEVENS (03) nella *Boveria subcylindrica*, ove la divisione del macronucleo comincerebbe molto tardivamente, quando il micronucleo già è diviso.

Bisogna però tener conto non del principio della divisione, ma del principio delle modificazioni interne.

Il Fauré-Fremiet (04 1) ha descritto dei complicati processi, nella divisione del macronucleo, quando l'*Opercularia stenostoma* si scinde; evidentemente, quelle masse in cui esso si ridurrebbe, secondo l'A., masse destinate successivamente almeno in parte a distrnggersi, sono fenomeni che si osservano nella coniugazione e nelle divisioni snccessive ad esse, che non hanno ancora consumato tutti i resti dei vecchi macronuclei. Tutto ciò che si sa della divisione degli Infusorî, e la descrizione della divisione nella *Opercularia coarctata*, in base alle mie osservazioni, impediscono affatto di poter credere a questi fenomeni, brevemente descritti dal Fauré-Fremiet, troppo brevemente data la loro stranezza.

Dalla nostra descrizione è anche resultato qnanto sarebbe fuor di luogo — per l'Opercularia, pensare ad nna cariocinesi del macronucleo; a questo proposito ricordiamo soltanto che fino dal 1884 Gruber aveva osservato nel macronucleo in divisione dei ciliati, strie che vengon tagliate per metà; e concludeva che la divisione dei Metazoi, nei Protozoi è più semplice — cosa che oggi assume nn aspetto diverso visto che il micronucleo si mostra a questo rispetto ben più completo del macronucleo. Nell'Opercularia è forse più che negli altri accentuato il fatto che queste strie che si dividono hanno nna disposizione irregolare e non vanno da parte a parte del corpo nncleare, — sepure in molti casi dove le descrizioni fatte suonano altrimenti, non vi è molto da rivedere, e da temere che un concetto qnasi antropomorfico, abbia potuto falsare un poco la verità, tendendo a far assomigliare — quanto era possibile — la divisione del macronncleo, a quella dei nuclei in generale.

Da qnesto dubbio credo però si debbano escludere senz'altro le osservazioni accurate di R. Hertwig sopra a *Spirochona gemmipara*; si tratta però di un Infnsorio ben lontano da qnelli che noi abbiamo studiato!

Concludendo per ciò che si riferisce alla divisione sessuale, possiamo dire che essa decorre come le divisioni ordinarie.

2. Individui neutri e macrogameti.

Se non è possibile trovare caratteri differenziali a proposito della divisione sessuale, non lo è nemmeno a proposito degli individui femminili che ne derivano; essi hanno un aspetto che li distingue

dagli individni ben pasciuti delle culture riccamente nntrite, e ciò si capisce; ma non differiscono in nessun modo visibile dagli individui poco nutriti, non sessualmente differenziati. Ho fatto anche delle misure, per decidere se una differenza quantitativa, nei rapporti delle varie parti, si potesse scoprire. E riporto una tabella esprimente i resnltati ottenuti.

Larghezza in micron, del				Larghezza in micron, del			
macronucleo	micronucleo	corpo cellul.		macronucleo	micronucleo	corpo cellul.	micronuclei maschili
3,4—4,6	2,6	24		2,9—4,6	3,4	25	3,4
5,7—3,4	3,1	40		2,9—3,4	3,1	25	2,9
2,9—6,9	4	33		3,4—4,6	3,7	29	3,7
4,6—6,3	2,9	40		3,4—4,6	3,6	27	3,6
4—5,7	3,4	29		2,9—4,0	3,8	27	3,8
4,6—5,7	3,4	31		3,1—3,4	3,1	26	3,4
4—5,8	2,9	35	sorelle	4—6	2,9	29	2,9
2,3—5,7	2,6	26		2,9—4	3,1	27	3,1
4—5	3,4	27		2,9—4,6	3,1	33	3,4
4—6,7	3,4	25		2,9—4	2,9	27	3,1
3,4—5,7	3,4	27		3—4	2,9	24	3,4
4,6—5,4	3,1	43		3,4—4	3,1	31	3,4
3,7—4,6	3	26		2,9—4	2,9	29	3,4
3,4—4,6	2,9	24		3,4—4,6	3,7	29	3,7
3,4—4	2,9	26		4—4,6	2,9	27	2,9
4,6—5,7	3,4	29	sorelle	2,9—4,6	3,4	31	4
4,6—5,7	2,9	27		2,9—4	3,4	31	3,1
4,4—4,8	2,9	27		2,6—4	3,4	31	3,4
4,6—6,9	3,7	33		4—4,6	3,4	25	3,4
4,6—5,7	3,4	38		3,4—4,6	3,7	29	3,1
4—4,6	3,7	26		3,4—5,7	4	29	
3,4—5,7	3,7	25		3,3—4	3,4	29	
4,6—5,7	2,6	38		3,4—4	3,4	26	
4,6—6,3	3,4	39					
4,6—6,9	2,6	38					
8,3—4	3,4	25	sorelle	3,4—5,1	3	29	3,1 3,4
3,4—4,6	3,1	26		2,9—4,6	3,4	31	3,2 3,4
2,9—4,6	2,9	31		3,4—4,6	3	27	2,3 2,5
2,9—4,6	2,3	26		3,3—4	3,4	29	2,6 2,8
4—4,6	3,1	31		4—6	3,4	33	2,9 3,4
4,6—5,7	3,1	29	sorelle	3,4—4,6	4	35	3,2 3,4
3,4—4,6	2,9	29		3,5—4,5	3,4	29	2,9 3,4
5,7—6,9	4	43					
4,4—6	3,1	33	sorelle				
3,4—5	2,9	31		2,9—3,4	3,1	25	?
4—6	3,1	31		3,4	2,9	27	2,9
4—5,7	3,1	29		3,1—4,6	3,7	27	3,4
4,6—5,1	3,4	29					
4—5,7	3	27					

Resulta assai evidente la maggior grandezza del macronucleo negli individui comuni, e ciò indipendentemente dal fatto che essi sono *in toto* più grandi; la grossezza del macronucleo nei macrogameti arriva a 4—4½ micron all' incirca, negli individui comuni è di 4 micron in uno dei casi, mentre in nessun altro caso è minore di 4½, e per lo più è assai maggiore. Analogamente nei punti più stretti arriva circa a 3 micron nei macrogameti, mentre negli individui comuni è quasi sempre assai maggiore. Quanto al micronucleo, è difficile dire quale differenza vi sia tra le due categorie di individui, giacchè le differenze individuali sono maggiori assai di quelle riscontrabili tra una categoria e l' altra. Se però si confronta il diametro del micronucleo con quello di tutto il corpo cellulare, allora ne risalta una piccola differenza, nel senso che il micronucleo è relativamente più grande nei macrogameti che negli individui neutri. Ciò si deve però più alla diminuzione della grandezza del corpo, che all' aumento della grandezza sua. Non ho fatto medie di questi numeri, essendo essi troppo differenti tra loro, per permettere che le medie abbiano un significato preciso; ma questa piccola differenza resulta, dando un' occhiata alla tabella, assai chiara. Infatti, mentre il corpo cellulare dei macrogameti supera di rado e di poco i 30 micron di diametro, quello dei neutri è per lo più notevolmente più grosso, senza una corrispondente variazione del micronucleo.

Il significato di questi fatti è evidentemente molto maggiore in senso negativo che in senso positivo. Sappiamo infatti che la divisione sessuale si produce sotto l' influenza del digiuno, vale a dire in condizioni che riducono il volume generale dell' *Opercularia*, indipendentemente dalla sua differenziazione in macrogamete. Ed anche il macronucleo è ordinariamente molto più grosso nelle Opercularie ben nutrite che in quelle a digiuno; ora, sebbene i numeri riferiti nella tabella, perchè abbiano un maggior valore, siano tolti tutti da uno stesso preparato, è verosimile che le condizioni non siano state le stesse in tutti gli individui, ciò che è dimostrato dal fatto che alcuni, e non tutti, si sono sessualmento divisi; in questi ultimi verosimilmente l' influenza del digiuno si deve essere fatta maggiormente sentire, onde dobbiamo attribuire le piccole differenze osservate più a questo fatto che ad una eventuale connessione colla natura sessualmente differenziata dei macrogameti. Di fronte alla netta differenza fisiologica, abbiamo dunque una completa assenza di caratteri morfologici distintivi, tra macrogameti e individui neutri.

Da ciò passiamo allo studio della coniugazione.

3. Prima divisione, nel microgamete.

Quando il microgamete si attacca al macrogamete, in questo non si possono ancora scorgere differenze dagli individui normali; i suoi nuclei presentano l'abituale struttnra. Vediamo ciò nella Fig. 3. Nel microgamete cominciano i primi fenomeni di modificazione, e consistono dapprima in uno scurimento del micronucleo (nei preparati all'ematossilina ferrica). Si cominciano a differenziare delle parti cromatiche (Fig. 53), ma procedendo oltre il fenomeno, tutto il micronncleo si tinge scuramente. Due stadî successivi della divisione sono rappresentati nelle Figg. 4 e 5, nè esiste alcun accrescimento del micronucleo, prima che si formi il fuso cariocinetico. Questa formazione deve ben avvenire per un orientamento della sostanza acromatica, mentre la sostanza cromatica che aumenta tende a portarsi verso il centro; la Fig. 53 rappresenta uno stadio preparatorio di questa formazione; gli stadî immediatamente successivi son piuttosto difficili a esaminare, per la intensa colorabilità generale del micronucleo. Separatisi i cromosomi e portatisi ai poli del fuso (Fig. 5), si compie rapidamente la divisione, sì da aversi due micronuclei nel microgamete, ed nno nel macrogamete (Fig. 6 e 54).

Questa prima divisione è dunque simile alle comuni divisioni del micronucleo.

4. 1ª divisione di maturazione.

Si può dire che appena ora comincia il macrogamete a modificarsi, e specialmente il macronucleo, in cui si palesa una certa difficoltà alla colorazione; ciò si verifica sia nei preparati *in toto* al carmino e verde metile, sia nelle sezioni trattate col metodo HEIDENHAIN. La Fig. 54 mostra la cosa chiaramente, e mostra anche che la forma del macronucleo comincia ad alterarsi. Nella Fig. 6 si vedono invece i corpi cromatici del macronucleo allungati, ciò che non si osserva nella Fig. 54, la quale è probabilmente tolta da uno stadio di pochissimo precedente. Del resto le cose non sono del tutto chiare a questo riguardo, giacchè anche in uno stadio palesemente successivo (Fig. 56—57) pnò capitare che l'allungamento dei corpi cromatici non sia palese. Evidentemente non tutte le volte i processi si seguono colle stesso ordine preciso. Vediamo ora il micronucleo del macrogamete leggermente modificato nella sua colorabilità (Fig. 55) o leggermente allungato (Fig. 7), senza che nei due micronuclei del microgamete si possan ancora riscontrare le stesse modi-

ficazioni. Queste sopragginngono però poco dopo. Infatti vediamo nella Fig. 56 la presenza di parti cromatiche, o per lo meno discretamente cromatiche, tanto nell' nnico micronncleo del macrogamete, quanto nei dne del microgamete. Però anche qui vi è nna piccola differenza, in quanto nel macrogamete il micronucleo ha già nna certa struttura a linee parallele, che può considerarsi come il primo abbozzo del fuso (di quale fuso, or ora vedremo). Tale struttura non è affatto riconoscibile nel microgamete. Per ciò che riguarda lo spazio perinucleare (sempre a proposito dei micronuclei), possiamo dire che esso è cresciuto assai a qnesto stadio, e specialmente nel macrogamete. Si passa poi ad nn momento in cui tutti e tre i micronnclei hanno nna struttura tipicamente a fuso, come mostrano le Figg. 8, 9, 58. In quest' ultima è da notare che quello del macrogamete non è per nulla più corto degli altri due; esso si presenta tale nella figura, perchè era orientato diversamente dagli altri, sì da apparire di scorcio; credo però fosse più lungo. È da notare che in qnesto stadio la sostanza del micronucleo si tinge assai omogeneamente in rosa, nella doppia colorazione al carmino boracico e verde di metile, e rimane nei preparati all' ematossilina ferrica di qnel colore giallastro che è proprio del mordente; in altre parole, non esiste in qnesto stadio cromatina — definita la cromatina come una sostanza che si tinge con determinati colori. Si ha dunque a qnesto proposito nn ritorno indietro, rispetto a qnel momento in cui cominciavano ad apparire modificazioni nel micronucleo; esse si palesavano appunto per la maggior parte colla comparsa di nn poco di cromatina. Le modificazioni che ora subiscono questi fusi acromatici sono veramente straordinarie. Si trova una grande qnantità di Opercularie che mostrano stadî del loro progressivo allungamento; con esso va d' accordo un progressivo assottigliamento, ed un raccogliersi delle singole fibre, che, ravviciuandosi sempre più, finiscono per non esser più visibili. Nelle Fig. 61 e 63 sono specialmente visibili queste cose. L' allungamento è notevole specialmente nel micronucleo del macrogamete. Il limite massimo di questo fenomeno è figurato nel suo insieme nella Fig. 11. Qualche volta, ma non sempre, si riesce a distinguere le fibre del fuso anche in questo stadio, come mostra la Fig. 63. È nettissimo il fatto che lo spazio perinucleare è interrotto ai poli opposti del fuso. Anzi qualche volta, come nel caso della Fig. 61, si ha l' impressione che il fuso allungatissimo si seguiti direttamente coi filamenti del citoplasma. Ho assai studiato tale questione, ma non son però riuscito a darne nna risposta sicura, e ciò si comprenderà, data la delicatezza

delle strutture. Mentre da un lato si può seguire con sicurezza il progressivo allungamento del fuso come abbiamo descritto, si trovano anche forme, quali sono rappresentate nella Fig. 64 e segg., nelle qnali il fuso non è completamente regolare, o contiene specialmente agli estremi nn poco di sostanza fortemente cromatica. Mi trovai dapprima imbarazzato nel decifrare qnesti strani aspetti, e fu specialmente il macronncleo che mi servì a stabilire con sicnrezza la successione degli stadî; esso infatti, come vedremo nella sua descrizione, si presenta in questi nltimi casi citati, nettamente più trasformato che nei precedentemente descritti; ed avendo io avuto modo di osservare moltissimi di questi stadî, che si incontrano assai faciluente dove sono coniugazioni, ed avendo trovato questo fatto costantemente, devo concluderne che non resta dubbio sull'ordine degli stadî stessi. Ed ora ecco di che cosa più particolarmente si tratta. Alle estremità del fnso allungatissimo — quando nelle figure il fatto è rappresentato ad nna estramità soltanto, ciò si deve al fatto che esse son tolte da sezioni — alle estremità del fuso compare in forma di gocce minutissime, la sostanza cromatica (Fig. 66). Talora il fuso non ha lo stesso aspetto ai due estremi, essendo ad uno appuntato, all'aluro nn poco sfrangiato (Fig. 64, 65). La sostanza cromatica si può seguire per stadî nel suo aumento quantitativo, e si può anche riconoscere come dapprima appaiano dei granelli nn po' più cromatici del resto, ma pur sempre poco cromatici (Fig. 64, microg.). Queste varie forme non credo, dati gli aspetti assai variabili nei particolari che possono assumere, che siano stadî successivi percorsi sicuramente da un sol micronncleo; credo piuttosto che piccole differenze possano esistere nei varî micronuclei quanto al loro svilnppo progressivo, piccole però, giacchè sicuramente tutti arrivano ad uno stadio di fuso allungatissimo acromatico, e poi a quello raffigurato dalla Fig. 68, in cui contengono una massa proporzionatamente notevole di cromatina ai due estremi. Si osservi l'aspetto caratteristico degli spazî perinucleari a questo stadio; essi seguono ora la forma del micronucleo in tal modo, che ai due estremi, dove esso è un poco più rigonfiato, sono molto più larghi che nel mezzo. In questo periodo si può ormai escludere quel fenomeno sopra accennato, della continuità della sostanza micronucleare, agli estremi del fuso, col citoplasma. Tutto ormai farebbe sospettare che il micronucleo dovesse dividersi in due porzioni, in due micronuclei figli; abbiamo avuto il fuso, abbiamo ora un piccolo strozzamento mediauo, notevole specialmente quanto agli spazî perinucleari. Ed invece, sicuramente no! Le cose tornano in un certo

modo indietro, e tutto è da rifare. Nessuno stadio è mai possibile rintracciare il quale permetta di concludere che i due estremi del micronucleo a questo punto debbano allontanarsi e dividersi; e ne sono sicurissimo avendo osservato centinaia di individui in questi stadî. Nè d'altra parte è possibile in alcun modo intercalare tra due qualsiasi degli stadî rappresentati dalle figure, tutte quelle complesse modificazioni di forma, con belle strutture cromatiche (cromosomi), delle quali ora andiamo a parlare. Di più, l'osservazione sul vivente dimostra che lo stadio di allungamento è seguito da un raccorciamento, prima della divisione in due parti. È possibile ricostruire il processo per cui da questo fuso allungatissimo si torna ad una forma sferica. Abbiamo intanto nella Fig. 69 un micronucleo assai allungato, con un poco di cromatina ad un estremo (l'altro non ora contenuto nella sezione) ed un poco anche nel mezzo. Abbiamo nella Fig. 70 dei micronuclei che sono allungati, ma non a fuso, e, nonostante il loro spessore discretamente grande, non contengon fibre distinguibili. Abbiamo nella Fig. 71 dei corpi con grande spazio perinucleare, senza cromatina, con struttura indefinibile; si osservi che nè questi stadî sono interponibili trai precedenti, nè il macronucleo — della cui descrizione particolare tra breve — presenta più quelle forme di divisione che erano caratteristiche degli stadî precedenti. Dobbiamo dunque concludere che la cromatina sparisce, e che la forma torna ad avvicinarsi alla sferica. Anche qui non possiamo ritenere che le cose procedano esattamente in modo uguale in tutti i micronuclei; per quel che riguarda la sparizione della sostanza cromatica, e la variazione di forma, devono esservi delle differenze cronologiche, in questo senso, che talvolta l'uno dei fenomeni precede di un poco l'altro, tal'altra succede l'opposto. Ora prego il lettore di dare in primo luogo uno sguardo d'insieme alle segnenti figure, fino alla 78. Una forma quasi sferica ed una grande radezza della sostanza visibile del micronucleo, sono le caratteristiche di alcune di queste figure. Dei granuli poco cromatici, ma pur nettameute visibili, sono sparsi in mezzo ad un reticolo assai fine, occupando i punti di incontro delle sue maglie (per lo più). La cosa è specialmente visibile nella Fig. 76. Se si osserva la Fig. 74 che poco differisce dalla 71, e la 75 che pur poco differisce dalla 74, alla quale è uguale per la distribuzione generale delle parti, ma da cui si distacca perchè la sostanza ammassata in un punto nella 74, è sostituita da un gruppo di granuli nella 75 — ci si convincerà che dallo stadio della Fig. 71 si passa a quello della Fig. 76, senza che nella descrizione vi siano delle lacune, o che si

presentino delle difficoltà d' interpretazione. Io poi posso dire che per l' osservazione diretta di moltissime coniugazioni ho rintracciato stadî che assomigliano a quelli figurati, senza essere ad essi completamente uguali, e che tutti concorrono a stabilire lo svolgimento del fenomeno nel modo anzidetto. Quanto alla Fig. 73, essa rappresenta uno stadio simile a quello della Fig. 71, che ne differisce soltanto perchè la cromatina è in parte rimasta nell' interno della massa micronucleare. Per aggiunger fede a questa descrizione, per quanto riguarda questa sparizione della colorabilità coi colori caratteristicamente proprî della cromatina nucleare, dirò che stadî i quali fanno pensare alla mancanza di un rigoroso accordo cronologico tra la variazione di forma — dallo stadio allungato alla forma sferica — e la diminuzione di cromaticità, si trovano in uno stesso preparato, e sia che questo sia molto, sia che sia piuttosto scarsamente colorato coll' ematossilina ferrica. Si trovano, nei due casi, aspetti come quelli della Fig. 73 e della 74, i quali dunque dimostrano che questa diminuzione di colorabilità può avvenire più o meno presto, in confronto colla variazione di forma.

Assistiamo ora ad un progressivo assestamento dei granuli *rari nantes* nei micronuclei della Fig. 76, e del reticolo su cui son disposti. Questo assestamento porta finalmente alla formazione di un bel fuso cariocinetico con cromosomi al centro, e nettissima distinzione tra sostanza acromatica e cromatica. Le Fig. 77 e 78 mostrano il passaggio, e la Fig. 79 mostra un bel fuso formato. Non oserei dire che i cromosomi quali appaiono nello stadio del fuso appena formato, Fig. 79, costituiscano nell' insieme una massa di sostanza minore che non i granuli delle Fig. 76 e 77; non se ne ha l' impressione per nulla nell' esame dei preparati. Invece la differenza di comportamento rispetto all' ematossilina col metodo HEIDENHAIN è nettissima. Si deve dunque concludere, che la colorabilità della sostanza che forma i cromosomi aumenta dallo stadio precedente a questo, per variazoni delle sue proprietà chimiche, non perchè essa si raccolga di più. Quanto allo spazio perinucleare, assistiamo ad un fatto curioso. Spesso, anche negli stadî precedenti, era possibile riconoscere in esso qualche fibra congiungente il micronucleo al citoplasma; quando poi dallo stadio di raccoglimento — dopo l' allungamento — la sostanza del micronucleo si divide in granuli, essa si sparge anche in quello che prima era spazio così detto perinucleare, dove ormai si vede distintamente estendersi il reticolo. Accade insomma un' invasione di questo spazio, per opera delle strutture nucleari, come è chiaramente visibile nella Fig. 76.

nella quale non esiste nessuna traccia di spazio circostante alle strutture — reticolo e granuli — del micronucleo. E così nella Fig. 78, nella quale il fuso è quasi compiuto. Poi, come si vede nelle Fig. segg., un piccolo spazio si va riformando, il quale però non acquisterà importanza altro che più tardi, quando le strutture nucleari, nello spartirsi, si raccoglieranno di nuovo in uno spazio più ristretto.

Tutto ciò che succede dal momento del massimo allungamento a quello in cui vi è il fuso cariocinetico, è malagevole a seguirsi nei preparati *in toto*, e perciò a queste modificazioni corrispondono nelle Fig. pochi stadî. Si osservi però la Fig. 12, la quale corrisponde su per giù alla 71 o 73, ed è buona conferma degli aspetti che in esse abbiamo descritti.

Ormai che abbiamo descritto questi processi, possiamo distinguere con due nomi diversi il vero fuso cariocinetico, da quello che appare nelle prime modificazioni del micronucleo; e chiameremo il primo, fuso primario, il secondo, fuso secondario.

Il fuso insomma si forma sempre nell' interno del nucleo, come per lo più nei Protozoi; sappiamo infatti che solo raramente si hanno fusi di origine extranucleari, come quello descritto da Grassi e Foà (04) nelle Joenie.

La struttura delle fibre è la usuale, ciò che abbiamo esaminato attentamente ricordando che talora — come caso eccezionale è ben vero — esse si mostrano granulose (*Actinosphaerium*, Hertwig 84).

Il primo apparire del fuso secondario, ci offre come mostrano le Figg. 13 e 79, la caratteristica di un allungamento nella direzione perpendicolare a quella delle fibre. Ma deve essere molto rapida quella modificazione di forma che conduce il fuso ad essere allungato per l' altro verso (Fig. 14 e 80) giacchè è possibile trovare i due micronuclei del microgamete che presentino uno l' allungamento per un verso, l' altro per l' altro. E per contro in tutti gli stadî della divisione, essi vanno molto d' accordo differendo solo di pochissimo l' uno dall' altro. Come anzi tale differenza trai due micronuclei sia stata utilizzata (a proposito dell' individuo disegnato nella Fig. 13), per alcune misure d' orientazione, cfr. in seguito.

Anche gli stadî della Fig. 13 e 79 differiscono un poco tra loro, in quanto nella Fig. 13 le fibre sono divergenti, anzichè convergere ai poli del fuso. Una convergenza perfetta manca spesso nei primi stadî, e la Fig. 13 ci ricorda la Fig. 78; si deve dunque considerarla come rappresentante uno stadio precedente a quello della Fig. 79, e questo come di pochissimo precedente quello della Fig. 80.

La mancanza dei centrosomi si palesa in questa riunione tardiva

delle fibre fusoriali in un punto polare; ricordiamo che spesso casi di non convergenza verso due poli si osservano in analoghe condizioni, come per esempio in *Aulachanta scolymantha* (BORGERT, KARAWAIEW), nella quale la divisione nucleare si compie essendo i cromosomi trasportati verso due rette parallele, anzichè verso due punti; rette le quali si incurvano — dopo la separazione delle due masse di cromosomi — producendo così un raccoglimento di essi.

Quanto al mutamento del rapporto trai diametri del fuso, questo ci ricorda quanto ha osservato SCHEWIAKOFF (1887) nell' *Euglypha*, dove come qui il fuso è dapprima più largo che lungo, per acquistare secondariamente la forma usuale.

Divenuto ormai il fuso convergente ai due poli, i cromosomi si allontanano dal piano equatoriale, rimanendo in connessione per mezzo dei filamenti riunenti. La Fig. 15 e la 81, di poco seguente come stadio, mostrano la cosa. Come avvenga la divisione dei cromosomi è impossibile determinare, data la loro piccolezza e la loro reciproca vicinanza.

Si passa ora per uno stadio in cui sembra che di nuovo la cromaticità sia un poco diminuita, come mostra la Fig. 82. E finalmente cominciano le due masse così allontanatesi, a separarsi. Qui siamo in un periodo che mal si decifrerebbe colle sole sezioni; daremo prima perciò la descrizione di quello che avviene, in base all' osservazione dei preparati *in toto*, completando poi le osservazioni, per i particolari più minuti, collo studio delle sezioni. I filamenti riunenti (Fig. 16) si mostrano paralleli, assai esattamente, in uno stadio che si può ritenere di pochissimo seguente quello della Fig. 82, nella quale erano ancora più allontanati nel mezzo. Poi invece si avvicinano cominciando la cosa da uno o due punti. E nella Fig. 16 ora citata, si vede come sia il micronucleo del macrogamete ad uno stadio leggermente più avanzato di quelli del microgamete. Procedendo oltre il restringimento del fascio di filamenti, essi vengono a formare una specie di cordone, da cui, in vicinanza delle masse nucleari, partono filamenti; è possibile che laddove si vede un cordone, si tratti dei filamenti stessi semplicemente addossati tra loro. Questo stadio è ben visibile nella Fig. 17, in una della coppie dei micronuclei del microgamete. Nell' altra coppia il cordone riunente non è rappresentato, perchè, per l' orientazione sotto cui si presentava, non si prestava bene al disegno. Ma esisteva come nella coppia in cui è disegnato. La coppia di micronuclei del macrogamete, è invece ad uno stadio leggermente più avanzato. Esistono due tratti di cordone, ma esso è rotto in un punto. Son

dunque rimasti due nuclei, che hanno una specie di prolungamento; è notevole il parallelismo di questi due prolungamenti. Le Figure di simili stadi, che abbiamo tolte dalle sezioni, offrono l'inconveniente che non mostrano le cose nel loro insieme. Ciò dipende dal fatto che una coppia di nuclei è quasi impossibile a trovarsi su un'unica sezione; ed è altresì molto difficile a rintracciarsi, nelle sezioni in serie, quel cordone riunente, acromatico, così lungo e curvo. Cosicchè, non potendo facilmente acquistare la certezza di non ingannarmi in una ricostruzione di questo genere, ho preferito tralasciarla, considerando che la cosa appare nettamente, molto chiara, nelle Figure tolte dai preparati *in toto*. Quanto ai più minuti particolari, osserviamo nella Fig. 83*a* un micronucleo — non ancora distaccato dal fratello gemello — in cui la massa cromatica è ormai addensata a mezzaluna, dalla quale partono i filamenti riunenti. Una colorazione di fondo non esiste in queste massa, formata di granuli cromatici; essa è rappresentata nelle figure, soltanto perchè sembra che vi sia quando si guarda tenendo fissa la vita micrometrica. La Fig. 83*b* mostra l'aspetto di un nucleo nello stesso stadio, visto però dal di sopra. Nella Fig. 34 vi è una coppia di micronuclei nel microgamete, nella quale le cose passano all'incirca come nella Fig. precedente, ed un'altra in cui si vede che lo stadio è lo stesso, pur non potendosi ben decifrare la struttura, a causa della orientazione sfavorevole. La figura è però un'interessante veduta d'insieme, perchè mostra che anche qui nel macrogamete le cose sono già un poco più avanti; il micronucleo che solo è in tale orientazione da potersi esaminare con frutto, mostra lo stesso prolungamento a cordone, che abbiamo osservato nei preparati *in toto*. È caratteristico il fatto che le fibre son qui poco visibili, ormai, sì che interpreto questo stadio, e quello della Fig. 85 come un poco seguenti a quello della Fig. 17; cosicchè nel caso della Fig. 84 la precedenza di stadio per parte del macrogamete è anche più notevole. Quanto alla Fig. 85, essa mostra un'altra particolarità, che io veramente ho disegnato per scrupolo di coscienza, non osando darle nessuna importanza; si tratta di alcuni corpicciuoli bacilliformi, acromatici, che si trovano nel cono dove prima erano i filamenti riunienti. Questi corpi, che, come dicevo, sono acromatici, ossia non si tingono coll'ematossilina nel metodo Heidenhain, li ho riscontrati alcune volte, e potrebbero essere un prodotto delle fibre del fuso secondario, che a questo stadio scompaiono. Un qualche cosa di poco diverso, ma che parlerebbe nello stesso senso — nel senso cioè di una permanenza della sostanza

delle fibre del fuso secondario, nei due nuclei figli — si osserva anche nella Fig. 86 A dove si vedono due corpi riuniti ad u, nella massa del micronucleo, e che per forma e colorabilità ricordano gli altri ricordati. Non voglio però dare valore a queste osservazioni, soltanto le ho riportate, come possibile indicazione di un fenomeno da ricercarsi su un materiale che sia per avventura più favorevole per la cosa in questione. Osservando la Fig. 85 B, si vede anche che i granuli cromatici non sono più a questo stadio tutti intensamente cromatici. E si arriva con questo a quello stadio che è rappresentato nella Fig. 87, dove micronuclei quasi al termine dei fenomeni cariocinetici, mostrano ancora un allungamento da una parte, non più granuli intensamente cromatici; anzi essi hanno ormai un minor numero di granuli nettamente visibili, i quali si trovano in una sostanza di apparenza omogenea, e ribelle all'ematossilina di HEIDENHAIN. È molto difficile trovare stadi nei quali i quattro micronuclei del microgamete ed i due del macrogamete siano di aspetto più omogeneo di quelli rappresentati nell' ultima figura descritta. Io ne ho veduti talora, ma non li ho disegnati sul momento, e dopo non ne ho trovati più. Un periodo di riposo, dalla divisione cariocinetica descritta a quella seguente, non esiste affatto, i micronuclei, dall' avere un aspetto quasi omogeneo, ma con granuli visibili, passano subito alla formazione della nuova mitosi.

L'andamento della prima divisione di maturazione si può dunque così sintetizzare: Si forma nel micronucleo un fuso acromatico (primario), il quale subisce un cospicuo allungamento; al termine di questo, comincia a comparire sostanza cromatica, nelle punte del fuso, e poi per gran parte di esso, che intanto perde la forma tipica a fuso, non contiene più fibre distinte, e si ingrossa agli estremi; lo spazio perinucleare appare a forma di 8. Poi segue un raccorciamento, ed un ritorno alla forma sferica, con granuli sparsi — poco cromatici — su un reticolo acromatico. Questo si assesta a fuso (secondario), mentre i granuli si riuniscono in cromosomi intensamente cromatici. Essi si separano, i filamenti riunenti — molto lunghi — si uniscono in un cordone riunente, che si incurva, fino a formarsi un semicerchio completo; allora il cordone si spezza, i suoi resti si retraggono, le due masse così separate perdono le cromaticità e le caratteristiche strutturali, e formano due nuclei simili agli ordinari micronuclei. Le fibre del fuso secondario sono dapprincipio divergenti, poi convergono ai poli, privi di centrosomi.

5. 2ª divisione di maturazione.

Su questa saremo assai più brevi che snlla precedente, perchè i fenomeni che in essa si osservano sono dello stesso genere, solo i processi sono alquanto accorciati. Ci possiamo perciò riferire a quanto abbiamo sopra imparato a conoscere, ciò che ci facilita l' intelligenza di quanto accade ora, e ci evita la ripetizione di una lunga — ed inntile — descrizione. Questa seconda divisione procede assai più rapidamente che la prima, e ne segue che nei preparati molto più rari sono gli stadî che non in quella. Ciò non impedisce di ricostruirne il processo, e specialmente di constatare che anche in questa esiste lo stadio caratteristico dell' allungamento, come la Fig. 18 mostra chiaramente. Nelle sezioni mal si può trovare individui in questo stadio che si prestino ad esser raffigurati, perchè i numerosi micronuclei, allungati in piani differenti e anche spesso curvi, compaiono soltanto a pezzetti nelle singole sezioni. La struttura di questi corpi non differisce sostanzialmente da quella dei corrispondenti della divisione precedente, solo la cromaticità finisce coll' essere più diffusa, invadendo anche l' interna massa micronucleare. La Fig. 88 mostra la formazione del fuso secondario, dopo lo stadio del raccoglimento, e presenta la caratteristica delle fibre divergenti, come nella divisione precedente, disposizione che si trasforma al solito, poco dopo, come mostrano le Figg. 19, 20 e 88. Uno stadio molto interessante è quello disegnato nella Fig. 21, nella qnale i nuclei del macrogamete, già sono ciascuno diviso in due masse cromatiche, i cromosomi son già disposti ai due poli dell' ex-fuso secondario, e connessi coi filamenti rinnenti. I 4 micronuclei del microgamete sono invece in stadio più precoce; veramente ho detto i 4, ma avrei dovnto dire dne di essi, non perchè gli altri due non lo siano, ma perchè soltanto due sono talmente orientati da potersi ben distingnere la loro struttura; nna esatta osservazione della cosa mi ha però convinto che anche i dne orientati quasi verticalmente, non son giunti allo stadio in cui sono quelli del macrogamete. Si vede, nei due qnasi orizzontali, che i cromosomi si trovano ancora verso il centro del fuso, ma non più connessi a formare uua piastra equatoriale; evidentemente essi son colti proprio nel momento in cui stanno separandosi per avvicinarsi ai poli del fuso; ciò mostra al solito un leggiero anticipo nei processi che si svolgono nel macrogamete. Il fatto di questa discordanza mostra anche quanto siano più rapidi i fenomeni di questa divisione, al confronto della precedente; infatti, p. e. nella Fig. 15 si aveva uno stadio nel quale i

cromosomi sono, sia nelle cariodieresi del microgamete che in quella del macrogamete, agli estremi dela Fig. mitotica, ma non ancora raccolti in una forma a semiluna; invece nella Fig. 21, nel macrogamete già è avvenuto il raccoglimento a mezza luna, e nel microgamete ancora non son del tutto separati i cromosomi.

Compiutasi la separazione dei nuclei figli, questa volta segue uno stadio di riposo ben netto, nel quale la struttura del micronucleo ha quello stesso aspetto quasi omogeneo che nei micronuclei delle Opercolarie comuni. Rappresenta un momento di poco precedente a questo la Fig. 90, ove ancora è considerevole lo spazio perinucleare, e la forma dei singoli micronuclei non è del tutto sferica. Le Figg. 22 e 91 corrispondono al minimo grado di struttura interna dei micronuclei.

Vogliamo ora fare una osservazione sopra al curioso fenomeno che si presenta nelle divisioni di maturazione.

Il fatto che in queste divisioni, dopo l'allungamento e dopo che il micronucleo è ingrossato agli estremi e lo spazio perinucleare fortemente ad 8, si torna a rimescolare ogni cosa per cominciare un'altra volta i processi riordinativi e compiere la spartizione in due, ricorda un poco la cariodieresi dell' *Amoeba limax* (VAHLKAMPF), nella quale la sostanza nucleare cromatica si divide in due grandi masse, che, già distanziate, sembrerebbe dovessero distaccarsi e formar due nuovi nuclei. Invece allora cominciano a formarsi i cromosomi, le masse diminuiscono di grandezza, insomma tutto è da rifare, e procede da qui in là su per giù come di solito.

Il nostro caso, e questo dell' *Amoeba limax* ugualmente, ci suggerisce una considerazione. Quando siamo nello stadio ad 8, dopo l'allungamento, nonostante l'apparente simmetria delle due parti, nella lunga figura, dobbiamo ritenere che nell'intima struttura non esista un assestamento simmetrico, rispetto al piano trasverso mediano. Questa intima simmetria si stabilirà soltanto dopo, coll' apparizione dei cromosomi; sì che, quello che a noi appare un ritorno indietro, il ritorno alla forma sferica, non dobbiamo considerarlo tale: se il nucleo si dividesse dopo lo stadio dell' allungamento, molto probabilmente le due metà non avrebbero proprietà uguali. Come poi questo intimo assestamento in due parti simmetriche si compia, e perchè nelle divisioni di maturazione richieda processi più complicati, naturalmente non possiamo indovinarlo.

La conclusione riguardante la seconda divisione di maturazione è molto semplice:

Qnesta seconda divisione di maturazione è simile alla prima, nella successione degli stadî, soltanto si passa più sinteticamente dal fuso primario allungato e cromaticizzato, al fnso secondario. Come tra poco vedremo, è in qnesta che avviene la riduzione numerica dei cromosomi.

6. Ultima divisione, prima della fusione nucleare.

Ecco adesso che incominciano per la prima volta a manifestarsi delle differenze trai varî discendenti del micronucleo originario. Tutti meno nno nel microgamete, ed altrettanto nel macrogamete, cominciano a differenziare nel loro interno dei corpicciuoli nei qnali anmenta la colorabilità; ciò è visibile nella Fig. 92, e nella 99 e segg., nelle quali ormai tutta la sostanza di questi micronuclei è intensamente colorabile coll' ematossilina Heidenhain. L' nnico micronucleo di ciascun gamete, che si trasforma diversamente, comincia ad allungarsi e mostrare insieme nna struttura granulosa ben distinta (Fig. 93) alla quale struttura succede la differenziazione di fibre acromatiche, senza contemporaneo sviluppo di cromatina (fuso primario; Fig. 94 e 95). Poco dopo appare qualche corpo colorabile, ed in questo mentre i due fnsi si orientano in un modo particolare, come è ben visibile nella Fig. 96 e meglio nella 24. — Qualche volta anche qui si sospetta che il processo della comparsa di sostanza cromatica ed il differenziamento delle fibre non sia in tutti i casi cronologicamente ordinato nella stessa maniera. Ma, sorvolando su questa questione di dettaglio, mi preme invece di rilevare il fatto che, sebbene qui si formi un bel fnso primario, differenziatosi nel micronucleo nello stesso modo che il fuso primario della prima divisione ampiamente descritta sopra, si passa direttamente dal fuso primario al secondario, ossia da aspetti paragonabili al primario ed al secondario di quella divisione; un solo fuso si forma in qnesta che ora siamo intenti a descrivere, i cni aspetti corrispondono, secondo lo stadio, rispettivamente a quelli del primario e secondario dell' altra. Ciò getta luce sul fenomeno della doppia formazione a fnso nelle divisioni di maturazione, e costringe a identificare il fuso primario col secondario, nonostante che un periodo intermedio esista nel qnale non esiste traccia di fibre orientate a fuso, e nonostante che non si possa a tutto rigore asserire che ciascuna fibra dell' uno corrisponda ad una dell' altro.

I cromosomi vanno verso i poli (Fig. 97) e vi si raccolgono (Fig. 25); e così si arriva rapidamente alla formazione di due nuclei. La separazione non ha luogo come nella prima divisione di maturazione, caratterizzata dalla formazione dei cordoni riunenti che si incurvano. Mostra la Fig. 98 che i due nuclei figli già hanno assunto un aspetto quasi normale, eppure sono riuniti ancora da una sostanza di forma cilindrica, non strozzata, la cui struttura omogenea deriva da una trasformazione della struttura filamentosa precedente, quando c' erano i filamenti riunenti. Interrotta anche questa tenue connessione, si passa allo stadio della Fig. 26, stadio che rappresenta un momento assai fugace nei fenomeni che vanno svolgendosi. Si hanno qui, in ciascun gamete, due nuclei identici, e rispettivamente assai vicini.

La uguaglianza perfetta dei nuclei dell' ultima divisione prima della fusione, va d' accordo con quanto in generale si descrive sopra al nucleo stazionario e migrante degli Infusorî, ma non con quanto ha osservato PRANDTL nel *Didinium nasutum;* la differenza trai due nuclei, in quel caso, non richiede però che la cosa sia generale, nè significa che uno dei due sia maschile e l' altro femminile, secondo la nomenclatura del MAUPAS. Questa differenziazione, non è omologa a quella che si osserva altrove, nei Vorticellidi p. e., tra micro e macrogamete. Il concetto del MAUPAS, che in questi Infusorî sia maschile il nucleo migrante del microgamete, che si unisce con quello stazionario del macrogamete — concetto sorto evidentemente dal desiderio di fondere in una le due differenziazioni — non regge molto alla critica, giacchè, come abbiamo veduto nella descrizione dei minuti processi della coniugazione, i due nuclei destinati a fondersi, si portano tutti e due accanto alla membrana che separa i due gameti, poi questa sparisce ed essi si fondono; essi sono dunque uguali anche nell' atteggiamento; invece gli altri 2 si allontanano; se volessimo ad ogni costo fare un raffronto cogli altri Infusorî, troveremmo più giusto di dire che sono due nuclei migranti, visto che gli altri due rimangono lontani dal punto di unione dei gameti, come fanno gli stazionarî. La differenziazione osservata dal PRANDTL, è una sessualità *sui generis.* Le differenze che spesso si osservano trai due gameti in ogni specie di Infusorî, condurrà forse a riconoscere un differenziamento sessuale trai gameti, in qualche specie che presenti la doppia reciproca fecondazione, togliendo con ciò via ogni dubbio nella questione.

E ciò potrebbe avvenire, anche se si trattasse di un differenziamento sessuale constatabile soltanto fisiologicamente, secondo i concetti espressi a proposito della divisione sessuale.

A scanso di equivoci, ricordiamo la disuguaglienza nucleare nei gameti di *Myxobolus pfeifferi* (Mercier), la quale ha un altro significato da quella del *Didinium;* si tratta qnesta volta di due nuclei appartenenti a due gameti differenziati anche *in toto;* abbiamo insomma nno strano dettaglio della differenziazione sessuale generalmente diffusa.

Facendo il solito riassnnto, possiamo dire che l'ultima divisione è dunque esseuzialmente simile alle ordinarie divisioni del micronucleo. Uno stadio di accrescimento che la caratterizzi, non è riconoscibile; tutt' al più si può dire che i uuclei sono un poco più grandi, alla formazione del fuso primario, e questo è d'accordo colla grandezza maggiore anche negli stadî successivi. Se — a torto — si volesse sostenere l'esistenza di uno stadio di accrescimento, prima del differenziamento del fuso, che distingua questa divisione dalle ordinarie, — uon si avrebbe però mai nulla di paragonabile all'accrescimento (allungamento) subito dai micronuclei delle divisioui precedenti, perchè qnello avveniva dopo differenziato il fuso primario; qui iuvece si passa direttamente dal fuso primario al fuso secondario, come nelle comuni divisioni.

7. Avvicinamento e fusione dei nuclei.

Terminata l'nltima divisione, in ciascun gamete i due nuclei, che hanno ugnale aspetto, si allontanano, e si giunge così ad uuo stadio in cui essi occupano posizioni esattamente uguali a quelle della Fig. 27, pur non essendo internamente trasformati, ed avendo ancora forma sferica. Nou è anzi difficile trovare individui in questo stadio, che ho tralasciato di disegnare solo perchè facilmeute intelligibile, uè molto differente dal precedente, e dal seguente raffigurato nella Fig. 27, nel quale si avverte una variazione di forma uei due micronuclei (respettivamente appartenenti al macro- e microgamete) che si trovano in vicinanza. Allora succede anche talvolta, ma uon sempre, che i due micronuclei lontani od nno di essi, sia pure schiacciato; se ciò avviene, come è rappresentato in piccolo grado nel microgamete della Fig. 100, ed nn poco di più in quello della Fig. 99 e 27, l'orientamento dell'asse più lungo è costante, cioè esso si trova in direzione perpendicolare alla congiungente i due nuclei dello stesso gamete. L'aspetto dei due nuclei che si sono accostati è naturalmente meglio riconoscibile nelle sezioni. Richiamo l'atten-

zione sulle Fig. 99 e 100. Nella prima di qneste vi è nna grande vicinanza ma nna parete divisoria esiste ancora trai due nnclei; qualche fibra si trova nello spazio perinncleare, più distinta che in altri stadî. Nella Fig. 100 è sparita nel punto di separazione trai due nuclei, la membrana del microgamete, si che siamo proprio al momento precedente alle nozze.

La riunione dei nuclei si compie rapidamente, si che è difficilissimo cogliere simili stadî, specialmente nelle sezioni; e la Fig. 28, da un preparato *in toto*, mostra che al momento dell' nnione dei due nuclei, qualche radiazione è visibile, tutto intorno al nucleo di coniugazione. Questo acquista poi l' aspetto di nn micronncleo cosi detto in riposo; la Fig. 29 ne mostra nn esempio, nel quale qualche parte interna è un poco più chiara; non so bene qnale valore si possa dare a tale particolarità, in ogni caso avverto che si dà il caso che essa nou sia riconoscibile.

Forse si tratta, nel caso della figura, dei primissimi cambiamenti per la divisione successiva.

Più per scrupolo di coscienza che per altro, ricordo una strana idea di HOYER (99) secondo la quale nei Ciliati la coniugazione avverrebbe senza la fusione del nucleo; consisterebbe in uno scambio dei nuclei migranti, mentre gli stazionarî anderebbero „zugrunde". Ora, non solo la effettiva riunione dei nuclei è stata vista in molti casi, prima e dopo di lui, ma tutta la serie dei fenomeni di maturazione resterebbe poco comprensibile, senza la copulazione dei nuclei, e specialmente non si capirebbe come mai nei Vorticellidi a questi fenomeni vada soggetto anche il micronucleo del macrogamete, il quale seguendo l' A. dovrebbe morire senza traccia; inntile dunque portare in appoggio della sua tesi gli esperimenti dei fratelli HERTWIG, BOVERI ecc., „vornehmlich aber die neuesten Versuche von DELAGE 98 an Seeigeleiern, wodurch bewiesen wird, daß kernlose Eifragmente durch das Eindringen des Spermas mit Erfolg befruchtet werden können und entwicklungsfähig sind (pag. 129)"; di ciò *non est hic locus*. Nè certo le incomplete osservazioni di HOYER acquistano maggior fede per i pregi estetici — veramente considerevoli — delle sue figure.

Le radiazioni osservate per la prima volta da PRANDTL negli Infusorî (*Didinium nasutum*), compaiono nell' *Opercularia coarctata* in uno stadio assai più fuggevole. Vediamo in certo modo una funzione centrosomica esercitata dal nucleo *in toto*, ciò che certamente è da porsi nella categoria degli argomenti per l' origine sua intranucleare, anzichè citoplasmica.

La mancanza delle radiazioni attorno al punto dove convergono le fibre del fuso, non è cosa nuova; anch'essa è interessante in quanto tende a mostrare l'influenza del centrosoma nel fenomeno delle radiazioni; infatti esse si mostrano dove esiste un centrosoma; mancano, dove il centrosoma manca, non esclusi quei casi in cui sono assenti anche le fibre fuso (Blochmann 94, Keuten 95 — *Euglena*) nonostante la presenza di un organo direttore della mitosi paragonato sì ad un centrosoma, ma veramente molto diverso da esso nelle sue manifestazioni.

La fusione si compie dunque tra due nuclei identici, ed in uno stato di completa omogeneità apparente, forma quasi sferica, un poco compressa nella direzione della linea d'unione. Poche radiazioni, momentanee, accompagnano l'atto della fusione — ed a questo segue un impiccolimento del nucleo di fecondazione.

8. Ulteriori divisioni e modificazioni, fino al ritorno alle condizioni normali.

Il nucleo di coniugazione tosto entra in nuova attività. Differenziato il fuso, compaiono i cromosomi, ed il nucleo si divide rapidamente, come è rappresentato nelle Fig. 30, 31, producendosi due nuclei del solito aspetto omogeneo (Fig. 32 e 101). Come si vede dalle figure, essi sono notevolmente più grandi dei soliti micronuclei, e ciò non perchè si siano fusi due in uno colla coniugazione; infatti il primo nucleo, dopo la coniugazione, aveva una grandezza su per giù come i micronuclei delle Opercularie normali. La mancanza assoluta di uno spazio perinucleare allo stadio a cui siamo arrivati, è caratteristica (Fig. 101—102). Differenziandosi un fuso in ciascuno dei due nuclei (Fig. 102), si ha una nuova cariodieresi (Fig. 33 e 103), che conduce alla formazione di 4 nuclei. La Fig. 104 mostra le due masse nucleari di una di queste cariodieresi, già quasi omogenee di struttura, non però ancora di forma sferica; i filamenti riunenti sono ancora in parte distinti. Qualche fibra si distingue pure negli spazî perinucleari. Siamo dunque allo stadio a 4 nuclei (Fig. 34). Trai numerosissimi individui che si possono osservare con 4 nuclei, ve ne sono di quelli, come nel caso della figura citata, nei quali tutti e 4 i nuclei appaiono identici di grandezza, forma, struttura; questo fatto è dimostrato sia dai preparati *in toto*, sia dalle sezioni, e con i varî metodi di colorazione adoprati. Però il destino dei 4 nuclei è diverso, giacchè siamo già arrivati al momento

in cui uno restando tra essi definitamente micronucleo, gli altri cresceranno invece, trasformandosi in macronuclei. Tra tutti i processi che si svolgono durante la coniugazione, è certamente nella nostra specie questa trasformazione quello che presenta più varietà nel modo di svolgersi. Perciò ho disegnato parecchi di questi stadî, i quali non possono rappresentare stadî successivi di un processo uniforme; non sarà però difficile rintracciare in che cosa consistano le differenze individuali. Un accrescimento in grandezza ed un apparire di granuli nell' interno, è il primo fenomeno che si osserva. La Fig. 35 e le Fig. 105—107 lo mostrano. Questi grannli si raccolgono però talora, come nel caso della Fig. 106, lasciando un piccolo spazio tra la membranella micronucleare e la loro massa; o la cosa è più accentnata come nella Fig. 108 o, come nella Fig. 109, i granuli sono sparsi in una grande massa incolora, dando ai nuclei un aspetto che ha una superficiale somiglianza con uno stadio della prima divisione di maturazione. Non è però questo un fenomeno comune; in molti preparati non si trovano tracce di simili stadî. In altri casi i granuli, pur essendo diffusi in tutta la massa del nucleo, sono più accumulati nel mezzo (Fig. 110 e 36). Soprattutto però ci interessa la comparsa di sostanza cromatica; essa avviene per la massima parte alla superficie esterna del nucleo (Fig. 36, 111—114), sia che essa compaia in forma di granulini sparsi, sia che si formi in uno o pochi punti in forma di uno o più granuli addossati. Si trovano casi come quelli delle Fig. 115—116, nei quali poca sostanza cromatica esiste, ma centrale; essi sono però relativamente rari, devono quindi rappresentara una deviazione dal tipo più comune del processo. Anche un differenziamento in una grande massa di corpi cromatici (Fig. 117) è fenomeno raro. È invece comune assai che un grosso corpo interno sia presente contemporaneamente ad una serie di più piccoli periferici (Fig. 37) e che quelli più grossi si allunghino, probabilmente per dividersi mentre si allungano i nuclei stessi; si passa così, per mezzo dello stadio Fig. 38 a quello della Fig. 39.

Se in una piccola cultura sono avvennte coniugazioni e non si dà ad essa alimento, dopo varî giorni si possono trovare ancora moltissime Opercularie con tre macronuclei poco allungati ed un micronucleo; la struttura dei macronuclei è in questo caso assai simile a quella dell' unico macronucleo normale, ossia si sono differenziati nell' interno corpi grandi e piccoli, più e meno cromatici. Occorre alimento perchè si producano quelle divisioni dalle quali resulta la spartizione dei macronuclei e la ricostituzione degli

individui normali. Abbiamo nella Fig. 42 un caso di divisione già compiuta, in condizioni di scarso nutrimento, che avevan lasciato tempo ai macronuclei di acquistare una struttura pressochè normale. Invece nella Fig. 41 ove si vede il micronucleo che ha già differenziato il fuso, ma non la sostanza cromatica, gli altri tre nuclei sono poco differenziati, specialmente dal pnnto di vista della cromaticità; un poco più avanti nelle loro trasformazioni si trovano quelli della Fig. 118. Si trattava di casi in cui una certa quantità di alimento fu trovata dagli individui in questione, e permise la loro divisione prima che i macronuclei fossero ben differenziati nella loro struttura. Come ultima figura del processo di coniugazione, si guardi la Fig. 119 nella quale la presenza di resti del vecchio macronucleo indica non esser l'individuo ancora molto lontano dalla coniugazione avvenuta; il macronncleo è ormai normale, non però molto ricco di granuli intensamente colorabili.

La spartizione dei macronuclei avviene, come abbiamo detto, qnando i nnclei son diventati 4; con una prima divisione si forma una Opercularia che ha dne macronuclei a lato di nna che ne ha nno solo (Fig. 42), e con una seconda divisione di quella con dne macronuclei, si formano altre due Opercnlarie con un solo macronucleo. Solo eccezionalmente accade che la divisione dei nuclei indifferenziati — dopo la coniugazione — proceda oltre il numero di 4, fino ad 8, come in altri Vorticellidi; si veda p. e. la Fig. 40; si tratta però di casi molto rari. Data questa rarità estrema, non son riuscito a cogliere questi individui nell'atto di dividersi per spartire i loro numerosi nnclei, ciò che del resto ben si capisce come possa avvenire, nè presenta uno speciale interesse; evidentemente occorrerà una divisione di più a ristabilire le normali condizioni.

Qnesta descrizione relativa alla formazione del macronucleo nnovo è abbastanza basata su nn numero cospicuo di stadî, perchè si possa escludere nn'idea proposta da alcuni, in base a ricerche incomplete; cosi anche recentemente il Fauré-Fremiet (04) stndiando la coningazione di qualche Vorticellide, suppone che i pezzi del vecchio macronucleo in parte si distruggano, in parte si riuniscano a formare un nuovo macronucleo; ma l'A. non ha osservato i fenomeni che avvengono nel micronucleo e nei suoi derivati, chè altrimenti avrebbe di certo constatato anche nelle specie da lui considerate, la stessa formazione del nuovo macronucleo, da divisioni del micronucleo, e in maniera completamente indipendente dai pezzi del vecchio. Questi pezzi probabilmente saranno utilizzati come materiale alimentare, ma che essi passino anche solo parzialmente a formar

parte del nuovo nucleo, non esiste nessuno stadio che possa farlo supporre; i rapporti di vicinanza tra il macronncleo nuovo che sta trasformandosi ed i pezzi in questione, non hanno evidentemente nessun significato; chè se uno si volesse ad essi attribuire, allora saremmo forzati a concludere che anche i Batterî mangiati dall' Opercularia hanno il compito di trasformarsi in macronucleo, perchè essi, nei vacuoli alimentari, si trovano ad avere lo stesso rapporto di vicinanza con i nuovi nuclei — come mostrano le Fig. 111 e 114.

A partire dunque dallo stadio in cui si trova un solo nucleo — dopo la fusione dei due pronuclei — si hanno due divisioni, od eccezionalmente tre. I quattro nuclei derivati sono identici, però nno solo conserva grandezza e struttura, gli altri divengono più grandi, differenziando corpi cromatici nell' interno, la cui formazione ho seguito gradnalmente, esclndendo l'utilizzamento della cromatina dei vecchi macronuclei come tale. Si formano cosi di regola 3 macronuclei, e dne divisioni dell'Opercularia intera ristabiliscono le condizioni normali.

9. Il numero e la riduzione dei cromosomi.

Quanto al numero dei cromosomi ed ai fenomeni di riduzione, ho incontrato serie difficoltà nella loro piccolezza e nel fatto che essi si trovano molto ammassati; specialmente nella seconda divisione di maturazione, in cui i nuclei sono più piccoli che nelle altre, riesce incerta la loro numerazione. Ho potnto contarli bene nell' ultima divisione, dove sono 8; nella prima divisione di maturazione ho acquistato la certezza che fossero più numerosi di 12, e spesso ne ho potuti contare 16; è dunque qnesto il numero normale; una riduzione si palesa perciò evidente, ed essa deve avvenire nella seconda divisione di maturazione, dove si posson male contare i cromosomi nello stadio della piastra equatoriale, ma certamente si aggirano trai 12 e i 16; mentre d' altra parte è assai evidente che essi sono in numero considerevolmente minore in ciascun gruppo che si porta verso i poli del fuso, negli stadi snccessivi. Nell' ultima divisione si può riconoscere che sono 8, tanto nella piastra equatoriale, quanto poi, in ciascun grnppo che si porta verso un polo del fuso. Finalmente, nelle divisioni del nucleo di fecondazione, il loro numero è — ben chiaramente — tornato a quello normale. Si verifica quindi qua una ridnzione numerica, direttamente osservata, come nel *Didinium nasutum* (PRANDTL) nnico Infusorio in cui la ridnzione sia fin qui

stata dimostrata, uno quiudi dei pochi Protozoi in cui è conosciuta — cfr. per questo la breve enumerazione in proposito fatta da Bott (06) mentre descrive la riduzione nella *Pelomyxa palustris*, e da Schaudinn (05). Alcuni autori, come Doflein nella *Noctiluca*, hanno invano cercato i fenomeni di riduzione, ciò che evidentemente non dimostra che essi manchino, data la difficoltà della ricerca nei Protozoi. Certo anche nel nostro caso siamo ben lungi da quella chiarezza di immagini che si osserva in altri Protozoi, e che ha permesso p. e. a Schaudinn di contare i cromosomi in varie specie ed in varie fasi di Tripanosomi (04). I fenomeni di riduzione sono del resto poco noti nei Protozoi, e Schaudinn (05) dice di conoscere solo i casi dei Tripanosomi (Prowazeck 04 e 05 ed egli stesso 04) e quello del *Didinium nasutum*, sopra citato. La riduzione numerica in *Actinosphaerium* (R. Hertwig 99) è molto probabile, ma il gran numero dei cromosomi impedisce di contarli esattamente.

In *Opercularia coarctata* dunque abbiamo come numero normale 16 cromosomi, che si riducono ad 8 colla seconda divisione di maturazione.

10. Modificazioni dei vecchi macronuclei.

Abbiamo seguito nelle loro trasformazioni i micronnclei, fino a formare i nnovi macronuclei. Dobbiamo ora accennare a quello che succede dei macronnclei dei gameti, destinati a distrnggersi, secondo quanto generalmente si ammette. Si comincia ad osservare nn mutamento di forma, qnando i micronuclei sono già due nel microgamete (Fig. 54), ed i corpi iuterni cromatici si allungano come se dovesse incominciare una divisione (Fig. 6 e 7). A ciò segue nno spezzettamento in più parti, come mostra la Fig. 8. Si può però sorprendere uno stadio in cui i corpi cromatici sono di nuovo sferici e piccoli, Fig. 56—57. Forse le cose non passano sempre in modo esattamente nguale, forse si alternano momenti di allungamento e di raccoglimento in gocce. Al principio del fuso primario della prima divisione di maturazioue (Fig. 58—60) la forma delle gocce cromatiche è molto varia, come anche quella dei pezzi. Soprattutto ci sembra interessante il fatto che in qnesto progressivo spezzettamento lo stadio dell' allnngamento micronucleare ha un corrispondente nell' allungamento cospicuo dei pezzi del macronucleo, specialmente uel macrogamete, Fig. 61—62, allungamento che avviene in una direzione parallela a qnella del micronucleo. Gli stadi ulteriori della fase d' allungamento portano nel macronncleo alla formazione definitiva

dei pezzi e ciò si può bene vedere nella Fig. 67, specialmente osservando quel corpo a forma di 8, ove si è sorpreso un granulo cromatico nel momento di dividersi. La cromaticatà aumenta qui insieme che nel micronucleo, come mostrano le figure successive. I pezzi definitivamente isolati hanno un aspetto tipico, determinato dalla presenza di un grosso granulo cromatico centrale, ed alcuni piccoli periferici; oppnre tntto il pezzo è cosparso di grannli cromatici di media grandezza (Fig. 70). Anche in stadi successivi, ma di poco, come mostra la Fig. 72, possono questi pezzi non essere tutti definitivamente formati. Più avanti i granuli periferici si rendono sempre meno visibili, ma spesso si osservano dei raggi partenti dal granulo centrale (Fig. 73). E con poche differenze, in cui i caratteri individuali possono anche aver parte, arriviamo allo stadio dell' ultima divisione, Fig. 94, nel qnale la cromaticità dei corpi in questione è molto aumentata, e raramente si distingue un granulo centrale più grosso da altri periferici. Qnesti cumuli di granuli (Fig. 96) si riconoscono però sempre dai micronuclei non utilizzati, i quali hanno pure assunto una grande cromaticità, ma più diffusa e regolare. Dal momento della piastra eqnatoriale, la cromaticità dei resti del macronucleo è di nuovo diminuita, ed alcuni hanno l' aspetto che avevano prima, con un grosso granulo centrale, ma più spesso ci sono pochi granuli, periferici, e la massa è poco cromatica. La riorganizzazione allo stato di prima si effettua un poco più tardi, qnando già i due ultimi micronuclei si sono prodotti ed avvicinati; e nemmeno avviene in tutti i pezzi (Fig. 100). Negli stadî successivi, dopo la copulazione nucleare, quando il nucleo di fecondazione si divide, i resti del vecchio macronucleo hanno i caratteri che avevano da principio tranne alcuni che sono proprio ridotti in granuli sciolti (Fig. 102). Arriviamo anzi assai avanti in queste condizioni, avvertendo che spesso invece dei granuli periferici c' è nn contorno un poco più cromatico, e che spesso i raggi sono accentuati. Un aspetto più compatto ed omogeneo caratterizza i corpi che rimangono quando già l' Opercularia si divide od è divisa.

Senza poter minimamente afferrare quel che succeda in quei laboratorî chimici di cui noi vediamo le muraglie, possiamo però affermare che questi corpi, mentre risentono delle condizioni del micronucleo nella fase d' allungamento della prima divisione di maturazione, subiscono anche dopo modificazioni, che devono esprimere una partecipazione al metabolismo generale della cellula, essendo connesse con determinati stadî.

Ciò non ci fa meraviglia, giacchè sappiamo che i corpi cromatici

del macronncleo sono oltremodo variabili anche indipendentemente dalla coniugazione; già Greenwood ne ha detto qualche cosa in rapporto collo stato di alimentazione; il significato preciso di tali modificazioni, però sfugge fino ad oggi, come ho indicato in un recente articolo (07, 1).

Per quanto si riferisce allo spezzettamento e trasformazioni dei vecchi macronuclei, durante la coniugazione, vogliamo insistere specialmente su tre punti: che le loro modificazioni continue di aspetto e cromaticità nei varî periodi della coningazione, indicano una parte che essi prendano o subiscano in essa; che il modo con cui cominciano a trasformarsi, ricorda ciò che avviene nella divisione, e che durante la fase di allnngamento, nella prima divisione di maturazione, i pezzi del macronucleo vecchio, specialmente nel macrogamete, assai numerosi ma pur sempre assai grandi, subiscono allungamenti paralleli alla direzione del micronucleo, mentre che prosegnono nello spezzettamento.

11. Le coniugazioni osservate sul vivo.

Il tempo impiegato dai varî processi sopra descritti, lo ho potuto determinare colle osservazioni snl vivo. La temperatura era di circa 20°. Ho spesso osservato Opercularie isolate dopo la divisione sessuale, in cui la successiva divisione dell' individuo maschile tardava ad avvenire anche qnasi nn' ora; è possibile che questo tempo sia anche maggiore. La divisione una volta incominciata si compie in meno di un qnarto d' ora, poi i microgameti impiegano qualche tempo a completarsi, sì che il primo si stacca dopo un tempo che può arrivare alle dne ore. Più di mezz' ora può rimanere l' altro ancora attaccato. Dal momento in cui comincia la coniugazione, passa più di nn' ora prima che cominci la divisione del micronucleo maschile. Incomincia la prima divisione di maturazione dopo un' altra ora circa, ma questa è di durata più lunga delle altre, si che impiega di per sè più di un' ora per completarsi; solo dopo dne ore e mezzo a tre dal suo principio, comincia la terza divisione, e di qui in poi le cose vanno assai presto, si che dopo tre ore e mezzo è tntto finito, cioè l' Opercularia ha tre macronuclei ed un micronucleo. In questo stato può segnitare a stare anche più giorni, giacchè mentre fin qui le cose procedevano come svolgimento di un fenomeno esclusivamente nncleare, ed interno, senza bisogno

di alimento, ora l' Opercularia deve diversi *in toto*; l' alimentazione ha perciò grande influenza; accade, nelle culture ove è un' epidemia di coniugazioni, di osservare un numero qualche volta sterminato di Opercularie in questo stato; e si capisce: le coningazioni si sono svolte per e nel digiuno, ed in tali condizioni tardano le successive divisioni ad avvenire; invece negli esperimenti, dando a mangiare agli individui che sono arrivati a questo punto, in poche ore si dividono per due volte e ridivengono normali. Come si vede l' intero processo (escluse le divisioni dell' Opercularia, necessarie per la spartizione dei macronuclei) dura 9—10 ore.

Più che per la determinazione di queste misure di tempo, le osservazioni sul vivo hanno interesse per la conoscenza di alcuni particolari fenomeni. Si segue p. e. assai bene — con forti obbiettivi ad immersione — la penetrazione del microgamete nel macrogamete; una volta che il primo ha aderito al secondo, si comincia a formare un' ernia, nell' interno del macrogamete, ed il micronucleo maschile che nel microgamete libero aveva un' altra posizione, è quello che ora sta avanti a tutto, ed avanza man mano che l' ernia avanza. Sebbene non si possa affermare che ad esso si debba la formazione dell' ernia, pure ciò sembra verosimile, dato questo suo comportamento (Figg. 43—45).

Un' altra questione assai importante è quella delle coniugazioni multiple, per ciò che rignarda la contemporaneità dei processi che si svolgono. Abbiamo visto che qui, come in generale, la divisione degli elementi maschili e feminili è contemporanea, tranne nel caso della prima divisione nel microgamete, la quale non ha corrispondente nel macrogamete. Quando avviene la coniugazione multipla, i processi sono contemporanei tra i due microgameti ed il macrogamete; anzi una volta ho osservato tre microgameti in coniugazione collo stesso macrogamete, e tutti e tre nello stesso identico stadio. Le osservazioni sul vivo spiegano come avviene questo fenomeno, ossia non le cause, ma il modo del suo svolgimento. Una volta, isolando un' *Opercularia* coi suoi due microgameti attaccati e ponendola in una piccola goccia, accadde che il primo entrò in coniugazione colla zia, mentre il secondo era ancora attaccato; osservai dapprima il prosegnire dell' ernia nell' interno del macrogamete, poi il distacco dell' altro microgamete, avvenuto dopo mezz' ora dal principio della coniugazione; dopo alcuni altri minuti, anche questo si attaccò alla zia, ed incominciò

i soliti processi, indipendentemente dal fratello. Cominciava appena l'ernia dovuta al secondo microgamete, che già il primo era un poco allungato a fuso. Dopo altri 40', le dne ernie erano diversamente grandi, ma i micronuclei dei due microgameti erano ormai allo stesso stadio, ugualmente allungati, e così seguitarono sempre, come può servire a darne un' idea la Fig. 46. Dal principio della coniugazione del primo microgamete al principio della divisione del sno micronucleo passò un poco più di un' ora e un quarto, un tempo un poco lungo, ma non tale da potersi dire con certezza che esso abbia rallentato il suo corso; l' altro però lo accelerò di certo, arrivando alla stessa fase in almeno quaranta minuti più presto.

Mostrano qneste osservazioni, che la contemporaneità dei fenomeni nelle cariodieresi della coniugazione, non è dovuta a che i loro svolgimenti richiedano un tempo nguale; esiste un diretto collegamento trai processi dei gameti, per il quale gli stadî devono essere contemporanei, anche se, cominciati in momenti differenti, avessero la naturale tendenza a svolgersi successivamente. Le modalità di questo collegamento, le intime sue cause, naturalmente ci sfuggono.

Non sappiamo, nella lotta fraterna dei dne microgameti, se l' inflnenza regolatrice sia da attribnirsi specialmente al macrogamete, che sembra per il momento quasi inoperoso; forse si stabiliscono correnti d' azioni trai due microgameti stessi, attraverso al corpo del macrogamete.

12. L' accordo degli stadî nei gameti. Precedenza del macrogamete.

Una conclnsione che non vogliamo tralasciare di mettere in evidenza, si riferisce alla parte che prendono i due gameti nell' accordo degli stadî di divisione. Abbiamo visto, a proposito delle osservazioni fatte sopra Opercnlarie viventi, che gli stadî in cui si trovano i nuclei dei due gameti si mettono d' accordo anche se uno dei due è originariamente più indietro dell' altro; sì che se ne è dedotta l' esistenza di qualche inflnenza trai gameti. Ci sembra opportnno mettere in raffronto questo fatto con una constatazione la quale abbiamo fatto molte volte, nelle minute descrizioni dei processi cni i gameti vanno incontro. Abbiamo notato che spesso i micronuclei del macrogamete sono di qualche cosa più avanti nelle loro trasformazioni, di qnel che non siano quelli del microgamete. La constatazione si è sempre

fatta riguardo a stadi poco facili a trovarsi nei preparati; e se ne capisce facilmente la ragione; uno stadio è tanto più facile a trovarsi, quanto più esso dura immutato o poco mutato a lungo; ed allora, se anche esiste una differenza di stadio tra i due gameti, essa deve rimanere inavvertita; invece quando si hanno rapide modificazioni, per quanto un disaccordo sia piccolo, esso è riconoscibile. A parte questa differenza di indole generale, raramente abbiamo trovato nuclei dello stesso gamete che fossero in stadio un poco diverso. Dobbiamo dunque concludere che al macrogamete probabilmente spetta una parte maggiore, nel determinare la durata dei singoli processi, influendo sul microgamete in modo da accordarlo coi propri mutamenti. Ciò è tanto più strano, in quanto nel microgamete vi è una divisione di più, che si compie prima che nel macrogamete sia visibile qualche modificazione. La mia opinione personale è che le influenze siano reciproche trai due gameti; una notevole differenza trai due quanto alla parte che prendono agli intimi processi nucleari — non è mai constatabile, in nessuno dei regni della natura; forse la differenza di massa trai due gameti è la causa del fatto che il più piccolo sia in certo modo dipendente nelle sue modificazioni, dal più grande.

Lasciando però da parte ogni tentativo di spiegazione che è qui incerta, ci contentiamo di insistere sul fatto che, mentre il microgamete dà principio alla coniugazione avvicinandosi al macrogamete ed avendo uel suo micronucleo una divivione che il macrogamete non ha — appena questa divisione è avvenuta, e per tutti i fenomeni precedenti la fusione dei pronuclei, il macrogamete si trova sempre in stadio un poco più avanzato del microgamete.

13. Variazioni della cromaticità nelle divisioni di maturazione.

La cromaticità delle strutture micronucleari presenta variazioni continue, e tali che due volte, nelle divisioni di maturazione, il nucleo diviene intensamente cromatico — nella fase dell' allungamento ed in quella del differenziamento dei cromosomi — con un periodo intermedio di scarsissima cromaticità. Questo fatto, se ben si considerino le descrizioni singole dei fenomeni osservati, mette in rilievo quanto si sia schematici tutte le volte che si parla

della cromatina come di un gruppo di pedine nere in mezzo a delle pedine bianche, pedine nere che farebbero soltanto evoluzioni di forma e di posizione, divenendo molto scure quando impiccoliscono, più chiare se ingrandiscono, rigonfiandosi. Tale tendenza è forse assai diffusa nella odierna citologia, e mi sembra che sia basata sopra a schemi non corrispondenti alla realtà.

Nell' *Opercularia*, abbiamo seguito le variazioni della colorabilità di masse considerevoli, abbiamo p. e. notato che i micronuclei nella fase di allungamento prima della secondo divisione di maturazione divengono completamente cromatici. Non possiamo per nulla sospettare che ciò dipenda da un intenso processo di assimilazione di piccolissime parti cromatiche preesistenti (invisibili), assimilazione alla quale poi segua una rapida distruzione della cromatina formatasi sì che restino corpicciuoli cromatici invisibili, nella fase del raccoglimento. Anzi, possiamo dire che alcuni granuli di cromatici divengono acromatici, come è resultato probabile dalle descrizioni ai queste trasformazioni. Questi concetti sarebbe troppo lungo applicarli dappertutto dove è possibile; ma voglio citare l' esempio di quella curiosa divisione dell' *Amoeba limax* (Vahlkampf) dalla cui descrizione il lettore rimane coll' impressione che, dopo la fase della separazione delle grandi masse di sostanza cromatica, la formazione dei cromosomi debba necessariamente dipendere dalla cromatina in quelle masse accumulata; una specie di fato invincibile sembra impendere su questo fenomeno, nonostante che l' A. non sia risoluto nel fare tale ipotesi. Egli è — vorrei dire con una frase un po' rude, ma che mi sembra espressiva — che la cromatina non è una sostanza, bensì una proprietà. E con questo mi sembra di rispondere anche alle critiche che ha rivolte A. Fischer alla tecnica microscopica delle colorazioni. Mentre sono d' accordo con lui nell' ammettere che le sostanze le quali ci appaiono ugualmente colorate possono essere molto più differenti di quelle che in altri casi possano apparirci diversamente colorabili — ed apprezzo molto le sue ricerche a questo proposito — mi sembra che le sue critiche non vadano per nulla rivolte alla tecnica, ma a quei tecnici che non valutano giustamente le prove delle cose osservate. Se discussi serenamente, i fatti per lo più non conducono a schematismi eccessivi — come ci è accaduto testè per la cromatina dell' *Opercularia*.

Digitized by Google

14. Omologie delle divisioni conducenti alla formazione dei pronuclei.

L'avere osservato che la prima divisione del micronncleo, nel microgamete dell' *Opercularia* — quella che non ha corrispondente nel macrogamete — nonchè l'ultima divisione prima della fusione dei pronuclei, sono tra loro sostanzialmente uguali, ed uguali all' usuale processo di cariodieresi in questa specie, mentre le due divisioni intermedie sono sostanzialmente differenti, mette sempre più in luce la loro speciale caratteristica, mentre alle altre si deveno paragonare divisioni usuali nagli altri organismi. Quanto alla prima divisione nel microgamete, non sapremmo far niente di meglio che accostarci alla ben nota idea del MAUPAS, il quale la considera come un avviamento a quella condizione di due micronuclei, la quale è permanente in molti Ciliati; laddove, come negli Euplotidi e nei Vorticellidi, un micronncleo è andato colla evoluzione sparendo, compare però di nuovo, per nn momento, durante la coniugazione. Siccome si tratta di un fenomeno proprio di un gruppo ristretto di Infusorî, e trai più differenziati, non si può andare a rintracciare omologie coi Metazoi, nelle divisioni degli spermatogonî ed ovogonî, precedenti la maturazione delle cellule germinali; a queste, secondo R. HERTWIG (05) — e mi sembra giustamente — si paragonana invece le divisioni che frequenti si osservano negli Infusorî, prima che cominci la epidemia di coningazioni; sono le „Hungerteilungen" di R. HERTWIG. Quanto all'ultima divisione, le nostre osservazioni mostrano la sua natura non speciale, sicchè si deve ritenere non abbia nulla a che fare colla riduzione e maturazione dei nuclei. E ci accostiamo perciò alla geniale concezione di BOVERI (92), sostenuta anche da VERSLUYS, che essa corrisponda alla prima divisione dell'uovo fecondato. RÜCKERT nei Copepodi ha dimostrato che la parte maschile e femminile della cromatina, nel primo fuso di divisione dopo la copulazione (ed anche nelle divisioni successive) si mantengono distinte. Per la condizione speciale della coniugazione dei Ciliati (e quali siano cfr. nello scritto del VERSLUYS), la formazione di questi fusi — paterno e materno — è andata avvenendo sempre in luoghi più distanti tra loro; i fusi si formano nei due gameti, separatamente, e si riuniscono poi le parti che ne sono originate — con fecondazione doppia incrociata. Ora io dico che se prima si poteva sostenere qualche altra teoria, adesso non si pnò più; e ciò è merito dell'osservazione di RUSSO e DI

Mauro, i quali nella coniugazione del *Criptochylum echini* hanno trovato fenomeni nuovi, nel comportamento dei nuclei, fenomeni i quali mi sembra realizzino nè più nè meno che uno stadio intermedio, nelle sviluppo della coniugazione dei Ciliati, quale è stato immaginato dal Boveri; nè è la prima volta che questo illustre citologo ha la soddisfazione di trovarsi diuanzi ad un caso di questo genere. L' importante fenomeno osservato dal Russo e Di Mauro e da essi paragonato a quanto avviene nei Saccaromiceti (Guillermond 02) consiste in ciò che nel *Criptochylum* sunnominato, non vi è fecondazione doppia, iucrociata; bensì i nuclei dei due gameti — dopo le due divisioni di maturazione — dopo queste sole due divisioni, si noti bene — si avvicinano al punto d' unione dei gameti stessi e si fondono; poi l' unico nucleo formatosi si divide *in situ*, e le due metà si allontauano, per andare ciascuna di nuovo in un gamete; qui abbiamo dunqne rispetto alla copulazione il primo passo, consistente nella non fnsione permanente dei citoplasmi, mentre i nuclei si fondono prima di dividersi, — ma per tosto separarsi — anzichè dividersi prima di fondersi, come per un differenziamento ulteriore succede negli altri Ciliati. Un altro stadio di trasformazione si può poi riconoscere p. e. nella coniugazione del *Dendrocometes paradoxus* (Hickson e Wadsworth 02), nella quale l' ultima divisione avviene come di solito, separatamente nei due gameti, ma molto vicino alla parete divisoria; cosa che, del resto, si verifica forse auche in altri Infusorî.

È caratteristico a proposito di tale qnestione che, la fusione dei nuclei avviene in generale allo stato di fuso, nei Ciliati, come se ciò stesse a ricordare la tendenza che questi nnclei hanno ad antecipare i fenomeni di divisione, rispetto a quelli della unione sessuale. Nel caso dei Vorticellidi, come dalle minute ricerche sopra descritte resulta evidente, siamo un poco più indietro; vale a dire la fusione nucleare non accade allo stadio di fuso, bensì iu una condizione di quelle che vengono dette „di riposo" dai citologi. I nuclei che nella Opercnlaria si fondono in questo stadio, formano un fuso cariocinetico dopo la divisione, mentre negli altri Ciliati già l' hanno formato, prima di fondersi. Questo fatto è una conferma delle vedute del Boveri, illustrate più ampiamente nel dotto scritto del Versluys, giacchè qua, dove, dati i rapporti geuetici dei Vorticellidi. compare una piccola retrocessione, vengono per l' appunto a mancare quelle condizioni che sono state invocate come moventi nell' antecipazione dei fenomeni di divisione sopra a quelli di fusione; queste condizioni sarebbero il grande differenziamento morfologico dei Ciliati, e la

conseguente utilità di una unione soltanto parziale, al momento della funzione copulativa; e qui appunto, nei Vorticellidi, per una ragione differente, ossia per un differenziamento ancora ulteriore dei gameti, si è ritornati, quanto al grado dell' unione dei gameti, alle condizioni più antiche, che si verificavano nella copulazione.

Anche CLARA HAMBURGER discute la questione di queste omologie, estesamente; essa combatte l'idea di GIARD che l'ultima divisione sia omologa alla seconda di maturazione dell' uovo; ora poi che si conosce che alla precedente divisione avviene la riduzione, nel *Didinium nasutum* e nell' *Opercularia coarctata* — per opera delle ricerche rispettivamente di PRANDTL e mie, l'idea di GIARD diviene insostenibile. Le due divisioni dette negli Infusorî di maturazione sono ormai dimostrate corrispondere nei loro dettagli a quelle omonime dei Metazoi. — Un' idea dell' autrice è degna di essere raccolta: essa suppone che l'ultima divisione sia in qualche modo simile a quella che si osserva nelle Fanerogame, nelle quali le ricerche di GUIGNARD (00) e NEWASSCHIN (99) hanno dimostrato il fenomeno così detto della doppia fecondazione; dopo le divisioni di maturazione vi è una terza divisione, ed i due nuclei prodotti vengon fecondati ciascuno da uno spermio sì da produrre da una parte l'embrione, dall' altra l' endospermio. Questa somiglianza che per la lontananza degli organismi considerati (quanto alla filogenesi) e per le condizioni così particolari in cui si verifica non può avere affatto il valore di una diretta omologia, suggerisce però una possibilità per le Angiosperme di cui si tratta: che anche qui una divisione dell' uovo fecondato si sia antecipata, in modo da prodursi due cellule uovi prima della fecondazione, di cui, in questo caso, ciascuno fecondabile da un distinto spermatozoo; si avrebbe soltanto una corrispondenza perfetta cogli Infusorî, quando anche per gli spermatozoi si avesse una terza divisione, nelle specie a fecondazione doppia — cosa di cui, per quanto so, non è affatto il caso. In ogni modo dobbiamo riconoscere qui un caso interessante di convergenza.

Dunque, per riassumere la trattazione di questa ultima questione, possiamo dire che un fenomeno intimo dell'attività nucleare è tornato un poco indietro nei Vorticellidi, rispetto agli altri Ciliati, e forse in rapporto col fatto che una condizione che lo aveva determinato negli altri Ciliati (utilità dell' unione parziale dei gameti) è venuta per vie nuove di nuovo a mancare.

VII. Opercularia coarctata. Orientazione dei nuclei nella coniugazione.

1. Orientazione in generale.

Ed ora passiamo ad altre importanti questioni, riguardanti l'orientamento delle figure mitotiche nei varî stadî, questioni di cui abbiamo fatto solo pochi cenni nel corso della descrizione.

La prima divisione del micronucleo nel microgamete, si presenta, allo stadio di fuso con cromosomi distinti, orientata in direzione normale alla superficie di contatto. Da qnesto non deriva che i dne nnclei cui esso dà origine siano orientati ngnalmente; la loro congiungente è situata in nn piano parallelo alla superficie di contatto. Perciò non si pnò supporre che la disposizione del fuso sia quella che è, collo *scopo* di dare nna particolare disposizione ai dne nuclei che ne derivano; essa è probabilmente conseguenza delle relazioni che esistono trai due gameti. Quando avviene la divisione seguente, il micronucleo del macrogamete non presenta una orientazione particolare nè fissa, venendo esso travolto nei movimenti che avvengono dentro all' Infusorio. Nè ho potuto notare alcuna orientazione fissa dei dne nuclei in divisione nel microgamete, rispetto alla superficie di contatto col macrogamete. Presentano invece una orientazione caratteristica i due fusi primarî e secondarî di questi nltimi nnclei, tra di loro. I loro assi sono perpendicolari,[1]) o poco si allontanano da questa posizione. Poco più sotto giustificherò questa affermazione, riportando il resultato delle misnrazioni fatte a questo proposito. Nel periodo dell' allungamento l'orientazione più usuale è quella di una certa tendenza al parallelismo; ma non mi sembra punto che questo sia un fenomeno costante, avendo spesso osservato dei nuclei molto lunghi, in orientazione varia. Quando i cromosomi si portano verso i poli del fuso e ne resultano dne masse cromatiche riunite da filamenti, si pnò spesso sospettare che la orientazione precedente (consistente nell' avere le strutture corrispondenti, perpendicolari tra loro) sia conservata; vedasi p. e. la Fig. 17. Ma la relativa non frequenza di qnesti stadî, e la difficoltà di fare misure in questo caso, mi hanno distolto dal proposito di portare la questione anche qui sul terreno

[1]) Questi assi sono sghembi, con questa perpendicolarità voglio esprimere brevemente il fatto che il piano su cni giace la loro congiungente più breve ed nno di essi, è perpendicolare all'altro. Nella misura dell'„angolo trai due assi" is tratta dunque appunto dell'angolo formato tra uno di questi piani e l'altro asse.

delle cifre. Qnello che però è certo, per l'osservazione diretta, è che i due pezzi del cordone rinnente, dopo che è rotto, rimangono orientati parallelamente (come mostra la Fig. 17) indicando in qnesto caso che struttnre simili sono parallelamente orientate.

Nella seconda divisione di matnrazione, si ripete per il macrogamete quanto abbiamo detto per il microgamete nella divisione precedente; e nel microgamete l'orientamento dei 4 fusi è difficile a stndiarsi, dato il loro numero; ma quando due di essi sono lontani dagli altri 2, si constata la perpendicolarità trai due di ciascuna coppia. Nello stadio dell'allungamento, i 4 nuclei sono irregolarmente disposti.

Nell' nltima divisione, si hanno altre orientazioni. Il nucleo del microgamete, che si divide, mentre gli altri degenerano, occnpa nelle prime fasi delle sue trasformazioni una posizione centrale nel microgamete, ma non ha una orientazione determinata. Quello del macrogamete, è vicino alla parete che separa in due gameti, ed anch' esso senza orientazione. Qnando comincia a comparire il fuso, comincia anche a manifestarsi nna certa orientazione (Fig. 94) la quale è nettissima nello stadio della piastra eqnatoriale (Fig. 24): i due fnsi hanno per asse la medesima retta. Molti individui che ho esaminato in questo stadio, hanno mostrato sempre la cosa così netta, che non ho creduto punto necessario procedere a delle misurazioni; la cosa sarebbe stata più facile che per l'orientazione perpendicolare delle divisioni precedenti, ma era inutile. I due fusi, oltre ad essere orientati in questo modo, sono anche talmente vicini, che solo nna membranella, la parete divisoria dei due gameti, sta tra di essi. Poi, procedendo la divisione, essi si allontanano un poco, perdendo contemporaneamente l'orientazione che avevano, ma non del tutto; ossia le due masse nucleari che si formano da ciascun fuso rimangono su due rette che fanno nn angolo piccolo tra loro, senza però essere parallele nè coincidere. Le Fig. 25 e 26 mostrano chiaramente la cosa. Questo leggiero disorientamento non impedisce però di decidere quali siano i nuclei destinati ad unirsi: questo anzi é già deciso nello stadio della Fig. 94; non appena cioè, nella ultima divisione, i nnclei dei due gameti cominciano ad allungarsi, è fisso che la parte di ciascuno che è rivolta verso il compagno, si trasformerà in pronucleo, rimanendo l'altra destinata alla degenerazione. Questo fatto però non dice nulla se la destinazione di uno dei nuclei alla copulazione sia dipendente dalla posizione o da qualche differenza esistente trai due nuclei gemelli. Il MAUPAS, che è della prima opinione rispetto agli

Infusorî in genere, si basa appunto sulla mancanza di caratteri strutturali diversi visibili trai due nuclei, di cui nno rimane stazionario, e l'altro migra nel gamete compagno — nella coniugazione parziale dei Ciliati.

2. Misure degli angoli trai fusi omosessuali.

Vogliamo ora intrattenerci maggiormente del fatto principale osservato in questo studio della orientazione delle fignre mitotiche, cioè della perpendicolarità dei due fusi omosessuali, nella prima divisione di maturazione del microgamete e nella seconda del macrogamete. Questo fatto sembra avere una importanza, messo insieme coll' altro che nell' ultima divisione, l' unica in cui i fusi eterosessuali si trovino vicini, l' orientazione è invece sullo stesso asse.

Mi posi dunque alla ricerca di nn metodo per misurare l'angolo fatto dagli assi dei fusi cariocinetici. Evidentemente l' osservazione diretta dei preparati non dice molto a qnesto proposito, perchè i fusi capitano irregolarmente orientati rispetto all' asse del microscopio, e solo in casi eccezionali si può giudicare dell' angolo che fanno tra loro, cosi a semplice sguardo, quando essi capitino ambedue perpendicolari all' asse del microscopio, od uno perpendicolare e l' altro parallelo. In questi casi l' impressione è nettissima, che siano essi tra loro perpendicolari; ma meglio resulta, anche in questi casi, la cosa dalle misure. — Determinazioni di questo genere richiedono in primo lnogo che i preparati su cui sono fatte, siano per quanto è possibile soddisfacenti a certe condizioni. Le Opercularie non devono essere tropo contratte dai reagenti, nè compresse dai vetrini. Quanto alla prima cosa, una buona fissazione, e passaggi molto graduati nei varî reattivi, servono all' nopo; quanto alla seconda condizione, bisogna non appoggiare i due vetrini nno sull' altro, ma interporvi qualche cosa, dei capelli per esempio. Ma per poter osservare in queste condizioni le Opercularie mediante i più forti ingrandimenti, è anche necessario di ricorrere al metodo dell' attaccamento spontaneo sul coprioggetti, come è descritto nella parte tecnica. Questi preparati è anche bene che siano inclusi in balsamo, non in glicerina; le misure si fanno dopo qualche giorno che il preparato è chiuso, cosi il balsamo essendosi nn poco addensato, non è possibile che le Opercnlarie si muovano, nell' osservazione coll' immersione.

Quanto alle misure esse non offrono nessuna difficoltà di principio, ma solo qualche difficoltà tecnica, data la piccolezza degli oggetti da misurare. Servendomi sempre dei più forti obbiettivi ad

immersione, ho proceduto alle determinazioni seguenti: la lunghezza degli assi, quale appare misurata col micrometro ocnlare, ossia la proiezione orizzontale di qnesta lnnghezza; la proiezione verticale, servendomi della vite micrometrica del microscopio; mettendo in fuoco prima un estremo dell' asse fusoriale, e poi l' altro, si leggono due numeri nella graduazione della vite micrometrica. La loro differenza si moltiplica poi per un coefficiente — nel nostro caso vicinissimo ad 1, esprimente il rapporto tra l' indice di rifrazione nel balsamo del Canadà e nell' olio di cedro. Così, adoperando obbiettivi forti ad immersione, si misura con snfficiente esattezza anche la proiezione verticale. Infine misuro l'angolo fatto dalle proiezioni orizzontali degli assi dei due fusi, e ciò col seguente procedimento: adoprando l' oculare micrometrico, faccio coincidere colla direzione delle linee della graduazione l' asse di uno dei fusi. Poi, girando il tavolino del

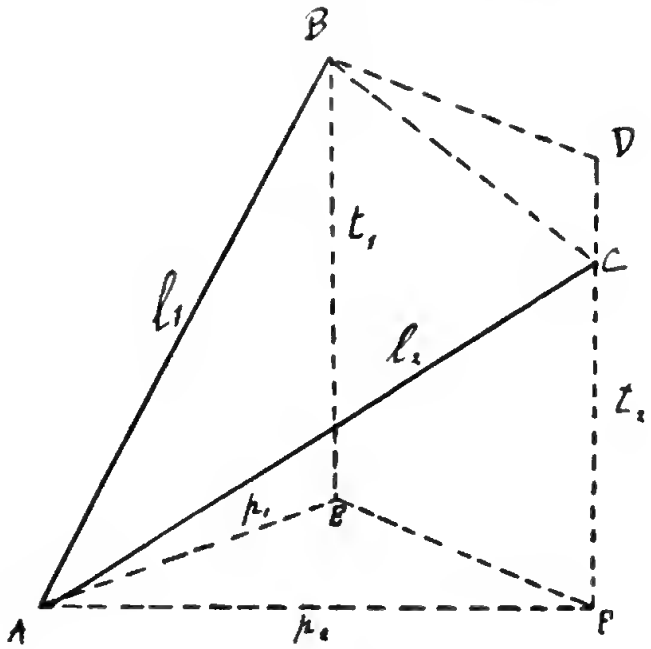


Fig. 2.

microscopio — munito di graduazione angolare, — arrivo a far coincidere con quella direzione l' asse dell' altro fuso. L' angolo di cui ha ruotato il tavolino è uguale all' angolo fatto dalle dne proiezioni orizzontali. Così procedevo nelle prime misure; poi modificai di poco l' nltima determinazione, per renderla più spiccia: lascio fermo il preparato ed il tavolino; faccio invece rnotare l' oculare, insieme

colla parte superiore del microscopio, la quale presenta nn' avvitatura al principio della parte più grossa del tubo; in corrispondenza di tale avvitatura ho fatto, nel microscopio, nn' apposita graduazione, servendomi di quelle piccole tacche che si trovano nell' apparecchio — almeno nei più usuali modelli — in quel punto. L' angolo di rotazione fatta corrisponde sempre a quello delle proiezioni degli assi.

Con queste tre serie di misure l' angolo fatto dai due assi resulta determinato; e si calcola nel modo seguente. Suppongo di trasportare nno degli assi parallelamente a sè stesso, finchè uno dei suoi vertici coincida con un vertice dell' altro; indico con α l' angolo fatto dai due assi, con β quello delle proiezioni orizzontali; con l_1, l_2 le lunghezze degli assi, con p_1 e p_2 respettivamente le loro proiezioni orizzontali e verticali; e completo il rettangolo $BEFD$. Allora resnltano dalle proprietà dei triangoli rettangoli ABE, ACF e BCD e da quelli non rettangoli AEF e ABC, le uguaglianze segnenti:

$$l_1^2 = p_1^2 + t_1^2;\ l_2^2 = p_2^2 + t^2_2$$
$$(BC)^2 = (BD)^2 + (DC)^2 = (EF)^2 + (t_1 - t_2)^2$$
$$(EF)^2 = p_1^2 + p_2^2 - 2 p_1 p_2 \cos\beta$$
$$(BC)^2 = l_1^2 + l_2^2 - 2 l_1 l_2 \cos\alpha$$

Da queste formnle deriva, sostituendo nell' ultima i valori di l_1 ed l_2 dati dalle prime due, e qnello di $(BC)^2$ dato dalla terza e quarta, e riducendo:

$$\cos\alpha = \frac{p_1 p_2 \cos\beta + t_1 t_2}{\sqrt{(p_1^2 + t_1^2)\ (p_2^2 + t_2^2)}}$$

Come si vede, la formula dà due valori per il cos α, i quali differiscono solo per il segno; ossia essa dà insieme i coseni dei due angoli supplementari formati dagli assi in qnestione, ciò che per noi non ha nessnn interesse, limitandoci sempre a prendere il valore positivo, ossia l' angolo minore di 90°. Su un altro punto è anche da fare attenzione; che t_1, t_2 hanno lo stesso segno quando come nel caso della nostra figura i dne assi hanno gli estremi liberi ambedue dalla stessa parte del piano AEF; ma se iuvece si dà il caso contrario, allora essi devono essere evidentemente presi con segno diverso, ciò che porta nella formula una differenza; il loro prodotto nel numeratore acquista il segno negativo, anzichè quello positivo.

Prima di riferire i resnltati numerici, sarà bene riportare un esempio completo, onde il lettore possa acquistare una idea precisa

della cosa. Le lunghezze degli assi siano AB ed $A'C$, riportandoci alla figura di sopra, e convenendo che A ed A' siano quei vertici che vengono a coincidere, collo spostamento di un asse parallelamente a sè stesso. Nell' esempio che riportiamo, si tratta di un microgamete, e precisamente di quello del quale un fuso è rappresentato nella Fig. 13. Le misure hanno dato:

$$AB = \mu\, 7{,}75 \quad A'C = \mu\, 9{,}3 \quad \text{angolo } BAC = 79{,}6^{\circ}$$
$$A = 9{,}1 \quad B = 8{,}9 \quad A' = 4{,}8 \quad C = 7{,}1$$

Nell' ultima riga sono indicati, per ciascun vertice di ciascun asse, i numeri letti nella graduazione della vite micrometrica (grande stativo per la microfotografia, di ZEISS, ultimo modello). Siccome A ed A' sono i vertici che vengono a coincidere, e passando da A a B l' asse del fuso è diretto verticalmente da una parte, mentre passando da A' a C é diretto dall' altra parte del piano orizzontale passante per A (piano AEF — infatti mentre è $B < A$, $C > A'$), il prodotto delle proiezioni verticali va qui preso col segno negativo. Quanto al valore in micron di queste proiezioni, esso è dato dalla differenza di altezza dei due fuochi (per il primo asse, 9,1—8,9 = 0,2) moltiplicata per il valore in micron di ciascuna divisione nella graduazione della vite micrometrica — ossia moltiplicata per 2 — e moltiplicata ancora per un coefficiente, poco diverso dall' unità, il quale si ottiene facendo il rapporto tra l' indice di rifrazione della sostanza in cui si trova l' oggetto da misurare (balsamo del canadà) e quello della sostanza in cui avviene lo spostamento dell' obbiettivo (olio di legno di cedro). Applicando la formula, si ottiene dall' esempio citato, il valore di $\alpha = 89^{\circ}$. Si noti che in questo caso i due assi erano un poco differenti di lunghezza, come resulta dai numeri (tanto la proiezione orizzontale che la verticale del secondo è maggiore di quella del primo), ma questo fatto che si verifica in grado piccolissimo di solito, dipende da una circostanza particolare del caso riportato, ove, come verrà detto poco sotto, uno dei fusi era allungato in direzione delle fibre, l' altro nella direzione perpendicolare.

Riporto ora i resultati numerici delle determinazioni fatte nei microgameti. Si tratta sia dei fusi primarî, sia dei fusi secondarî, sempre in tale stadio che la forma sia quasi sferica, o pochissimo allungata; le misure riguardano la prima divisione di maturazione. Il caso citato sopra è compreso nella lista. Fatto il calcolo, si son soppresse sempre le frazioni di grado, segnando il numero più vicino al resultato effettivo. I varî casi sono ordinati per valori decrescenti:

90° 89° 89° 86° 86° 86° 86° 84° 83° 82° 81° 80° 77° 77° 77° 76° 76° 75° 75° 72° 71° 66° 65° 65° 64° 59° 56° 56° 55° 55° 54° 52°.

E per la seconda divisione nel macrogamete:

84° 84° 78°.

A qneste si aggiungono alcune altre determinazioni, fatte nelle prime ricerche, sn preparati che non erano stati fatti appositamente per qnesto scopo; in essi non si era eliminata la possibilità di nna compressione delle Opercnlarie; gli individni scelti per le misure non mostravano però traccia di compressione; si tratta della prima divisione di maturazione nel microgamete:

84° 83° 76° 56° 56° 48°.

Infine, riporto alcune misnre fatte in altri stadî, nei quali vi era il fuso primario allungato più o meno:

75° 50° 48° 32° 29° 21° 10°.

Abbiamo in tntto 41 caso per le misure nello stadio di fuso non allungato e 7 casi per altri stadî. Questi 7, come si vede, mostrano che non esiste nessuna regola dal momento che gli angoli variano da 75° a 10°.

Nello stadio delle piastre equatoriali invece, nessuno dei casi misurati — e sono 41 — ha indicato l'esistenza di un angolo, trai due assi, inferiore a 45°; anzi il più piccolo angolo misurato è di 48°; vi sono 12 casi sopra 80°, ed in tutto 27 casi sopra 70°. Ora se nessuna forza vi fosse che tendesse a orientare qnesti assi tra loro, evidentemente sopra 41 casi non sarebbe possibile che tutti fossero compresi tra 45° e 90°. Se una tale tendeńza esiste, noi siamo portati a ritenere che essa non consista in nna orientazione trai 45 e i 90°, bensi in una forza che orienterebbe i due assi in direzione perpendicolare tra loro, se non vi fossero degli ostacoli ed impedimenti; a qnesto concetto siamo portati da due argomentazioni; prima, dal fatto che nelle misure stesse, in seno a questo angolo compreso trai 45° e i 90°, sovrabbondano i casi che si avvicinano, anche in modo veramente mirabile, ai 90°; in secondo luogo, le forze capaci di manifestarsi con una tendenza all'orientazione, in dne corpi simmetrici rispetto a un asse e al piano equatoriale, e girevoli, agiscono per ragione di simmetria in tal modo da tendere a produrre una orientazione parallela o perpendicolare.

Posso poi aggiungere i resultati delle osservazioni fatte sul vivo, le qnali non sono riducibili in numeri, trattandosi di oggetti in continuo movimento, ma sono molto caratteristiche. Nello stadio di fuso pochissimo allungato, che corrisponde a quello delle misure fatte, i dne nuclei maschili ed i dne femminili quando è il loro turno,

appaiono come orientati ad angolo retto, orientazione che conservano nonostante i movimenti della cellula; l'osservazione è più caratteristica per i nuclei femminili, che sono travolti in continuo movimento nel corpo cellulare; accade talvolta che essi si disorientino, in seguito a qualche impulso; ma tosto assumono nuovamente la posizione di prima in cui si mantengono a lungo e specialmente quando i movimenti generali sono poco accentnati. Essi si mantengono sempre assai ravvicinati tra loro.

Si conclude dunque che esiste nna forza tendente a fare orientare i fusi mitotici in direzione perpendicolare. Prima di pronunciarci su questa forza, vogliamo escludere una possibilità la quale potrebbe facilmente venire in mente. Si potrebbe pensare che le condizioni di spazio tendessero a produrre questa orientazione, data la forma allungata dei fusi. Ma una simile supposizione non regge. In primo luogo abbiamo accennato che tra le varie misure fatte ve ne sono alcune i cui soggetti erano sensibilmente sferici; ed anzi sono tra le misure più favorevoli.[1]) In secondo luogo vi è un caso nel quale uno dei fusi era allungato nella direzione delle fibre, e l'altro in direzione perpendicolare; se la forma allungata dei fusi fosse la causa dell'orientamento, in questo caso l'angolo doveva essere di 0°; ed invece era di 89°; infine, nel macrogamete non potrebbe in nessun modo reggere una supposizione di limitazione di spazio o simili, giacchè i fusi natano nel plasma, muovendosi in tutti i versi, travolti dalle correnti protoplasmatiche.

Siamo perciò portati a credere che una forza agisca trai dne fusi vicini.

3. Ipotesi per spiegare le orientazioni dei fusi mitotici.

È impossibile precisare la natura di questa forza, ma possiamo ricercare le condizioni in cui essa agisce. Desidero essere completamente obbiettivo in queste interpretazioni, enunciando alcune ipotesi, riunite in due gruppi che si escludono a vicenda.

1ª ipotesi. L'orientazione perpendicolare è connessa colla

---

[1]) Il fuso, nella mitosi, è nna struttura, e se è vero che l'origine della parola sta nella usuale forma a fuso, è anche vero che ormai si dice fuso mitotico, senza pensar troppo ai dettagli di questa forma, anche se essa è sferica o allungata per l'altro verso; e il dire „fibre divergenti del fuso", per quanto una contraddizione in termini, mi par sempre il miglior modo di esprimere la cosa senza introdurre perniciosi neologismi.

omosessualità dei fusi vicini, e la orientazione sullo stesso asse, nell' ultima divisione, colla eterosessualità.

2ª ipotesi (subordinata alla prima). Esiste in ciascun fuso una carica potenziale, e di segno contrario in ciascun sesso; a queste cariche si devono i fenomeni di orientamento, per la repulsione delle cariche omonime e attrazione delle cariche eteronime (come se si avessero due sfere cogli assi carichi di elettricità positiva o negativa: se le sfere son tenute a contatto, ma girevoli, gli assi si dispongono parallelamente se le cariche sono eteronime, e come i fusi cariocinetici omosessnali, se le cariche sono omonime). Esisterebbe insomma un potenziale sessuale — il quale si formerebbe in individui che sorgono per divisione da uno privo di queste cariche (divisione sessnale); il fenomeno ricorda l' elettrizzazione eteronima contemporanea di due corpi strofinati.

Di fronte a queste ipotesi, poniamo queste altre:

3ª ipotesi. L' orientazione perpendicolare dei fusi omosessnali è un fenomeno connesso colla mitosi, indipendentemente dal sesso. L' orientazione snllo stesso asse, nell' nltima divisione, ha ragioni particolari, forse connesse colla sessualità, o meglio con quel determinato momento della coningazione.

4ª ipotesi (subordinata alla 3ª). Esistono in ciascun fuso mitotico cariche potenziali tendenti ad orientarli in direzioni perpendicolari. L' orientazione speciale dell' nltima divisione, si deve a condizioni particolari, ed è resa possibile dalla connessione intima di due poli, uno di ciascun fuso (cfr. Fig. 24).

Ed ora, è necessario qualche raffronto colle teorie dinamiche della mitosi (Gallardo, Rhumbler 03). Si è supposto che in essa agiscano forze newtoniane, e che nei centrosomi esistano due poli di segno contrario, rappresentando le fibre fusoriali ecc., linee di forza delle cariche. Questa ipotesi è contraddetta nettamente — per ciò che riguarda la diversità di segno dei poli situati nei centrosomi, dalle mitosi pluripolari (cfr. Rhumbler 03), come si può snbito intendere dato che queste hanno una simmetria nella quale tutti i poli (centrosomi) si mostrano equivalenti. Ora essa è contraddetta anche dalla direzione perpendicolare dei fusi vicini in *Opercularia;* di più essa non tien conto di alcuni stadî, in cui fibre vanno dai centrosomi ai cromosomi sitnati in massa da parte (prima che i centrosomi abbiano assunto la posizione polare, in molte mitosi); questi stadî anzi mi pare siano stati fino ad ora poco presi in considerazione a questo proposito. Infine, essa non spiega l' allontanamento dei centro-

somi, che, siano due o più, tendono a porsi più lontani che sia possibile.

La repulsione dei fusi (orientazione perpendicolare) e questa dei centrosomi mi hanno suggerito l'idea che si tratti nella mitosi di forze newtoniane, simili alle elettriche e magnetiche, e come esse a due segni, ma con una disposizione dei poli diversa da quella finora supposta, nella quale sembrami che si sia dato troppa prevalenza al centrosoma. Due poli omonimi nei centrosomi, ed uno eteronimo nel cerchio equatoriale (specialmente dovuto a cariche dei cromosomi), posson sostituire nei riguardi delle linee di forza due poli eteronimi situati nei centrosomi; si conciliano colla presenza di mitosi pluripolari, spiegano la repulsione trai centrosomi, spiegano meglio delle altre ipotesi l'avvicinamento dei cromosomi verso i centrosomi (ed il loro distacco), rendon conto delle linee di forza tra centrosomi e cromosomi negli stadî precedenti la piastra equatoriale, ed infine fanno presumere l'orientamento in direzione perpendicolare dei fusi messi in vicinanza, come nel caso delle divisioni di maturazione dell' Opercularia. L'orientamento delle ultime divisioni, sullo stesso asse, sarebbe dovuto all'unione di due poli (appartenenti ai due fusi) in uno solo; ne deve seguire un tale orientamento, da rendere le altre parti dei fusi lontane quanto è possibile. E ciò è infatti.

Mi sembra che questa teoria, mentre prende in considerazione alcuni fatti in più delle precedenti, e specialmente questi nuovi fenomeni di orientamento da me osservati, non urti, come quella dei due poli di opposto segno nei centrosomi, nelle obbiezioni portate dall'uguaglianza del loro comportamento. RHUMBLER (03) ha vinto queste difficoltà, pensando a forze newtoniane che non abbiano due poli — nord e sud — come le attrazioni magnetiche; mi sembra però che la mia ipotesi non offra quelle difficoltà da cui esso è partito, e che meglio si accordi coi nuovi fatti.

Bastino questi cenni. La trattazione completa dell'argomento potrebbe farmi introdurre in questo scritto una parte altrettanto lunga quanto è esso attualmente, ed uscire completamente dal campo e dagli scopi delle presenti ricerche. La rimando perciò ad altra occasione.

Il contrasto che esisterebbe trai nuclei eterosessuali secondo l'ipotesi 2ª andrebbe d'accordo anche con alcune ricerche citologiche, di AUERBACH, il quale avrebbe riscontrato una colorabilità antagonistica nei pronuclei maschile e femminile, di fronte a colorazioni doppie — se queste osservazioni, che sono state in parte criticate da R. HERTWIG (92) — si confermino.

Naturalmente, l'idea di un contrasto trai due sessi, di qualunque natura esso sia, riceverebbe invece un colpo forte quando si dimostrasse ciò che taluni hanno affermato (p. e. Jickeli 84), che si possono eccezionalmente coniugare due microgameti tra loro. Le osservazioni che sono citate a questo titolo sono però affatto superficiali, esse non riguardano per nulla la copulazione nucleare, nè dimostrano affatto che da una simile unione di microgameti sia derivato un individuo atto a vivere. Si tratta evidentemente di fusioni plasmatiche, forse in microgameti in qualche modo alterati, fenomeni insomma che non hanno alcuna importanza dal punto di vista che ci occupa, e possiamo affermare, senza tema di cadere in errore, che, dovunque vi è una differenziazione sessuale, soltanto trai due sessi differenti è possibile la fecondazione.

VIII. Il differenziamento sessuale nella Vorticella microstoma (Ehrbg.).

Questa specie non presenta la facilità di coltivazione della *Opercularia coarctata*, ma si presta assai per gli studî sulla coniugazione, perchè epidemie insorgono assai facilmente colle solite condizioni alimentari. Essa si presenta come è noto sotto aspetti assai varî, tanto che il Fauré-Fremiet (05, 2) la ha identificata con un' altra supposta specie, la *V. hians*. — Io ho fatto culture continuative, partendo da un unico individuo isolato; come alimento, il solito infuso di fieno, ma mescolato con acqua bollita, quest' ultima in discreta quantità. Soltanto nelle culture molto ricche si può senza pericolo dare un infuso assai concentrato, certamente perchè esse possono più efficacemente lottare contro l'eccessivo sviluppo batterico.

Volli verificare la questione del differenziamento dei macrogameti, osservata nella Opercularia. La produzione dei microgameti è nella *Vorticella microstoma* un poco più semplice, essi derivano per gemme che si staccano direttamente, ossia senza dividersi susseguentemente in due o in quattro, come nell' altra specie studiata. Però da un individuo possono derivare parecchi microgameti, successivamente.

Gli esperimenti son stati condotti collo stesso metodo, isolamento di individui comuni, più microgameti; d' altra parte isolamento di individui che stanno formando un microgamete, soli, o coll' aggiunta di altri microgameti estranei. I resultati non sono stati così costanti come nell' Opercularia, nel senso che la prova positiva anzichè sicura

è soltanto probabile; la prova negativa è ugualmente sicura. In altre parole, non son mai riuscito ad avere coniugazioni, adoperando individui comuni; sono rinscito ad averle servendomi di individui aventi a lato il microgamete in formazione, ma non son riuscito sempre. Ciò non costituisce alcuna differenza sostanziale, quando si consideri, che la resistenza, in questa specie, alle condizioni variate è molto inferiore che nell' *Opercularia*. La *Vorticella microstoma* offre una buona percentuale di perdite, quando si fanno esperimenti di isolamento, anche colla maggior cura; quando si trasportano individui in una piccola goccia, spesso essi si distaccano dal peduncolo, per andare a fissarsi in un altro posto; tutte cose che coll' *Opercularia* si evitano facilmente.

Anche nel caso della *Vorticella microstoma* ho osservato la divisione dei macrogameti, indipendentemente dalla coniugazione, ciò che avviene anzi assai facilmente negli esperimenti non rinsciti di coniugazione. Ma in sostanza la conclusione generale che gli individui comuni non possono fungere da macrogameti, e quelli che hanno formato microgameti, sì, si mantiene rigidamente. Anche qui ho osservato che un gran numero di coniugazioni si formano — nelle culture madri — su quegli individui che hanno ancora attaccato il microgamete, ciò che è sempre conferma della stessa cosa. Certamente forme di questo genere devono essere state vedute dai più antichi osservatori, ma certamente sono state confuse con produzione successiva di microgameti. Non ne ho trovati accenni nella letteratura. Ad evitare la confusione, oltre lo studio diretto con forti ingrandimenti, vale il decorso dell' insieme, di cui ci si assicura coll' isolamento.

Un altro curioso fenomeno si riferisce ai microgameti. Mi è capitato di vedere molti microgameti attaccati reciprocamente in gruppi, come se si volessero coniugare. Però ho potuto seguire il loro destino e constatare che essi vanno a morire. Anzi, suppongo che le descrizioni date da autori specialmente antichi di eventuali possibili coniugazioni tra due microgameti, altro non siano che il resultato di osservazioni simili a questa ma più incomplete. Perchè poi questi microgameti vogliano morire in compagnia, naturalmente non posso indovinarlo.

Su questa specie, che è facile tanto ad incistidarsi che a coniugarsi, ho trovato campo propizio per studiare quali condizioni producano l' uno, e quali l' altro dei due fenomeni. È noto infatti che condizioni dello stesso genere sono spesso invocate come causa di tutti e due, p. e. il digiuno da R. HERTWIG (1899), mentre altre

volte è il disseccamento che si palesa come causa dell' incistidarsi. Ricordo però a qnesto proposito, che una cosa non esclude l' altra; p. e. nel *Colpoda Steinî*, il quale notoriamente si incistida per disseccamento, nelle mie cnlture si formavano cisti durature anche in segnito al solo digiuno, esclnso ogni disseccamento.

Nella *Vorticella microstoma*, è il digiuno che produce le cisti e le coniugazioni; ma sono due forme particolari, differenti, di digiuno: se si pongono delle Vorticelle ben nntrite in nn liqnido poverissimo di alimento, si producono le cisti, raramente coniugazioni; se invece si rende rigogliosa una cultura, dandole sempre nnovo alimento, la scarsezza di cibo causata non da povertà del liqnido, ma dall' eccesso numerico degli Infusorî, provoca coniugazioni, e non incistidamento. Si conclude perciò che la prodnzione delle cisti è in relazione colle condizioni chimiche del liquido, colle sostanze in esso disciolte; invece il prodursi delle coningazioni è in rapporto col fatto in sè della mancanza di cibo — dopo alimentazione abbondante, si capisce. Quando si trasportano le Vorticelle in un ambiente povero di sostanze disciolte, allora l' incistidamento prende il sopravvento sopra alle coniugazioni, che pnre possono in piccolo numero formarsi. Questo resultato, che si presenta molto netto, costante, negli esperimenti, ci rende conto del disincistidamento, nelle cisti che son poste in un ambiente liqnido ricco di sostanze disciolte; è sempre una influenza chimica, in nn senso o nel senso opposto; la produzione delle coniugazioni, ha come si vede un meccanismo ben diverso.

Di quali sostanze disciolte si tratti, è facile capirlo, pensando che gli infusi i quali hanno l' influenza di impedire l' incistidamento o di farlo cessare, sono infusi ricchi su cni può vegetare una microflora ed una microfauna abbondante; si tratta dunqne di quelle sostanze — senza precisarne la natura chimica — che son capaci di nutrire le vittime dei pasti delle nostre Vorticelle.

Il fatto che generalmente negli ambienti culturali si sovrappongano le due condizioni, di ricchezza di queste sostanze disciolte, e ricchezza di microflora e microfauna, — o reciprocamente povertà dell' una e dell' altra delle due condizioni, spiega come spesso ci si trovi impacciati a capire la ragione per cni si produce incistidamento o coniugazioni, in casi apparentemente simili. Non voglio però con questo generalizzare affatto questo concetto, giacchè è noto che l' incistidamento ha svariate cause determinanti, e tra qneste, p. e., sta anche la temperatura, come ha mostrato R. Hertwig per il *Dileptus gigas*, (04) e Smith per l' *Actinosphaerium Eichhorni*.

IX. Il differenziamente sessuale nel Carchesium polypinum (EHRBG.).

Come in altro punto ho accennato, gli esperimenti che ho fatto con questa specie non mi hanno condotto a resultati definitivi. L'impossibilità di trovarla adesso uelle vicinanze di Bologna mi fa rimandare ad uu'epoca indetermiuata il completamento di questo studio, e mi spinge a riferire le osservazioni che ho fatto fin qui, e che pure ad alcune conclusioni conducono. Lo scopo della ricerca era ancora quello di determinare se, come avevo riscontrato nell' *Opercularia coarctata*, e come trovai poi auche nella *Vorticella microstoma*, esista nel *Carchesium* pure una „divisione sessuale". Le difficoltà di allevamento non mi hanno permesso negli esperimenti fatti, di servirmi di una cultura continuativa, nè derivata da un individuo isolato. Cominciai a trovare microgameti in rami di *Carchesium*, il 17. 4. 06. Siccome io mi aspettavo di trovare le coniugazioni in questi stessi rami, in vicinanza dei microgameti, osservai attentamente ed a più riprese; ma senza nessun resultato positivo; chè anzi, trovai parecchie coniugazioni in altri rami, dove non erauo microgameti; allora isolai alcuni rami con microgameti, e li osservai per tutta una giornata; i microgameti si staccarono, girarono attorno agli altri individui, ma non entrarono in coniugazione. Contemporaneamente, unii un ramo con microgameti, ed uno contenente uua coniugazione. Dopo meno di un'ora, essendosi staccati alcuni microgameti, osservai una coniugazione di più nel ramo che ue aveva prima una. E questo fu tutto il resultato.

Il 24. 4. 06, ad ore 15, isolo un ramo di circa 50 individui, in cui sono dne grnppi di microgameti, ed uno in formazione, in rametti differenti, ed insieme ad esso pongo un altro rametto, di 20 individui, con una coniugazione. Il 25 a ore 8, il rametto di 20 ne ha 33, con 6 coniugazioni, una delle quali con due microgameti; il ramo di 50 non ha più microgameti, ma nemmeno coningazioni. Fino ad ore 21, nulla di mutato, tranne l'aumento numerico degli individui; alle 21 le coniugazioni non sono ancora terminate, e nel ramo che aveva ieri microgameti, vi è un gruppo di piccoli individui, dall' aspetto caratteristico che precede la formazione dei microgameti. Il 26 ad ore 8,30 vi sono parecchi microgameti in giro, ed ancora uno nel ramo che fino allora era stato maschile. Nell'altro ramo le coniugazioni sono finite e non ve ne souo di nuove. I rami principali vanno poi accidentalmente perduti. Si seguitano le osserva-

zioni coi ramettini che si erano formati nel frattempo, da individui che si erano staccati dai rami, ed attaccati al vetrino. Alle ore 10 noto un individuo fisso al vetro e non ancora ramificato, cui un microgamete si accosta: alle ore 12,30 esso è in coningazione. Nulla di interessante fino al 1° Maggio; in questo giorno ci sono molti ramettini, alcuni nentri, altri esclusivamente maschi, altri esclusivamente femmine. Hanno questi, microgameti o coniugazioni, rispettivamente, in più posti. Se ne isolano alcuni, dei quali nessnno nei giorni snccessivi cambiò sesso, ma nessuno ebbe anche vita più lunga di due o tre giorni in buone condizioni. Anche la cultnra principale d'esperimento verso il 9. 5 cominciò a deperire.

Ripetuti molte volte qnesti esperimenti, ebbi sempre ugnali resultati, coustatando che erano sempre unisessuali rami piccoli o grandi fino a contenere alcune centinaia di individni; e dico rami, nel senso, ben si capisce, che si tratta di gruppi derivati ciascuno da un solo individno. Una sola volta mi accadde di trovare una coniugazione in un ramo isolato il giorno precedente, con 2 gruppi di microgameti in formazione e circa 50 individui. Il valore di questa eccezione, che ho riferito per scrupolo di coscienza, nou saprei affatto definirlo; essendo nn caso solo, di fronte a molte diecine di isolamenti e centinaia di rami sempre constatati nnisessuali, mi è anche sorto il dubbio che si sia trattato di qnalche errore di osservazione.

Qnanto alla interpretazione delle cose vedute, evidentemente esse uon dicono niente riguardo alla soluzione del problema proposto. Esse esprimono però qualche cosa di sicuro, rispetto alla differenziazione sessuale nel *Carchesium*, dicono che nelle colonie esistono rami maschili, rami femminili e rami neutri. Solo nna volta parve, se nou fu un errore, che un ramo maschile si trasformasse in ramo femminile. Con ciò si viene a dire che certamente i microgameti uon sou cosi legati da parentela coi macrogameti, come nell'*Opercularia coarctata* e nella *Vorticella microstoma*. Se una divisione sessuale esiste, nel senso che abbiamo dato a questa espressione, essa deve essere molto precoce; qnando un individuo si fissa e proliferando forma un ricco ramo, dovrebbe già essere differenziato in un sesso, ciò che si accorderebbe col fatto di aver trovato individui appena fissati, e non divisi, già in coniugazione con microgameti estranei; ma non con quanto abbiamo osservato nelle altre specie studiate, che un macrogamete, qualora non si coniughi, torna nentro, ossia capace di dividersi sessualmente un'altra volta, esso od i suoi discendenti. Qui, dove abbiamo rami che

sono maschili o femminili, soltanto in quanto contengono alcuni individui così differenziati, non possiamo ritenere che tutti gli altri lo siano di necessità — gli altri, che seguitano a dividersi, e possono, distaccandosi dal ramo, formare nuove colonie. D'altra parte il differenziamento di un intero ramo in un sesso mal si intenderebbe senza supporre che fosse già differenziato l'individuo che gli ha dato origine. Sì che saremmo tentati di supporre che il differenziamento sessuale si intrecci in modo assai complesso colla possibilità di perdere le caratteristiche di questo differenziamento.

Come conclusione di fatto, ci contentiamo di affermare che un ramo anche grosso, derivato da un individuo, non contiene mai contemporaneamente micro e macrogameti, sebben i macrogameti anche qui non siano distinguibili dagli individui comuni.

Evidentemente non a differenze di condizioni esterne subite si può attribuire questo fatto, perchè in una grossa colonia, dove ciascun ramo ha un sesso solo, è impossibile ammettere che gli individui dei rami vicini abbiano subito condizioni più differenti di quelle dei singoli individui di un sol ramo.

Per quanto ho potuto trovare nella letteratura, è solo il PLATE (88) che ha fatto qualche osservazione del genere in un Vorticellide coloniale *(Lagenophrys)* nel quale ha visto molti rami che pareva fossero dedicati solo a fornire microgameti, ed altri nei quali osservava coniugazioni; ma naturalmente queste osservazioni hanno un valore limitatissimo, dato che non sono controllate coll'esperimento; di più devonsi anche avere dei dubbî quanto al riconoscimento delle forme, perchè l'A. ha talora evidentemente preso stadî della coniugazione, per stadî di formazione dei microgameti; infatti descrive la formazione dei microgameti con frammentazione del macronucleo, la quale corrisponde esattamente a quanto si sa oggi avvenire nella coniugazione.

X. La degenerazione senile.

La questione della degenerazione senile degi Infusorî, la quale ha una importanza grande di fronte ai problemi della biologia generale, voglio trattare qui un poco più estesamente di quanto abbia fatto fino ad ora nelle mie precedenti note, che avevano un carattere essenzialmente sperimentale; e mi propongo di far ciò,

perchè ritengo colle presenti ricerche la qnestione sia definitivamente esanrita.

Il concetto dell' invecchiamento degli Infnsorî si basa principalmente sni classici esperimenti del Maupas, il quale non ha potuto coltivare qnesti Protozoi in piccole culture (ove non si osservavano coniugazioni) a lnngo, indefinitamente; fenomeni degenerativi sopraggiungevano dopo alcnne centinaia di generazioni. L'idea ha incontrato molto nel mondo scientifico, perchè si accordava colle nostre conoscenze sulla morte negli organismi superiori. In altro articolo (Enriques 07, 2) ho illustrato come la necessità della morte si sia probabilmente sviluppata in consegnenza o in accordo con altre due condizioni: differenziamento morfologico e, condizione prima, diminnzione delle capacità assimilatrici. Il concetto della morte non si deve estendere per il solo desiderio di estenderlo — dagli organismi superiori ai Protisti — se non è dimostrato in questi ultimi direttamente. Quanto alla dimostrazione data dal Maupas, io oppongo i seguenti fatti:

1° Culture derivate da un solo individuo Infusorio possono mantenersi in buone condizioni per centinaia e centinaia di generazioni, purchè siano osservate alcune norme tecniche (Enriques 05) — all' infuori di coniugazioni o di azioni stimolanti.

2° Mancanza di attitndine alla scissione, degenerazione e morte della cultnra si osserva dopo pochissime generazioni, nelle culture nelle quali si sia coscientemente anmentata la qnantità dei batterî e dei loro prodotti — soprattntto die questi — (Enriques 03, 05). Le degenerazioni che in tal caso si producono sono esattamente uguali a quelle descritte dal Maupas, e siccome nelle culture di qnesto sperimentatore non era sufficientemente provveduto al cambiamento del liquido, ne segue che a questo fatto — fonte di eccessivo svilnppo batterico, si deve attribuire il fenomeno della degenerazione da lui riscontrato.

3° La coniugazione non si produce soltanto dopo lunga serie di generazioni agame, la qnale abbia prodotto una maturità sessnale e la necessità del ringiovanimento. Essa si pnò produrre anche dopo pochissime generazioni. Questa conclnsione che resnlta dalle presenti ricerche, è l' ultimo colpo alla teoria della degenerazione senile.

4° Per determinare la coniugazione in una cultnra, occorrono condizioni particolari, ma esclusivamente

condizioni di ambiente, tra le quali prima di tutte quella del digiuno dopo ricca alimentazione, come è stato chiaramente messo in evidenza dalle ricerche del MAUPAS, e di altri. Però dagli esperimenti che io ho fatto qualche cosa di più è resultato, in quanto sempre nuove condizioni appaiono, come determinanti o necessarie, sempre nuove condizioni, ma puramente esterne. Così quella, nel *Colpoda Steinî*, della necessità di trovarsi gli Infusorî in uno strato verticalmente sottile; solo in questa condizione si possono coniugare.

Quanto a ciò che è detto nel numero 3, il BÜTSCHLI (76), nelle sue ben note ricerche sulla coniugazione degli Infusorî, aveva già ottenuto coningazioni dopo alcuni giorni che in un vetrino eran stati dei Parameci exconiuganti; esperimenti che però non valsero ad impedire che il MAUPAS elaborasse e il mondo scientifico accettasse il concetto della preparazione attraverso a molte generazioni agame, alla maturazione sessuale. Non molto più dunque varranno le analoghe ricerche di JOUKOWSKY fatte nello stesso modo sugli stessi Infusorî. Le mie ne differiscono in due punti, sia in quanto esse si riferiscono a parecchie specie di Infusorî, appartenenti a gruppi molto differenti, sia perchè è da questi esperimenti resultato che esattamente le stesse condizioni che producono l'epidemia di coniugazioni in grande, la producono in piccolo, nei pochi e prossimi discendenti da pochi exconiuganti o da uno solo; mentre altrimenti coniugazioni non si producono. Per ogni verso dunque vediamo che solo le condizioni esterne sono capaci di indurre gli Infusori in coniugazione, essendo a questo riguardo indifferente che molte o poche generazioni li separino dalle coniugazioni precedenti, o che essi siano o no tra loro prossimi parenti.

Dobbiamo ora prendere in considerazione parecchi fatti e parecchie idee che sull' argomento sono state emesse, onde vedere come si accordino coi nostri resultati, e se in altre ricerche si trovino ostacoli all' accettazione delle nostre conclusioni.

BALBIANI (1891), confermato poi da JOHNSON, ha fatto l'interessante osservazione che lo *Stentor caeruleus* presenta un fenomeno di periodica atrofia e rigenerazione, in varie porzioni del suo corpo; durante queste rigenerazioni il macronucleo subisce modificazioni come all' inizio della scissione; l' A. crede che questo fenomeno serva a compensare l' usura che si produce nel funzionamento dell' Infusorio, come accade p. e. nei Parameci, i quali rigenerano parti al momento della coniugazione. Si avrebbe insomma qui, se non erro nell' inter-

pretare il pensiero dell' autore, un ringiovanimento parziale, che verrebbe paragonato a quello più profondo dovuto alla coniugazione, e che sarebbe richiesto da condizioni dello stesso genere. Che un consumo di determinati organi in determinati organismi possa aver luogo e richieda un rifacimento periodico, non lo contrasto. Io credo però che questi fenomeni, entro certi limiti diffusi nel regno animale, abbiano nulla a che fare colla coniugazione, perchè appunto la facoltà di riparare le perdite esiste nell' organismo anche indipendentemente da essa. Le osservazioni di Balbiani ci dimostrano proprio questo in maniera molto elegante. Dello stesso genere di queste osservazioni sono anche quelle di Wallengren, per le quali molti organelli sono stati visti formarsi di nuovo nei Ciliati, negli individui appena nati per scissione; però la cosa si presta bene alla spiegazione dell' A., del tutto diversa che nei casi precedenti, per la quale la neoformazione sarebbe una necessità dati i rapporti di grandezza anormali tra gli organelli antichi ed il corpo dell' Infusorio nuovo.

Le perdite nella coniugazione, ed in special modo la distruzione del macronucleo, sono prese da alcuni in considerazione, per dire che i Protozoi non sono immortali, venendo in queste parti che si distruggono rappresentato il soma dei pluricellulari. P. e. così dice Hickson, 01. Non desidero per nulla di entrare qui a discutere questa lunghissima questione di parole, dell' immortalità dei Protozoi, ma soltanto osservo che la questione è tolta, per ciò che riguarda la supposta distruzione della parte somatica, dal momento in cui è dimostrata la coniugazione non essere necessaria per la propagazione e conservazione della specie.

Un posto speciale in questa discussione meritano le ricerche di Calkins e quelle di R. Hertwig. Quanto alle prime, io credo che l' A. nei successivi lavori sempre più si discosti dalla teoria classica della degenerazione senile; in ogni modo posso osservare che i suoi esperimenti, mediante i quali esso ha potuto per molte generazioni mantenere in vita culture di Parameci a patto di assoggettarli di quando in quando a stimoli chimici od altri, non offrono per nulla la possibilità di attribuire il resultato ad una specie di partenogenesi artificiale, come vorrebbe l' autore. Egli è in ciò guidato evidentemente dal concetto che le degenerazioni — depressioni — osservate nelle sue culture siano dipendenti dalla mancata coniugazione; ma ciò non è punto di per sè evidente, tanto più che egli non ha colla coniugazione rimediato alla depressione; ora è evidente che di partenogenesi si potrebbe trattare soltanto quando gli Infusorî

depressi fossero realmente pronti alla coniugazione; e si ristabilissero senza di questa, per l'influenza di certi stimoli. Ora, non solo ciò non resulta punto dalle ricerche che l'A. ha fatto, ma resulta adesso dalle mie, che le degenerazioni osservate nelle culture derivano da azioni nocive, batteriche, come già altri autori le hanno potute produrre per azione di campi magnetici, in poche ore (CHÉNEVEAU e BOHN, GRENET). Gli stimoli, che il CALKINS fa agire, finiscono nelle sue ricerche per acquistare sempre una importanza maggiore rispetto alla coniugazione, alla quale egli nel 1902 già vuol negare l'efficacia ringiovanente, che attribuisce invece agli stimoli.

Essi occupano un posto simile anche nelle ricerche del WOODRUFF fatte su altre specie di Infusorî, ma con simile indirizzo generale. Ma quale può essere l'effetto di questi stimoli? Essi consistono in cambiamenti di ambiente o di condizioni fisiche, capaci benissimo di modificare lo sviluppo dei Batterî, o di indurre nei Parameci realmente una maggior forza per reagire a quelle condizioni sfavorevoli che nelle culture si erano palesate col fenomeno della diminuzione di attitudine riproduttrice. La possibilità di tali azioni nocive non era dal CALKINS evitata, giacchè resulta dalle mie ricerche che essa si può, alla lunga, evitare solamente quando tutti i giorni si muti il liquido alimentare agli Infusorî coltivati, dando ad essi ogni volta un infuso che si trovi nelle stesse identiche condizioni di tutti i precedenti, essendo cioè preparato di fresco — uno o due giorni prima, o magari nel giorno stesso.

Di più, sta il fatto che l'A. ha concluso colla morte dei suoi Parameci (04), nonostante le azioni stimolanti. E siccome dalle sue ricerche deduce che la coniugazione non ha effetto di ringiovanimento, ne segue che quei Parameci vengono ad essere considerati come inevitabilmente destinati a morire, a non propagare la specie oltre i limiti d'esperimento dell'A. Ciò costituisce una conclusione evidentemente assurda, onde non giusta è l'interpretazione degli esperimenti. La cosa mi sembra di una evidenza indiscutibile.

A conferma del mio modo di interpretare i resultati di CALKINS, vi è però ancora un altro fatto, ugualmente decisivo quanto quello testè citato.

Nelle ricerche fatte da lui con LIEB (02), mentre gli Infusorî che son stati sottoposti agli stimoli, si sono mantenuti in vita, quelli che son stati alimentati sempre con infuso di fieno, son morti, dopo 69, 135, 164 generazioni, ecc.; cioè dopo numeri di generazioni piccolissimi, rispetto anche alla teoria del MAUPAS; numeri che sono stati più volte superati senza nessuna difficoltà da varî autori, p. e.

dal MAUPAS stesso. In conclusione, qnesti resultati mostrano che la tecnica adoperata in qneste ricerche non è stata abbastanza scrupolosa per lo scopo.

Più si accostava alla verità il KULAGIN, nel ritenere che le degenerazioni, anzichè senili, siano dovute ad nna intossicazione, basandosi sul fatto che Infusorî in via di degenerare migliorano e guariscono se portati nell' acqna pura. Però l' A. pensava ad nna autointossicazione, ciò che è resultato infondato per i miei esperimenti, sia quelli nei quali ho mostrato l' influenza degli infusi più o meno vecchi (1905) sia e più dai primi esperimenti (03) nei quali ponevo uno o più Infusorî in piccole gocce di nn infuso riccamente batterico; osservavo la degenerazione tanto più facilmente quanto più scarsi erano gli Infusorî in nnmero, o più grande la goccia — ciò contro quello che accadrebbe per una autointossicazione, ed in favore dell' idea che siano i Batterî la causa della degenerazione: se gli Infusorî son numerosi, lottano più energicamente mangiando i Batterî, e forse anche per altre vie, impedendo insomma almeno l' nlteriore sviluppo di qnella microflora.

La „degenerazione fisiologica" descritta da HERTWIG nell' *Actinosphaerium*, sarebbe la consegnenza di condizioni esterne, anzichè interne, come la degenerazione descritta dal MAUPAS e creduta senile. Questa di R. HERTWIG, sarebbe indipendente dal numero delle generazioni per scissione che son trascorse dalla coningazione precedente, ciò che non esclude un rapporto colla coniugazione, nel senso che questa può essere una delle vie di ricostituzione delle capacità normali, fisiologiche, degli animali; conclnsione qnesta a cni, veramente, l' A. arriva molto più per induzione teorica che per gli esperimenti fatti. Qnesti hanno dimostrato che gli Actinosferî sottoposti ad nn regime di alimentazione eccessiva vanno incontro ad nna degenerazione, che si manifesta coll' ingrossamento dei nuclei ed il loro disfacimento in cromidî. In varie pubblicazioni l' A. mette in evidenza l' importanza che ha qnesto comportamento di fronte al normale funzionamento dell' Actinosferio. E per assicurarsi che i nuclei giganti non derivino da nna infezione, egli ha fatto l' esperimento seguente: presi alcuni individui ancora sani da una cultura dove erano anche dei malati, e messi in acqna pura, essi hanno avnto la stessa sorte degli altri, andando incontro alla formazione dei nuclei giganti ed alla morte; di più, uniti degli Actinosferî normali e che non erano stati iperalimentati, con altri che avevano nuclei giganti, mentre questi nltimi in alcune settimane sono morti, i primi sono rimasti in vita e normali, senza formazione di nnclei

giganti. Gli esperimenti dimostrano che questa particolarità dei nuclei e la conseguente morte non sono causati da una infezione. La conclusione sembra anche a me giusta; ma non mi sembra però giusta la conclusione ulteriore, che la degenerazione sia dunque conseguenza del fatto di essere gli Actinosferî alimentati eccessivamente. In che cosa consiste l'alimentazione eccessiva, ossia le condizioni che la permettono? Si tratta di dare a questi Protozoi altri Protozoi, in abbondanza; si tratta di unire un numero considerevole di *Stentor* agli Actinosferî; ora, chi assicura che la presenza di questi organismi, di cui quelli si cibano, non produca una intossicazione degli Actinosferî? Vediamo in primo luogo se gli esperimenti di HERTWIG tolgano questa possibilità, poi esaminerno la probabilità che essa ha. Quando gli Actinosferî malati sono uniti ad altri sani, si capisce che la intossicazione supposta nei malati non debba necessariamente attaccarsi, influire sui sani. L'esperimento esclude la presenza di un germe infettivo, ma non la presenza di un'azione dannosa tossica, precedentemente subita dagli Actinosferî a nuclei giganti. L'altro esperimento, del mettere Actinosferî apparentemente sani, ma trovati insieme a dei malati, nell'acqua pura, non dimostra nemmeno che essi siano privi di un germe infettivo, dal momento che essi muoiono; esso potrebbe esservi contenuto e svilupparsi poi a suo agio durante la vita nell'acqua pura, nello stesso modo che si ammalano di colèra o di peste in paesi dove queste malattie non esistono, molti che scappano da un posto al momento dell'epidemia; essi parevano sani — come gli Actinosferî — ma avevano il germe della malattia in loro. Ma non monta: la presenza di un'infezione è già esclusa dall'esperimento di sopra. Però anche questo di cui ora trattiamo, non dimostra che l'azione producente la morte sia l'iperalimentazione. Siamo in presenza di individui i quali dobbiamo credere sarebbero morti rimanendo nell'ambiente ove erano iperalimentati; e che son morti ugualmente, sebbene tolti di là quando parevano ancora normali. Erano essi normali? Evidentemente no, giacchè son morti nell'acqua pura; nè HERTWIG crede che fossero normali, sia in base all'esperimento, sia in base al fatto che essi avevano subito l'azione della iperalimentazione, che aveva ammalato i compagni. Essi dunque sembravano normali, ma avevano in sè tutte le condizioni atte a svolgere quella particolarità dell'ingrossamento dei nuclei, a cui segue la morte. Si conclude dunque che nell'ambiente dove gli Actinosferî vengono iperalimentati, essi subiscono un'azione che resta nascosta all'osservatore anche fino ad un punto a partire dal quale la vita degli animali è già compromessa,

in qualunque condizione poi essi si vengano a trovare. Questa conclusione è lecita, ma solo questa. Decidere che questa azione dannosa dipenda dal fatto di aver mangiato troppo, è arbitrario; modificazioni dovute a questo fatto possono altrettanto bene seguitare ad agire negli individui che vengan poi tolti dal mangiar molto, quanto modificazioni dovute a tossine possono seguitare a svolgersi anche dopo tolti gli animali dall' azione tossica. Il veleno era già assorbito, e li ha ammazzati lentamente poi. Quante volte l' esperienza medica insegna che i veleni assorbiti dall' organismo, lentamente accumulati magari in organi ghiandolari speciali, proseguono poi ad agire (anche evitando nuovo assorbimento di veleno) compremettendo la salute molto più che nel periodo in cui l' uomo era in atto soggetto all' azione esterna del veleno! E che dire dei sieri, i quali iniettati nel sangue producono azioni tardive, perfino dopo mesi, e forse anni? L' esperimento di Hertwig non esclude perciò affatto la tossicità dell' ambiente in cui i nuclei gigauti si formano, in cui si produce la cosi detta „degenerazione fisiologica", attribuita al maugiar molto.

E non è punto strano supporre che la presenza di molti *Stentor* producesse un ambiente in qualche modo dannoso, tossico per gli Actinosferî. Non vediamo forse ogni giorno gli organismi lottare con ogni mezzo per assicurarsi il possesso del cibo? Una cultura per quanto rigogliosa di *Stylonichia pustulata*, quando vi vengano aggiunti alcuni individui di *Glaucoma scintillans*, si trasforma spesso in una cultura di Glaucoma, senza che più si veda nemmeno una Stilonichia; nè i Glaucomi, tanto più piccoli, mangiano le Stilonichie; tutti gli esperimenti i quali dimostrano la tossicità dei Batterî sopra ai Protozoi, sono sempre l' espressione di una legge generale medesima. Il ritenere che l' aggiunta di una quantità cospicua di *Stentor* sia innocua per gli Actinosferî, è supposizione arbitraria, per la quale bisogna trascurare il ricordo della lotta per l' esistenza, bisogna dimenticare che, come gli Actinosferî lottano contro gli *Stentor* per mangiarli, questi lotteranno contro gli Actinosferî per non esser mangiati. Di più, oltre gli *Stentor* saranno presenti anche altri organismi, di cui gli *Stentor* si devon cibare, ed a questi pure può esser riserbata una parte, nella complicata lotta per la conservazione della vita, dentro la cultura dell' illustre zoologo di München. Con tutto il rispetto dunque per le sue ricerche, dalle quali spesso scaturiscono fatti importanti, che in parte abbiamo anche in questo scritto ricordati, e con tutto il rispetto per la sua insigne attitudine

a cavare dalle cose la sintesi, i concetti generali, — devo affermare nel modo più reciso, che la così detta „degenerazione fisiologica" degli Actinosferî, ha tutti i caratteri di una degenerazione patologica, per le condizioni in cui si produce.

Nella questione della possibilità di avere coniugazioni con individui che poche generazioni prima erano stati in coniugazione, evidentemente i resultati positivi da me ottenuti tolgono qualsiasi dubbio, anche di fronte ad altre ricerche che portavano alla conclusione opposta, p. e. quelle del SIMPSON; se a lui non è riuscito l'esperimento, ciò vuol dire che non gli è riuscito di porre i suoi Infusorî nelle condizioni adatte; nè è ciò strano, date le difficoltà che ci sono nella cosa. Più notevoli sono trai suoi resultati quelli relativi alla divisione, che ha trovato compiersi negli exconiuganti e prossimi discendenti, come negli individui normali.

Insomma le speranze che R. Hertwig (02) esprimeva relativamente agli Infusorî come buon terreno di studio per le differenze che passino tra individui da poco coniugatisi, sembra non abbiano più affatto luogo di esistere, in quanto solo le condizioni esterne decidono se una nuova coniugazione deve intervenire o no, non il tempo, brevissimo o lunghissimo, decorso dalla coniugazione precedente. Quelle speranze, una delle conseguenze dell'idea della degenerazione senile, devono dar luogo alla constatazione della inesistenza di differenze funzionali a questo riguardo, quindi, senza dubbio, della inesistenza anche di differenze morfologiche, non appena gli Infusorî che si considerino abbiano terminato quella serie di modificazioni cui la coniugazione dà luogo.

La conclusione generale che noi ricaviamo da tutte queste considerazioni, riguardo alla biologia dei Protozoi, e degli Infusorî in particolare — è che la attitudine a dividersi e così propagare la specie, si mostra negli esperimenti, indefinita, senza necessità nè di coniugazione, nè di stimoli, nè di limitare l'appetito, purchè le condizioni della cultura evitino con sicurezza le azioni dannose dovute ad altri organismi. È nostro compito, nello studio di questi fenomeni, di tenere sopra tutto presente la lotta per l'esistenza, in tutte le sue forme, ed acquistare la sicurezza che essa non intervenga a danno della specie presa in considerazione; ciò facendo, non si arriva a vedere il termine della capacità di propagazione per scissione; ma basta dimenticare questo importante fattore un momento

solo, anche parzialmente, perchè una catastrofe divenga — colla massima probabilità — irrimediabile. Come già ho detto nelle mie note precedenti, da ciò non segue logicamente che gli Infusorî, o qualunque altro organismo, possa propagarsi in eterno per scissione — come ciò non è dimostrato che possa avvenire anche dato che intervergano coningazioni. Le mie ricerche e ragionamenti annullano la portata di quelle fatte dagli altri autori per dimostrare la estinguibilità della razza quando si mantengano gli Infusorî in condizioni sempre ugnali e si impedisca la coniugazione. Non più di così è possibile fare: un' affermazione per l' eternità, esce dai limiti della conoscenza umana. Noi però possiamo affermare: avvengano le coniugazioni, o gli Infusorî siano coltivati all' infuori di esse, abbiamo le stesse prove della loro attitudine a propagarsi indefinitamente.

XI. A che serve la fecondazione?

Ma se la coningazione non serve a impedire la degenerazione senile, perchè una „degenerazione senile" non esiste, nè una „degenerazione fisiologica" di qualunque tipo, se insomma non serve a regolare o compensare i fenomeni della vita organica — come vorrebbe R. Hertwig, in base al concetto della degenerazione per abbondante alimentazione — a che cosa serve l' unione di due masse nucleari, che è forse un fenomeno diffuso dappertutto negli organismi viventi? Quel che ci appare come più strano è appunto la esistenza di una funzione così generalizzata, di cui poi la mancanza procurata artificialmente, con speciali condizioni di vita, non dà segni alcuni di procurare inconvenienti. Stabilito nettamente questo ultimo concetto, come resulta dalle ricerche che siamo andati facendo in questi ultimi anni, esso deve essere necessariamente uno dei capisaldi, nella interpretazione dei fenomeni di congiungimento nucleare, mentre da un lato toglie la possibilità di una quantità di teorie, basate sopra alla credenza opposta. Anche la mancanza di una maggior prolificità dopo la coningazione, o di una prolificità minore prima, è stata dimostrata sperimentalmente dal Maupas, e giustamente presa in considerazione da R. Hertwig (02). Questi si oppone anche al concetto di Bütschli del ringiovanimento, in base a questi caratteri manifestati dalla prolificità in rapporto alla coniugazione, e perchè

non potrebbe spiegarsi il bisogno di nn ringiovanimento nella cellula uovo, che appare come più giovane, rispetto alle altre del corpo.

Ed anche giustamente osserva (00) che la fecondazione è collegata con una forma di propagazione nei pluricellulari, ma non nei Protozoi, dove l'nnica forma di propagazione è la divisione.

La teoria che l'amfimixi sia fonte di variabilità, ed in questo consista il suo significato, è da troppe parti combattuta, perchè io qui voglia estendermi a discuterla; accenno soltanto che da un punto di vista aprioristico non si intuisce come possa la mescolanza di due nuclei produrne nno che devii dal tipo medio più di ciascnno dei due; ed a posteriori l'esperienza quotidiana dimostra come i figli abbiano caratteri intermedî trai genitori; chè se ne sono diversi, ciò accade anche di qnelli nati partenogeneticamente; e le differenze massime si incontrano negli ibridi, la cni deviazione dalle proprietà dei genitori rappresenta non un fattore di variabilità, ma di fissità, ricordando essi nei loro caratteri, forme ancestrali meno differenziate.

Siamo entrati in questa discussione, perchè la esperienza acquistata cogli Infusorî ci ha posto, come dicevo, dinanzi ad un punto di partenza hen netto. I fatti che a tntti sono noti permettono di pensare che in generale la nnione dei gameti porti ad una mescolanza di caratteri, e quindi contribuisca a mantenere la fissità dei caratteri specifici. Vi è forse nna utilità in ciò? È qnesto che ci si palesa chiaro in base all'esperienza acquistata. Ennnciamo qnesta proposizione: l'esistenza di limiti ristretti di variazione, nella specie, è condizione indispensabile per la conservazione dei snoi individni e discendenti. Ed ora vediamo come siamo giunti a questo concetto. Le culture che permettono agli Infusorî di propagarsi indefinitamente — senza coniugazioni nè stimoli — li mantengono anche in limiti ristretti di variabilità, nell'aspetto generale, grandezza ecc., come ci dimostra l'osservazione diretta, in confronto con quelli della stessa specie che menano vita più libera dalle mani dello sperimentatore; ed in qneste condizioni non si manifesta nè la necessità della coningazione per la conservazione della vita, nè l'attitudine alla coniugazione — la matnrità sessuale. Questa attitudine, dalla quale derivano le epidemie di coniugazioni, si palesa in condizioni che offrono una grande ricchezza di forme individuali varie, per grandezza, aspetto generale ecc.; essa deriva anzi da una variazione di condizioni, assai determinata, e consistente essenzialmente in una modificazione della quantità di alimento. Si accompagna sempre con nna prolificità grande, sia per

la abbondanza di nutrimento prima, sia anche nella penuria di cibo che precede immediatamente la comparsa dell' epidemia. La coniugazione insomma non compare in condizioni di fissità di ambiente esterno — e di forme individuali —, compare in determinate condizioni di variazioni esterne — accompagnate da variabilità di forme individuali. Il concetto che essa abbia un' ufficio nello stabilire nna certa media tra le varie forme sorge spontaneamente da ciò; e se osserviamo che negli Infusorî ove non si riscontra un differenziamento sessuale vero e proprio, pure è facile vedere qnanto siano diversi i gameti che si uniscono tra loro, l' idea prende maggior consistenza. — Qnando noi facciamo degli allevamenti in condizioni fisse e permettenti la propagazione indefinita, senza coniugazione, poniamo al riparo i nostri Infusorî da qnelle variazioni di ambiente, le qnali, producendo cospicne variazioni, anche negli Infusorî, portano alla coniugazione — che qni si palesa come elemento allivellatore. Qnale poi sia in ultima analisi il giovamento che le specie traggono da questo allivellamento, è facile supporlo, osservando come ciascuna specie operi compatta nella lotta per l'esistenza, vincendo con forze meccaniche o chimiche le difficoltà dell' ambiente e gli ostacoli frapposti allo sviluppo, dagli altri organismi. Solo operando in maniera concorde — specialmente dal pnnto di vista chimico — è possibile la vittoria, secondo il vecchio adagio: „l' unione fa la forza".

Questo modo di considerare le cose mi sembra che, senza forzare i fatti, accordi quei fenomeni cosl in apparenza contraddittorî, quali sono la generale diffusione del processo coniugativo, nelle sue più varie forme, e d' altra parte la non necessità di esso per la conservazione della specie. L' nnione sessuale, elemento allivellatore, è un fattore di lotta. Eliminando od attenuando il bisogno di lottare, la coniugazione nè si produce, nè vi è bisogno che si produca. Naturalmente le condizioni in cni il processo fecondativo si palesa nei pluricellulari, sono derivate in seguito al processo evolutivo da questi cosl semplici che si verificano nei Protisti; nè è da meravigliarsi che questo elemento — potenzialmente non necessario nei Protisti — sia divenuto necessario nella maggior parte dei pluricellnlari, ed anche in alcuni unicellulari, massime parassiti, giacchè di fronte alla potenziale non necessità, che è dipendente da una riduzione della lotta per l' esistenza, sta sempre nel fatto una lotta intensa, e quindi il bisogno e l' opera del processo copulativo.

Onde non appaia che questa variabilità cui si accenna sia immaginaria, citerò le osservazioni del Simpson, da cui resulta (02) che i fratelli gemelli nati dalla divisione di un Paramecio o di una

Stilonichia, non sono nguali tra loro; si può constatare che hanno piccole differenze di costituzione.

E negli esperimenti di ENTZ (03) snlla variabilità negli Infusori, è apparso chiaro all' autore, che essa dipenda dalle condizioni esterne.

Collo svolgimento di questo concetto, naturalmente veniamo a rifiutare le altre idee espresse in proposito. Quella di WEISMANN in primo luogo per le ragioni già accennate; quella di BÜTSCHLI del ringiovanimento, criticata del resto anche da altri che pur partivano dell' idea di un nfficio in qualche modo compensatore, della coningazione; tra questi R. HERTWIG (cfr. 02) per aver dimostrato che gli excopulanti si dividono meno degli individui comnni; e la teoria di HERTWIG stesso, il quale pensa che la fecondazione rinforzi i poteri regolatori, e quindi sia tanto più necessaria, qnanto più alta è l' organizzazione e quanto più attiva è la vita. Il pnnto di partenza, come si vede, è sempre qnello degli esperimenti sull' *Actinosphaerium*, i quali abbiamo crednto di dovere interpretare del tutto diversamente dall' A. stesso.

In che cosa consistono questi poteri regolatori, è ben chiaro dalle sintetiche discnssioni che si trovano in molti altri lavori dell' A. Per attenerci ad uno dei più recenti (05), egli sostiene che il rapporto tra nucleo e citoplasma — oltre che per le diverse condizioni di ambiente, — varî anche per il solo fatto di nna lunga serie di divisioni agame. Il nncleo aumenta a spese del plasma, qnando si palesa la depressione nelle culture di *Actinosphaerium Eichhorni*; qnesto disturbo di equilibrio deve esser regolato, corretto, altrimenti segne la morte. Osserviamo qui varie cose; in primo lnogo, la solita, che la depressione insorge per cause patologiche e non fisiologiche; in secondo lnogo, che qnesto fatto dell' aumento del nncleo non è punto generale; non si verifica affatto negli animali pluricellnlari, nei quali anzi al contrario — come ho mostrato in un articolo sulla morte (07) il rapporto si modifica, a partire della blastula e fino alla vecchiaia, in senso inverso a qnello detto da HERTWIG; perchè dunque insorgerebbe qui la morte? Perchè l'animale adulto compierebbe la funzione sessuale, quale aumento di grandezza nucleare deve questa compensare, se dal momento dei primi blastomeri all' età adnlta il rapporto tra nucleo e plasma è invece diminuito? — Nè maggior valore dimostrativo ha l' osservazione fatta da KASANZEFF e da R. HERTWIG riportata a questo proposito, che i Parameci hanno il nncleo più grosso a diginno, anzichè se sono nntriti; si tratta, si noti bene, del macronncleo; ed il macronncleo è con molta probabilità omologo parzialmente, ed analogo all' ergastoplasma delle cellule

secernenti (Enriques 07, 1), cioè ha funzioni nella nutrizione, digestione soprattutto; che meraviglia che l'apparecchio della secrezione ingrandisca quando secreto non viene utilizzato? Onde non giusta è l'interpretazione dell'A., che le divisioni di digiuno siano conseguenza di questo rapporto nucleo-plasmatico modificato, e perciò vengano ad essere in rapporto colla coniugazione. E tanto meno possiamo vedere — conseguenza ulteriore dell'A. — un rapporto tra la maturazione dei pluricellulari e le divisioni di digiuno dei Protozoi; giacchè, se pure è vero che a queste ultime può seguire la coniugazione — ciò che non accade sempre — è anche vero che tra le divisioni di digiuno e la coniugazione sono interposte le divisioni di maturazione, che corrispondono a quelle omonime dei pluricellulari; nè vale a sciogliere l'intreccio, la supposizione che le divisioni di digiuno servano a maturare il macronucleo, mentre le seguenti, ad operare la maturazione del micronucleo. Come si può capire questa maturazione del macronucleo, destinato a distruggersi senza prender parte all'atto coniugative? Nè le divisioni di digiuno sono in numero fisso (Maupas, citato da Hertwig stesso) nè, lo ripeto e vi insisto — ad esse segue generalmente la coniugazione, che ben più raramente si osserva, e che non resulta avvenisse nelle culture prese in considerazione dal Kasanzeff per misurare i nuclei degli animali a digiuno. Altro dunque il significato delle divisioni di digiuno, e facile a capirsi se ci si ponga da un punto di vista Spenceriano: la diminuzione di alimento diminuisce la possibilità di nutrirsi; dividendosi ed impiccolendo, l'animale raggiunge un effetto utile, giacchè la sua superficie è diminuita meno del suo volume (questo in ragione del cubo, quella in ragione del quadrato della dimensione lineare); e l'assorbimento avviene attraverso a superficie, mentre la sostanza da nutrire rappresenta tutto il volume dell'animale. Che questo modo di vedere, sebbene teleologico, non sia errato, lo dimostra il fatto generale, assolutamente generale in tutti i regni della natura vivente, che gli organismi ben nutriti non solo si moltiplicano di più, ma sono anche più grandi di quelli nutriti male; fatto questo il quale, nonostante la semplicità apparente, nonostante che non vi poniamo attenzione di frequente appunto perchè lo osserviamo continuamente, esprime una proprietà molto intima della sostanza vivente, giustificando il concetto ben noto di Spencer, che la divisione sia necessaria, dato il cambiamento di rapporto tra superficie e volume, quando la cellula o l'organismo sono cresciuti fino ad un certo limite.

Concludendo, l'azione della coningazione, di regolare il rapporto nucleo-plasmatico, non ha nessuna prova che resista alla critica.

Assai strana è la concezione di LOISEL nel suo complesso; egli crede che la degenerazione dipenda dalla immobilizzazione di una parte delle molecole del protoplasma, si che le sne attitudini assimilatrici sono diminnite; vede nella mescolanza di individui vissuti in condizioni differenti, l'azione del ringiovanimento; molti dati dimostrano l'intensità delle azioni chimiche nella coniugazione: azioni chimiche che si contrappongono alle azioni chimiche della senescenza; questa mescolanza di due individui, di due plasmi, è la parte essenziale, molto più della fusione nucleare, fenomeno venuto più tardi e che infatti non si osserva sempre.

Osservo in primo lnogo che la cosi detta senescenza è nna degenerazione non senile, ma patologica, come i miei esperimenti hanno dimostrato; ed in ogni caso l'interpretazione molecolare dell'autore non sarebbe nè nn'interpretazione nè nna spiegazione, ma è solo una parafrasi simbolica dei fatti constatati, relativi alla diminuzione di attività vitali che appunto costituisce la parte funzionale della degenerazione. In terzo lnogo di ringiovanimento non si tratta, e già R. HERTWIG lo ha chiaramente dimostrato, come altrove abbiamo riferito. In quarto luogo, è assai doloroso che O. HERTWIG, e poi ambedue i fratelli, e molti altri biologi illustri in centinaia di importanti scritti abbiano sostenuto e dimostrato come la parte essenziale della fecondazione sia l'unione dei due nuclei, — non escludendo con qnesto, rigorosamente parlando, che anche la fusione dei plasmi abbia un'importanza — perchè si venga a considerare l'unione nucleare come un piccolo incidente accessorio! Non so se l'A. pensasse con questo alle evidentemente incomplete osservazioni di HOYER (cfr. a pag. 242) o alla plasmogamia delle amebe, la qnale non esclude che in un altro momento del loro ciclo evolutivo ci sia la vera fusione nucleare, tra le forme flagellate.

Strane anche le conseguenze logicamente dedotte da DELBOEUF — per via matematica — da premesse mal poste. Una condizione che faccia variare gli Infusori, purchè continuata indefinitamente, li renderà tutti variati dopo un certo numero di generazioni, anche se agisca soltanto su nna piccola percentuale di individui che nascono per scissione. (Ciò è matematicamente dimostrato.) La variabilità esiste; dunque tutti gli individui si troveranno modificati, dopo un certo tempo, se non interviene un'azione regolatrice, innovatrice, la

coningazione. Con ciò egli si oppone all' appellativo di senile, per la degenerazione osservata dal MAUPAS. Evidentemente, il problema è mal posto quando l'autore passa allo svolgimento matematico, perchè si suppone nna condizione che faccia variare gli Infusori sempre nello stesso senso, cosa che invece non si deve nè può supporre: la variabilità esiste, ma non è dimostrato che nella specie — si riproduca essa agamicamente, od intervenga la fecondazione — tale variabilità sia in un senso costante nei vari individui, e che non si possa tornare indietro, dopo aver snbito una determinata variazione; e tanto meno è dimostrato che questa variabilità — qnand' anche fosse in nn senso determinato — debba condurre necessariamente alla morte se passa un certo limite. Inntile esaminare nei particolari la trattazione matematica della qnestione, fatta dall'A., la quale pecca anche per altri versi di questo difetto fondamentale — partire da premesse non giuste o non ginstificate, e ritenere vere le conseguenze, perchè son dedotte a fil di logica.

XII. Conclusioni più importanti.

1° Possibilità della propagazione indefinita negli Infnsorî, senza coningazione nè stimoli, possibilità della coningazione tra parenti stretti o tra discendenti prossimi di exconiuganti.

2° Impossibilità di coniugarsi, per il *Colpoda Steinî*, se l'ambiente liqnido supera 2—3 mm di spessore in direzione verticale.

3° Esistenza di nna „divisione sessuale" nei Vorticellidi, per la quale micro e macrogameti si formano contemporaneamente da un individno non sessualmente differenziato; impossibilità della coniugazione, negli individui che non son andati soggetti alla divisione sessuale.

4° Orientamento in direzione perpendicolare dei fnsi cariocinetici omosessuali che si trovano contemporaneamente in divisione, in *Opercularia coarctata*, dnrante la coningazione; orientazione sullo stesso asse dei fusi eterosessuali, nell' ultima divisione precedente la fnsione dei nuclei.

5° Caratteri normali della prima divisione micronucleare nel microgamete in coniugazione, e nell' ultima di ciascnn gamete, prece-

dente la fusione dei nuclei. Caratteri particolarissimi delle due divisioni di maturazione, per l'interposizione — in ambedue — di uno stadio di forte allungamento. Esistenza di radiazioni attorno al nucleo di fecondazione, orientate attorno a tutta la massa nucleare, priva di centrosomi, priva di struttura decifrabile in questo stadio.

Precedenza, piccola ma costante, degli stadî nel macrogamete, rispetto al microgamete.

Non posso raccogliere qui i resultati particolari di ciascun gruppo di osservazioni nè voglio raccogliervi le induzioni e vedute di indole generale, le quali perderebbero la loro efficacia, riassunte in poche righe. Posso però riassumere così tutto ciò che per vie diverse si riferisce alla necessità e condizioni della coniugazione:

Gli Infusorî si propagano ugualmente con o senza coniugazione, pur di metterli in determinate condizione di ambiente; il momento della coniugazione è determinato soltanto dalle condizioni di ambiente. Credo che l'effetto (lo *scopo*) della coniugazione sia quello di mantenere una certa fissità della specie, e ciò sia utile nella lotta per l'esistenza, che meglio si deve compiere coll'azione collettiva di individui uguali.

XIII. Bibliografia.

1891 AUERBACH, L.: Über einen sexuellen Gegensatz in der Chromatophylie der Keimsubstanzen nebst Bemerkungen zum Bau der Eier und Ovarien niederer Wirbeltiere. Sitz.-Ber. d. kgl. preuß. Akad. d. Wiss. Berlin p. 713—750; auche in Berl. klin. Wochenschr. Bd. 28.

1891 BALBIANI, E.: Sur les régénérations successives du péristome ecc. Zool. Anz. Bd. 14 p. 312—316 e 323—327.

1858 BARY, A. DE: Untersuchungen über die Familie der Konjugaten. Leipzig.

1904 BEAUCHAMP, P. DE: Sur la fixation à l'état d'extension des animalcules contractiles et spécialement des vorticelles. Bull. Soc. zool. France Vol. 9 p. 26—27.

1894 BLOCHMANN: Über Kernteilung bei Englena. Biol. Centralbl. Bd. 14 p. 194—197.

1896 BORGERT, A.: Zur Fortpflanzung der tripyleen Radiolarien. Zool. Anz. Bd. 19 p. 307—311.

1900 —: Untersuchungen über die Fortpflanzung der tripyleen Radiolarien, speziell von Aulachanta scolymantha. Zool. Jahrb. Bd. 14 p. 203—276.

1906 BOTT, K.: Über die Fortpflanzung von Pelomyxa palustris. Arch. f. Protistenk. Bd. 8 p. 120—158.

1892 Boveri, Th.: Befruchtung. Merkel u. Bonnet, Ergebnisse Bd. 1 p. 386—485.
1893 Brauer, A.: Zur Kenntnis der Reifung des parthenogenetisch sich entwickelnden Eies von Artemia salina. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 43 p. 112—123.
1876 Bütschli, O.: Studien über die ersten Entwicklungsvorgänge der Eizelle, die Zellteilung und die Konjugation der Infusorien. Arch. d. Senckenb. Naturf. Ges. Bd. 10.
1887—89 —: Protozoa. Bronn's Klassen und Ordnungen des Tierreiches. Leipzig.
1902 Calkins, G. N.: Degeneration in Paramaecium and so-called „Rejuvenescence" without conjugation. Amer. Morph. Soc. Extr. in Sci. N. S. Vol. 19 p. 526.
1902 —: Studies on the life history of Protozoa. I. The life cycle of Paramaecium candatum. Arch. f. Entwicklungsmech. Bd. 15 p. 139—186.
1902 —: The six hundred and twentieth generation of Paramaecium candatum. Biol. Bulletin of t. Marine Biol. Laboratory Woods Hall, Mass Vol. 3 p. 192—205.
1904 —: Studies on the life history of Protozoa. IV. Death of the A. series. Conclusions. Journ. Exp. Zool. Baltimore Vol. 1 p. 423—461.
1902 Calkins, G. N. & Lieb, C. C.: Studien on the life-history of Protozoa. II. The effect of stimuli on the life-cycle of P. c. Arch. f. Protistenk. Jena Bd. 1 355—371.
1903 Chénevrau, C. & Bohn, G.: De l'action du champ magnétique sur les Infusoires. C. R. Acad. Sc. Vol. 136 p. 1579—1580.
1901 Cuénot, L.: Recherches sur l'évolution et la coniugaison des Grégarines. Arch. de Biol. Vol. 17 p. 581—651.
1898 Delage, Y.: Embryons sans noyau maternel. C. R. Acad. Sc. Vol. 127 p. 528—531.
1891 Delboeuf, J.: Une loi mathématique applicable à la dégénérescence qui affecte les Infusoires ciliés à la suite de fissiparitions répétées. Revue scientifique Vol. 47 p. 368—371.
1900 Doflein, F.: Studien zur Naturgeschichte der Protozoen. IV. Zool. Jahrb. Abt. f. Anat. Bd. 14 p. 1—60.
1862 Engelmann, Th. W.: Zur Naturgeschichte der Infusionstiere. Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. 11.
1876 —: Über Entwicklung und Fortpflanzung von Infusorien. Morph. Jahrb. Bd. 1 p. 573—635.
1902 Enriques, P.: Ricerche osmotiche sugli Infusori. Rendic. Acad. Lincei (5) Vol. 11 p. 340—347.
1902 —: Ricerche osmotiche sui Protozoi delle infusioni. Ibid. p. 392—397.
1902 —: Osmosi ed assorbimento nelle reazioni a soluzioni anisotoniche. Ibid. p. 495—499.
1902 —: Adattamento degli Infusori marini alla vita nell'acqua dolce. Monit. zool. ital. Anno 13 (suppl.) p. 49—50.
1903 —: Sull' adattamento degli Infusori marini alla vita nell' acqua dolce. Rendic. Accad. Lincei (5) Vol. 12 p. 83—88.
1903 —: Sulla cosi detta degenerazione senile dei Protozoi. Monit. zool. ital. Vol. 14 (suppl.) p. 349—351. (Stylonichia, Oxytricha.)
1905 —: Della degenerazione senile negli Infusori. Rendic. Accad. Lincei (5) Vol. 14 p. 351—357. (Glaucoma.)
1905 —: Ancora della degenerazione senile negli Infusori. Ibid. p. 390—395. (Stylonichia, Vorticella.)

1907 —: Sui nuclei degli Infusorî e le loro omologie. Biologica Vol. 1 (in corso di stampa).
1907 —: La morte. Rivista di Scienze Vol. 1 (in corso di stampa).
1903 ENTZ, G.: Einiges über das Variieren der Infusorien. Math. Nat. Ber. Ungarn Bd. 19 p. 125—144.
1904 FAURÉ-FREMIET, É.: Épuration et rajeunissement chez les Vorticellidae. C. R. Soc. Biol. Vol. 57 p. 428—430.
1905 —: Sur la structure du Macronucleus chez les Vorticellidae. C. R. Soc. Biol. Paris Vol. 58 p. 602—603.
1905 —: Sur une variation expérimentale de la Vorticella microstoma. C. R. Soc. Biol. Paris Vol. 59 p. 424—426.
1896 GALLARDO, A.: Essai d'interprétation des figures karyokinétiques. An. Mus. Buenos Aires Vol. 5 p. 11—12.
1896 —: La carioquinesis. An. soc. Argent. Vol. 42 p. 5—34.
1897 — Significado dinámico de las figuras cariocinéticas y celulares. An. Soc. Arg. Vol. 44 p. 124, 140.
1902 —: Interpretación dinámica de la division celular. Buenos Aires.
1890 GIARD, A.: Sur les globules polaires et les homologues de ces éléments chez les Infusoires ciliés. Bull. scientif. de la France et de la Belgique Vol. 22 p. 202—221.
1904 GRASSI, B. & A. FOÀ: Ricerche sulla riproduzione dei Flagellati. Rendic. Accad. Lincei (5) Vol. 13 (anno 301) p. 241—252.
1896 GREENWOOD: On structural change in the resting nuclei of Protozoa. I. The macronucleus of Carchesium polypinum. Journ. Physiol. Vol. 20 p. 427—454.
1903 GRENET, H.: Action du champ magnétique sur les Infusoires. C. R. Soc. Biol. Vol. 55 p. 957—958.
1884 GRUBER, A.: Über Kern und Kernteilung bei den Protozoen. Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. 40 p. 121—153.
1900 GUIGNARD, L.: L'appareil sexuel et la double fécondation dans les Tulipes. Ann. de sc. nat. Botanique Vol. 9.
1902 GUILLERMOND, M. A.: Recherches cytologiques sur les levures. Thèse doctorat Paris.
1904 HAMBURGER, C.: Die Konjugation von Paramaecium bursaria FOCKE. Arch. f. Protistenk. Bd. 4 p. 199—239.
1877 HERTWIG, R.: Über den Bau und die Entwicklung der Spirochona gemmipara. Jenaer Zeitschr. Vol. 11.
1884 —: Über die Kernteilung bei Actinosphaerium eichhornii. Jena. Zeitschr. Naturw. Bd. 17 p. 490—518.
1888 —: Über Kernteilung bei Infusorien. Sitz.-Ber. d. Ges. f. Morphol. u. Physiol. München Vol. 3 p. 127.
1889 —: Über die Konjugation der Infusorien. Abh. d. kgl. bayr. Akad. d. Wiss. Kl. 2 Vol. 17 (1) p. 155—233.
1892 —: Über Befruchtung und Konjugation. Verh. d. deutsch. zool. Ges. Berlin p. 95—113.
1896 —: Über die Entwicklung des unbefruchteten Seeigeleies. Ein Beitrag zur Lehre von der Kernteilung und der geschlechtlichen Differenzierung. Festschr. f. GEGENBAUR. Leipzig.
1899 —: Über Kernteilung, Richtungskörperbildung und Befruchtung von Actinosphaerium eichhornii. Abh. d. Akad. München Bd. 19 p. 631—734.

1899 —: [Über die Umgestaltungen des Centrosoma während der Encystierung von A. E.] Proc. 4. Intern. Congr. Zool. p. 201—202.
1899 —: Was veranlaßt die Befruchtung der Protozoen? Sitz.-Ber. d. Ges. f. Morphol. u. Physiol. München Bd. 15 p. 62—69.
1900 —: Mit welchem Recht unterscheidet man geschlechtliche und ungeschlechtliche Fortpflanzung? Sitz.-Ber. d. Ges. f. Morphol. u. Physiol. München Bd. 15 p. 142—153.
1900 —: Über physiologische Degeneration bei Protozoen. Sitz.-Ber. d. Ges. f. Morphol. u. Physiol. München Bd. 16 p. 88—94.
1902 —: Die Protozoen und die Zelltheorie. Arch. f. Protistenk. Bd. 1 p. 1—40.
1902 —: Über Wesen und Bedeutung der Befruchtung. Sitz.-Ber. d. math.-phys. Kl. d. bayr. Akad. d. Wiss. Bd. 32 p. 57—73.
1903 —: Über Korrelation von Zell- und Kerngröße und ihre Bedeutung für die geschlechtliche Differenzierung und die Teilung der Zelle. Biol. Centralbl. Bd. 33 p. 49—62.
1903 —: Über das Wechselverhältnis von Kern und Protoplasma. Sitz.-Ber. d. Ges. f. Morphol. u. Physiol. München Bd. 18 p. 77—100.
1904 —: Über Konjugation von Dileptus gigas. Sitz.-Ber. d. Ges. f. Morphol. u. Physiol. München Bd. 20 p. 1—3.
1904 —: Über physiologische Degeneration bei Actinosphaerium eichhorni. Denkschr. d. Med.-Nat. Ges. Jena Bd. 11 p. 301—354.
1905 —: Über das Problem der sexuellen Differenzierung. Verh. d. deutsch. zool. Ges. Bd. 15 p. 186—214.
1901 Hickson, S. J.: The reproduction and life-history of the Protozoa. Trans. Manchester Micr. Soc. 1900 p. 25—31.
1902 [Hickson, S. J.] & Wadsworth, G. T.: Dendrocometes paradoxus. Part I. Conjugation. Quart. J. Micr. Sci. Vol. 45 325—362. Sommario in J. R. Micr. Soc. 1902 p. 438.
1899 Hoyer, H.: Über das Verhalten der Kerne bei der Konjugation des Infusors Colpidium colpoda St. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 54 p. 95—134.
1884 Jickeli, C. F.: Über die Kernverhältnisse der Infusorien. Zool. Anz. Bd. 7 p. 468—473, 491—497.
1893 Johnson, H.: A contribution to the morphology and biology of the Stentors. Journ. Morph. Vol. 8 p. 467—562.
1898 Joukowsky, D.: Beiträge zur Frage nach den Bedingungen der Vermehrung und des Eintrittes der Konjugation bei den Ciliaten. Verh. d. Nat.-Med. Ver. Heidelberg (2) Bd. 6 p. 17—42.
1895 Karawaiew, W.: Beobachtungen über die Struktur und Vermehrung von Aulacantha scolymantha. Zool. Anz. Bd. 18 p. 286—289, 293—301.
1896/97 Karsten, G.: Untersuchungen über Diatomeen. Flora Bd. 82 p. 296, Bd. 85 p. 33—53, 203—222.
1901 Kasanzeff: Experimentelle Untersuchungen über Paramaecium candatum. Inaug.-Diss. Zürich. 60 p.
1895 Keuten, J.: Kernteilung von Euglena viridis. Zeitschr. f. wiss. Zool. Bd. 60 p. 215—235.
1900 Kulagin, N.: Zur Biologie der Infusorien. Physiol. Russe Vol. 1 p. 269—275.
1903 Loewenthal, W.: Beiträge zur Kenntnis des Basidioholus lacertae. Arch. f. Protistenk. Bd. 2 p. 364—415.

1903 LOISEL, G.: Snr la sénescence et sur la conjngaison des Protozoaires. Zool. Anz. Bd. 26 p. 484—495.
1886 MAUPAS, E.: Sur la conjugaison des Infusoires ciliés. C. R. Acad. sc. Paris Vol. 102 p. 1569—1572.
1886 —: Sur la conjugaison des Paramécies. Ibid. Vol. 103 p. 482—484.
1887 —: Sur la puissance de multiplication des Infusoires ciliés. C. R. Acad. Sc. Vol. 104 p. 1006—1008.
1887 —: Sur la conjngaison du Paramaecium bursaria. Ibid. Vol. 105 p. 955—957.
1888 —: Sur la conjngaison des Vorticellides. Ibid. Vol. 106 p. 1607—1610.
1888 —: Sur la multiplication des Infusoires ciliés. Arch. zool. expér. (2) Vol. 6. p. 165—277.
1889 —: Le rajeunissement caryogamique chez les ciliés. Ibid. Vol. 7 p. 148—517.
1906 MERCIER, L.: Phénomènes de sexualité chez Myxobolus pfeifferi. C. R. Soc. Biol. Paris Vol. 60 p. 427—428.
1899 NAWASCHIN: Neue Beobachtungen über Befruchtung bei Fritillaria und Lilium. Botan. Centralbl. Bd. 77.
1904 PITTALUGA: Partenogenesi nei macrogameti di Laverania. A. Parasitol. Paris Vol. 7 p. 389—397.
1888 PLATE, L.: Studien über Protozoen. Zool. Jahrb. Abt. f. Morphol. Bd. 3 p. 135—200.
1905 PRANDTL, H.: Reduktion und Karyogamie bei Infusorien. Biol. Centralbl. Bd. 25 p. 144—151.
1906 —: Konjugation von Didinium nasutum. Arch f. Protistenk. Bd. 7 p. 229—258.
1904 PROWAZEK: Die Entwicklung von Herpetomonas. Arb. a. d. kaiserl. Gesundheitsamte Bd. 20 p. 440—452.
1905 —: Studien über Säugetiertrypanosomen. Ibid. Bd. 22 p. 45.
1888 RHUMBLER, L.: Die verschiedenen Cystenbildungen und die Entwicklungsgeschichte der holotrichen Infusoriengattung Colpoda. Zeitschr. f. wissensch. Zool. Bd. 46 Bd. 549—601.
1903 —: Mechanische Erklärung der Ähnlichkeit zwischen magnetischen Kraftliniensystemen und Zellteilungsfiguren. Arch. f. Entwicklungsmech. Bd. 16 p. 476—536.
1895 RÜCKERT, J.: Über das Selbständigbleiben der väterlichen und mütterlichen Kernsubstanz während der ersten Entwicklung des befruchteten Cyclopseies. Arch. f. mikr. Anat. Bd. 45 p. 339—369.
1905 RUSSO, A. & S. DI MAURO: Frammentazione del macronucleo nel Cryptochilum echini e sua significazione per la senescenza degli Infusori. Boll. Accad. Gioen. Catania Fasc. 84 6 p.
1905 — —: Differenziazioni citoplasmiche nel Cryptochilum echini (MAUPAS). Boll. Accad. Gioen. d. Sc. Nat. Catania Fasc. 84 5 p.
1905 — —: La coniugazione ed il ringiovanimento nel Cryptochilum echini. Ibid. Fasc. 85 6 p.
1904 SCHAUDINN, F.: Generations- und Wirtswechsel bei Trypanosoma und Spirochäte. Arb. aus d. kais. Gesundheitsamte Bd. 20 p. 387—439.
1905 —: Neuere Forschungen über die Befruchtung bei Protozoen. Verh. d. deutsch. zool. Ges. p. 16—35.
1888 SCHEWIAKOFF, W.: Über karyokinetische Kernteilung der Englypha alveolata. Morph. Jahrb. Bd. 13 p. 193—258.
1901 SIMPSON, J.: Observations on binary Fission in the life-history of Ciliata. Proc. R. Soc. Edinb. Vol. 23 p. 401—421.

1902 —: The relation of binary Fission and Conjugation to Variation. Rep. 71 Meet. Brit. Ass. Adv. Sc. p. 688—689.
1903 Smith, G.: Actinosphaerium eichhorni. A biometrical study in the mass relations of nucleus and cytoplasma. Biometrica Vol. 2 p. 241—254.
1903 Stevens, N. M.: Notes on Regeneration in Stentor coeruleus. Arch. Entwicklungsmech. Vol. 16 p. 461—475.
1905 Versluys, J.: Über die Konjugation der Infusorien. Biol. Centralbl. Bd. 26 p. 46—62.
1905 Vahlkampf, E.: Zur Biologie und Entwicklungsgesch. von Amoeba limax ecc. Arch. Protistenk. Bd. 5 p. 167—220.
1901 Wallengren, H.: Zur Kenntnis der Neubildungs- und Resorptionsvorgänge bei der Teilung der hypotrichen Infusorien. Zool. Jahrb. Bd. 15 p. 1—58.
1905 Woodruff, L.: An experimental study on the life-history of hypotrichous infusoria. Journ. Exper. Zool. (Baltimore) Vol. 2 p. 585—632.
1905 —: Physiological and morphological changes during 860 generations of Oxytricha fallax. Science (2) Vol. 21 p. 270.

XIV. Siegazione delle Tavole.

Tutte le Figure, tolte da preparati di *Opercularia coarctata*, sono state disegnate alla camera lucida, con obbiettivi ad immersione. Quelle della tavola V, ridotte alla metà nella riproduzione dai disegni originali, hanno un ingrandimento di 750 diametri; sono tolte da preparati in toto, colorati con carmino boracico e verde metile, salvo indicazione in contrario; le Fig. 43—46 con fatte ad occhio dal vivo (ingrand. indeterminato). Nelle tavole VI—VIII tutte le figure son tolte da sezioni, ordinariamente grosse 5 micron, colorate coll' ematossilina ferrica, salvo indicazione in contrario. L' ingrandimento è di 2000 diametri.

Tavola V.

Fig. 1—2. Divisione sessuale.
Fig. 3. Inizio della coniugazione.
Fig. 4—6. Prima divisione del mi. nel microgamete.
Fig. 7—17. Prima divisione di maturazione.
Fig. 18—22. Seconda divisione di maturazione.
Fig. 23—25. Ultima divisione.
Fig. 26—29. Spostamento dei nuclei e coniugazione
Fig. 30—32. 1ª divisione del nucleo di fecondazione.
Fig. 32—34. 2ª divisione.
Fig. 35—39. Formazione dei nuovi macronuclei.
Fig. 40. Stadio eccezionale, con 7 Ma. e 1 mi.
Fig. 41—42. Spartizione dei Ma.
Fig. 43—46. Coniugazioni a fresco.
Fig. 2. Si notino i corpi interni (verdi) del Ma.
Fig. 4. Piastra equatoriale nel microg.
Fig. 5. Principio delle modificazioni nel macrogamete (Ma.).
Fig. 6. Seguito. Corpi interni allungati, come nella divisione, cfr. Fig. 2. 2 mi. nel microg.

Fig. 7. Fuso primario nel mi. del macrog.; mi. del microg. non ancora modificati.

Fig. 8—9. Tolte della stessa Opercnlaria, con fuochi diversi. Fnsi primari. Ma. del macrog. e microg., in spezzettamento.

Fig. 10. Stadio dell' allungamento del fnso primario, nel macrog.

Fig. 11. Stadio di poco più avanzato.

Fig. 12. Stadio del raccoglimento, dopo l' allungamento. Coniugazione doppia.

Fig. 13. Fnso secondario, di recente formato (fibre divergenti); l' altro mi. del microg. e quello del macrog. non son disegnati.

Fig. 14. Piastre equatoriali (i cromosomi son circa 16).

Fig. 15. Stadio più avanzato della divisione; i cromosomi son ancora nnmerosi in ciascnn gruppo, ma son stati un poco diminniti di nnmero nel disegno, per maggior chiarezza, dovendosi rappresentare su un piano qnello che non è sn nn piano.

Fig. 16. Nuclei figli in formazione. I filamenti riunenti sono 8 nel mi. del macrog.

Fig. 17. Separazione dei nuclei.

Fig. 18. Stadio dell' allungamento (2a divisione di matnrazione).

Fig. 19. Piastre equatoriali.

Fig. 20. Id., coningazione doppia. I cromosomi son numerosi (16?) ma diminuiti nel disegno, cfr. spiegazione a Fig. 15.

Fig. 21. Separazione dei cromosomi nel microg.; sou già separati nel macrogamete.

Fig. 22. 8 mi. nel microg., 4 nel macrog., tutti nguali.

Fig. 23. Coniugazione doppia. Fnsi primarî dell' ultima divisione.

Fig. 24. Fnsi secondarî dell' ultima divisione. Nel macrog. si contano con certezza 8 cromosomi.

Fig. 25. Fine dell' ultima divisione.

Fig. 26. I dne nuclei derivatine in ciascnn gamete, ancora ravvicinati.

Fig. 27. I nnclei allontanati e modificati.

Fig. 28. I due nuclei nell' atto dell' nnione.

Fig. 29. I dne nnclei già fusi.

Fig. 30. Fuso e piastra eqnatoriale, dopo la copulazione; difficile contare i cromosomi, che sono però assai più di 8.

Fig. 31. Fine di questa divisione.

Fig. 32. Opercularia con dne nnclei identici.

Fig. 33. Divisione dei dne nnclei.

Fig. 34. Opercularia con 4 nnclei identici.

Fig. 35. Accrescimento di tre nuclei frai quattro.

Fig. 36—37. Stadî nlteriori dello stesso accrescimento.

Fig. 38. Allungamento dei nuclei ingrossati.

Fig. 39. Stadio ulteriore di questo allungamento.

Fig. 40. Forma eccezionale, con 8 nnclei, di cni 7 in via di ingrossare.

Fig. 41. Spartizione dei Ma., e fuso primario del mi.

Fig. 42. Resultato della prima spartizione dei Ma.

Fig. 43. Ingresso del microgamete nel macrog. (dal vivente).

Fig. 44. Altro individno, con doppia coniugazione.

Fig. 45. Lo stesso. Stadio più avanzato.

Fig. 46. Lo stesso. Stadio dell' allungamento, con perfetto accordo frai tre gameti.

Tavola VI.

Fig. 47. Ma. normale (coloraz. con carmino boracico e verde metile le parti chiare sono in verde).

Fig. 48. Ma. al principio delle trasformazioni per la divisione. Coloraz. come sopra.

Fig. 49. Stadio più avanzato; anche il mi. modificato (fuso primario). Coloraz come sopra.

Fig. 50—52. Stadî della divisione sessuale.

Fig. 53. Principio delle modificazioni del mi. nel microg. in coniugazione.

Fig. 54. 2 mi. nel microg. e Ma. del macrog. che comincia a modificarsi.

Fig. 55. Principio della prima divisione di maturazione; mi. modificato specialmente nel macrog.

Fig. 56. Formazione del fuso primario.

Fig. 57. Altra sezione dello stesso individuo, per mostrare le modificazioni del Ma.

Fig. 58. Fuso primario.

Fig. 59. Altra sezione dello stesso individuo, per mostrare le modificazioni del Ma.

Fig. 60. Come sopra.

Fig. 61—62. Sezioni di uno stesso individuo, stadio del massimo allungamento.

Fig. 63. Mi. nel massimo allungamento, macrogamete.

Fig. 64. Uno stadio poco più avanzato. Nel microgamete vi è un solo micronucleo; l'altro è nella sezione vicina, cioè nella.

Fig. 65.

Fig. 66—68. Progressivo aumento di cromaticità nei micronuclei allungati.

Fig. 69. Accorciamento dei mi.

Tavola VII.

Fig. 70. Id., in mi. nei quali non era aumentata la cromaticità.

Fig. 71. Accorciamento più avanzato.

Fig. 72. Accorciamento, con sfere opaline, probabilmente prodotte dai reagenti.

Fig. 73. Ritorno alla forma sferica.

Fig. 74. Principio del fuso secondario.

Fig. 75—77. Assestamento progressivo del reticolo nucleare per giungere alla formazione del fuso secondario.

Fig. 78. Fuso secondario quasi formato.

Fig. 79. Fuso secondario con piastra equatoriale.

Fig. 80. Allungamento del fuso secondario.

Fig. 81. Separazione dei cromosomi.

Fig. 82. Ricostituzione dei nuclei figli.

Fig. 83. Aspetto dei nuclei al momento del distacco.

Fig. 84—85. Stadî simili al precedente.

Fig. 86. Stadio poco più avanzato.

Fig. 87. Ricostituzione della struttura normale nei nuclei figli.

Fig. 88. Fuso primario della seconda divisione di maturazione (microgamete).

Fig. 89. Fusi secondarî della stessa divisione, coniugazione doppia.

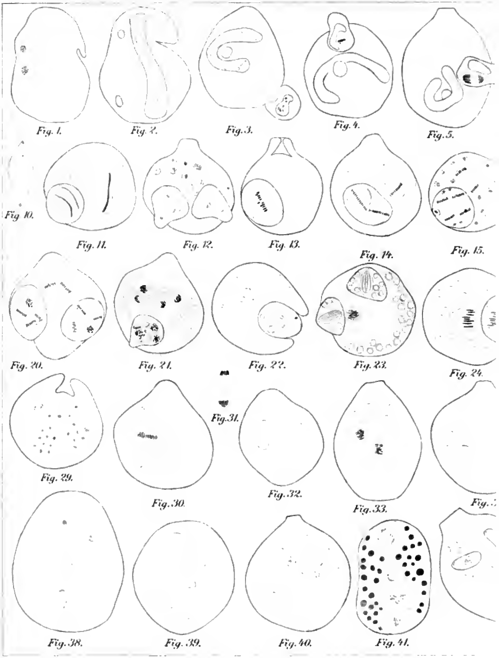
Fig. 90. 4 nuclei nel macrogamete (ed 8, non disegnati, nel microgamete).

Fig. 91. Come sopra; stadio poco posteriore.

Fig. 92. Modificazioni dei mi. che non vengono utilizzati (microgamete).
Fig. 93. Stadio poco più avanzato; mi. che si prepara all' ultima divisione.
Fig. 94. Stadio simile a qnello della fig. precedente, ma con aspetti un poco diversi.
Fig. 95. Fuso primario dell' ultima divisione (microg.).
Fig. 96. Fnsi secondarî.
Fig. 97. Spartizione dei cromosomi (circa 8 per ogni parte) (macrogamete).
Fig. 98. Fine dell' ultima divisione (microg.).
Fig. 99. Avvicinamento dei nuclei eterosessnali.
Fig. 100. Ulteriore avvicinamento, con rottura della membrana divisoria.
Fig. 101. 2 nnclei, dopo la copnlazione.
Fig. 102. 2 nnclei, allo stadio di fuso primario.
Fig. 103. Id., allo stadio di fuso secondario; spartizione di cromosomi, in nno dei due. Il loro nnmero è stato leggermente diminuito, per maggior chiarezza del disegno.
Fig. 104. Fine di qnesta seconda divisione.
Fig. 105—106. Modificazioni dei nuclei destinati a diventare Ma.

Tavola VIII.

Fig. 107—110. Modificazioni dei nnclei destinati a diventare Ma.
Fig. 111—117. Id., ma con maggiore sviluppo di sostanza cromatica.
Fig. 118. Spartizione dei Ma.
Fig. 119. Una Opercnlaria dopo la spartizione dei Ma.



Verlag v. Gustav F

Digitized by Google

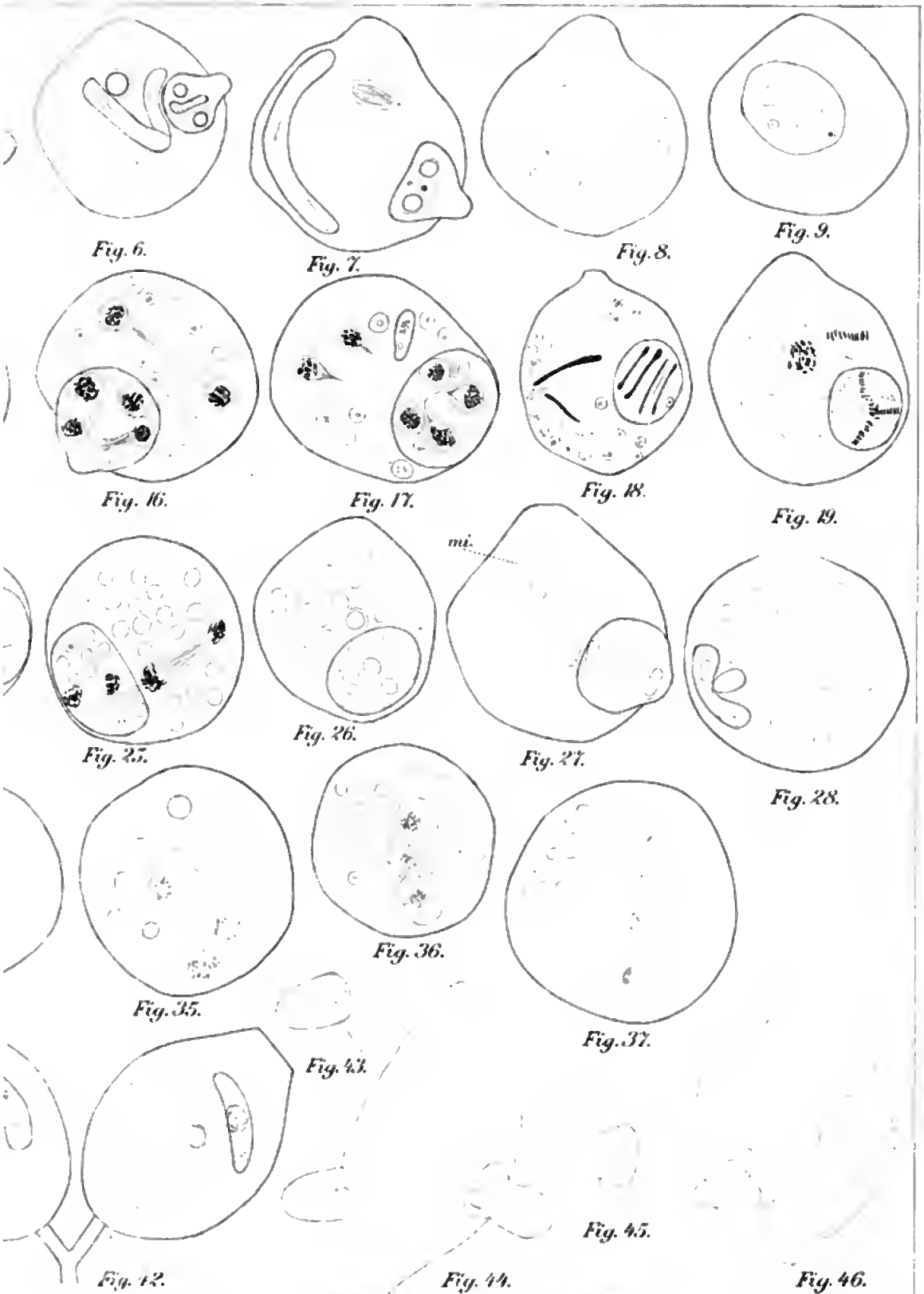


Fig. 6. Fig. 7. Fig. 8. Fig. 9.

Fig. 16. Fig. 17. Fig. 18. Fig. 19.

Fig. 25. Fig. 26. Fig. 27. Fig. 28.

Fig. 35. Fig. 36. Fig. 37.

Fig. 43.

Fig. 42. Fig. 44. Fig. 45. Fig. 46.

Lith. Anst. v. L. Aesser, Jena.

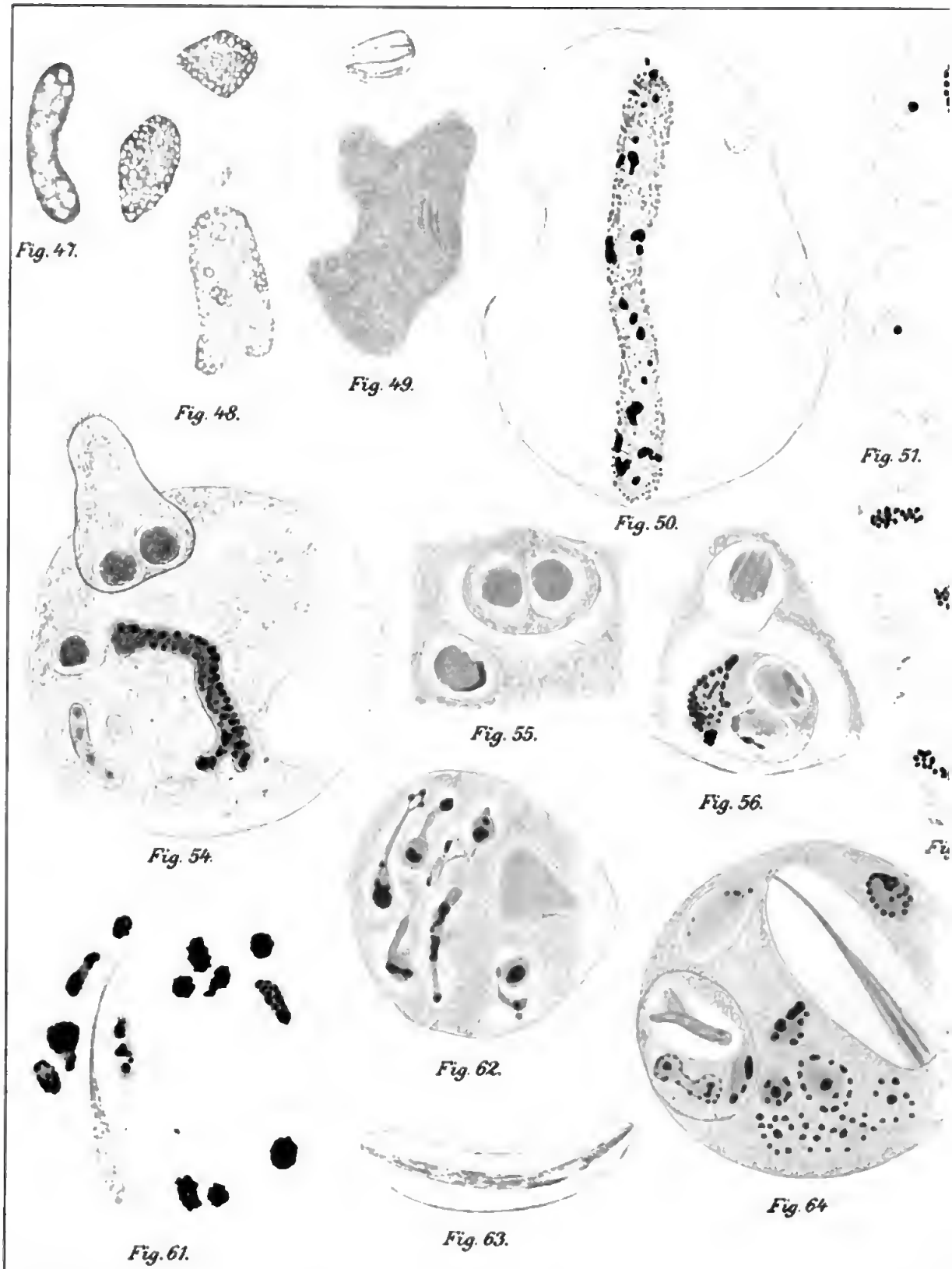


Fig. 47.

Fig. 48.

Fig. 49.

Fig. 50.

Fig. 51.

Fig. 54.

Fig. 55.

Fig. 56.

Fig. 61.

Fig. 62.

Fig. 63.

Fig. 64

Emmanuel Lez

Verlag v. Gustav

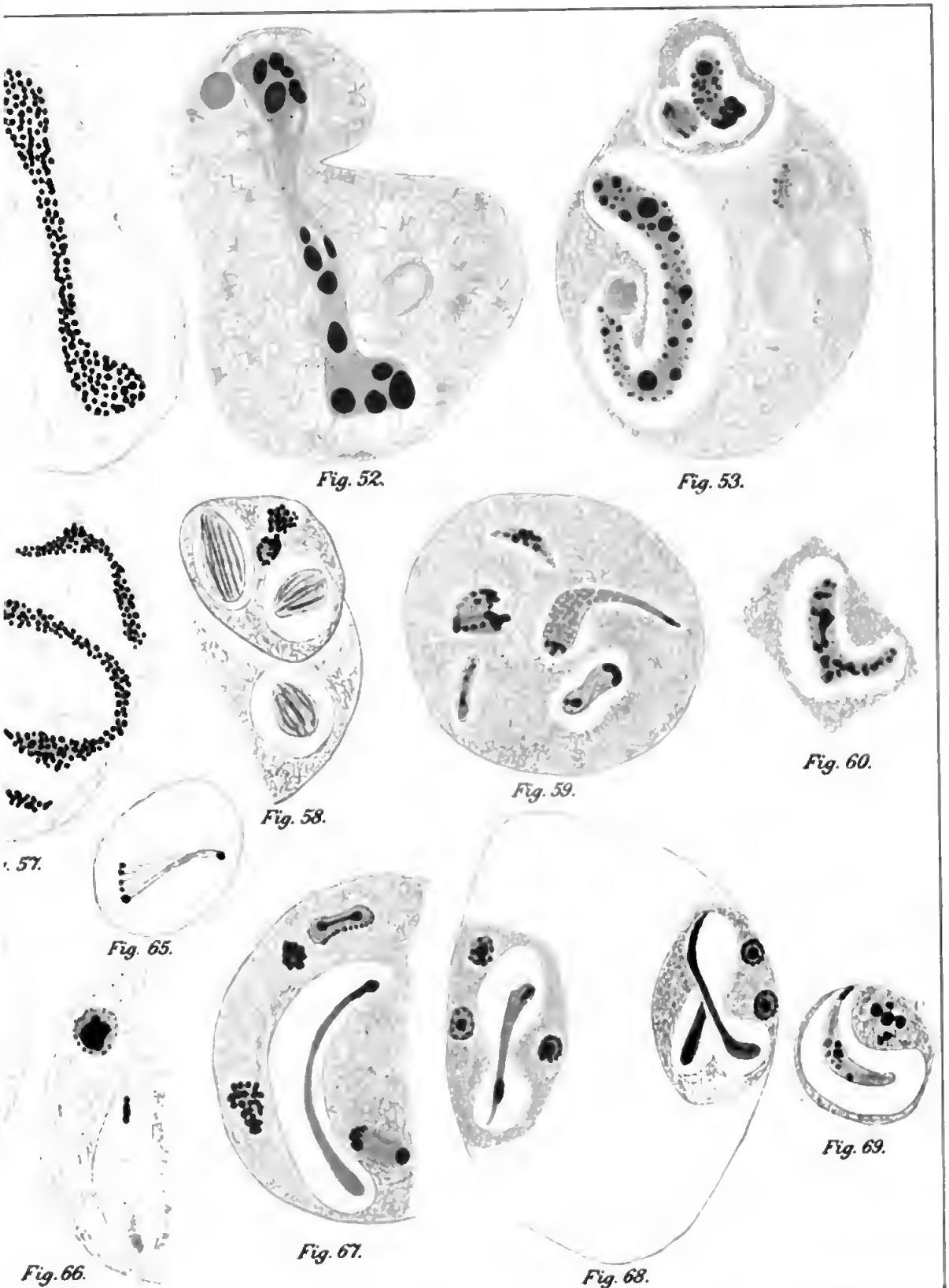


Fig. 52.

Fig. 53.

Fig. 57.

Fig. 58.

Fig. 59.

Fig. 60.

Fig. 65.

Fig. 66.

Fig. 67.

Fig. 68.

Fig. 69.

Fischer, Jena

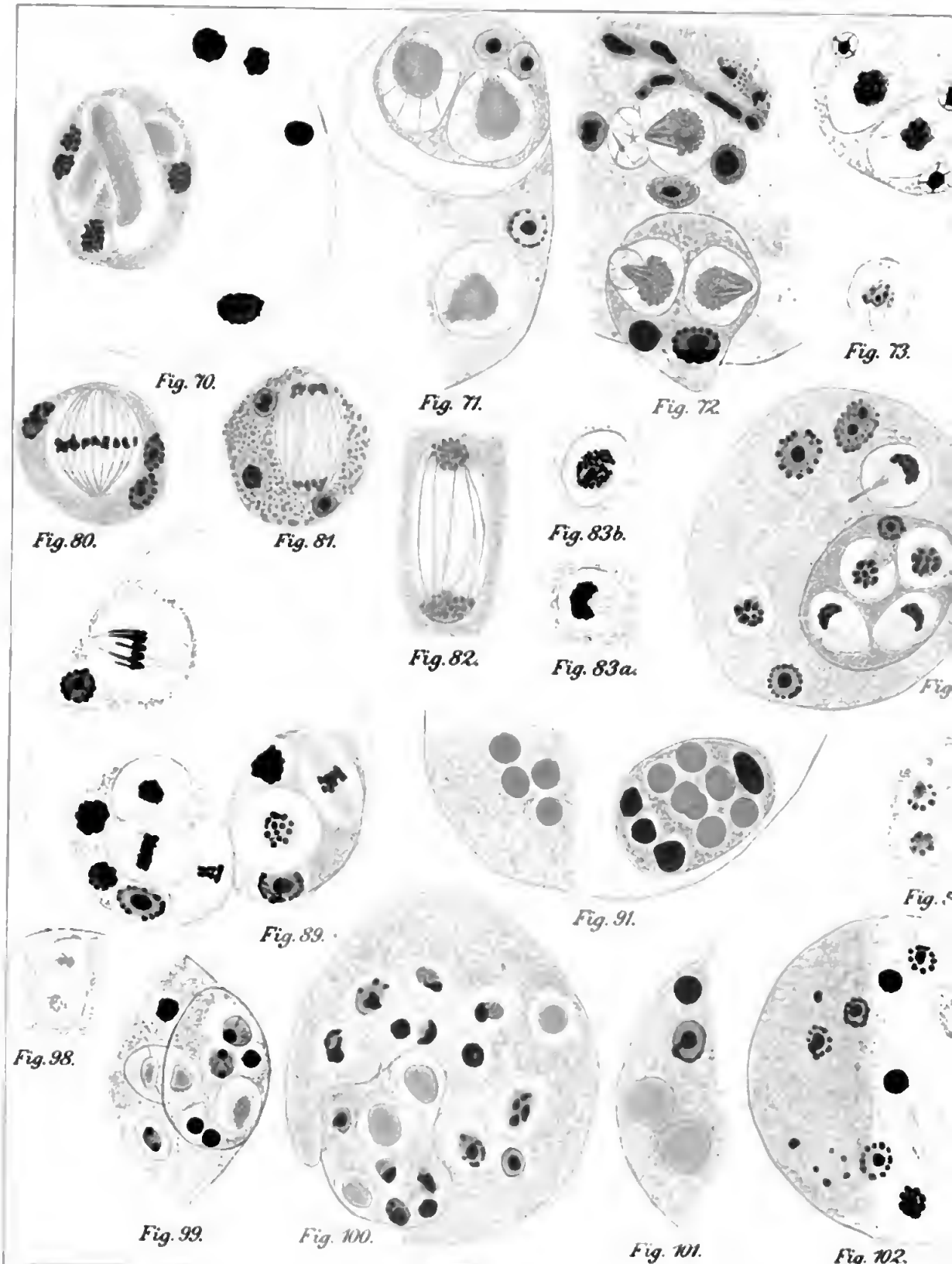
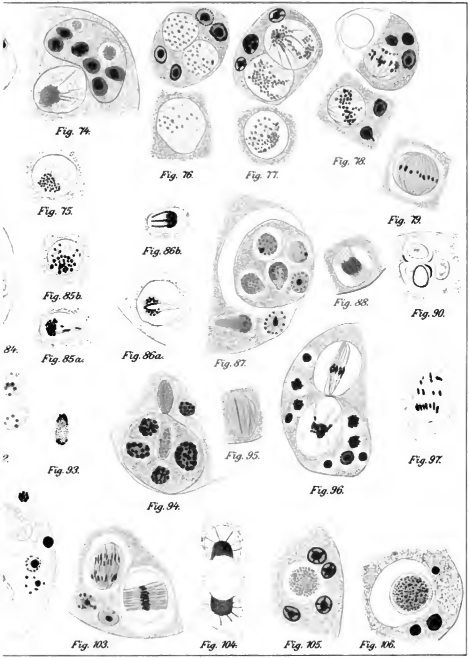


Fig. 70.
Fig. 71.
Fig. 72.
Fig. 73.
Fig. 80.
Fig. 81.
Fig. 82.
Fig. 83b.
Fig. 83a.
Fig. 89.
Fig. 91.
Fig. 98.
Fig. 99.
Fig. 100.
Fig. 101.
Fig. 102.

Verlag v. Gustav F



scher, Jena

Lith.Anst.v.E.Wesser, Jena

Digitized by Google

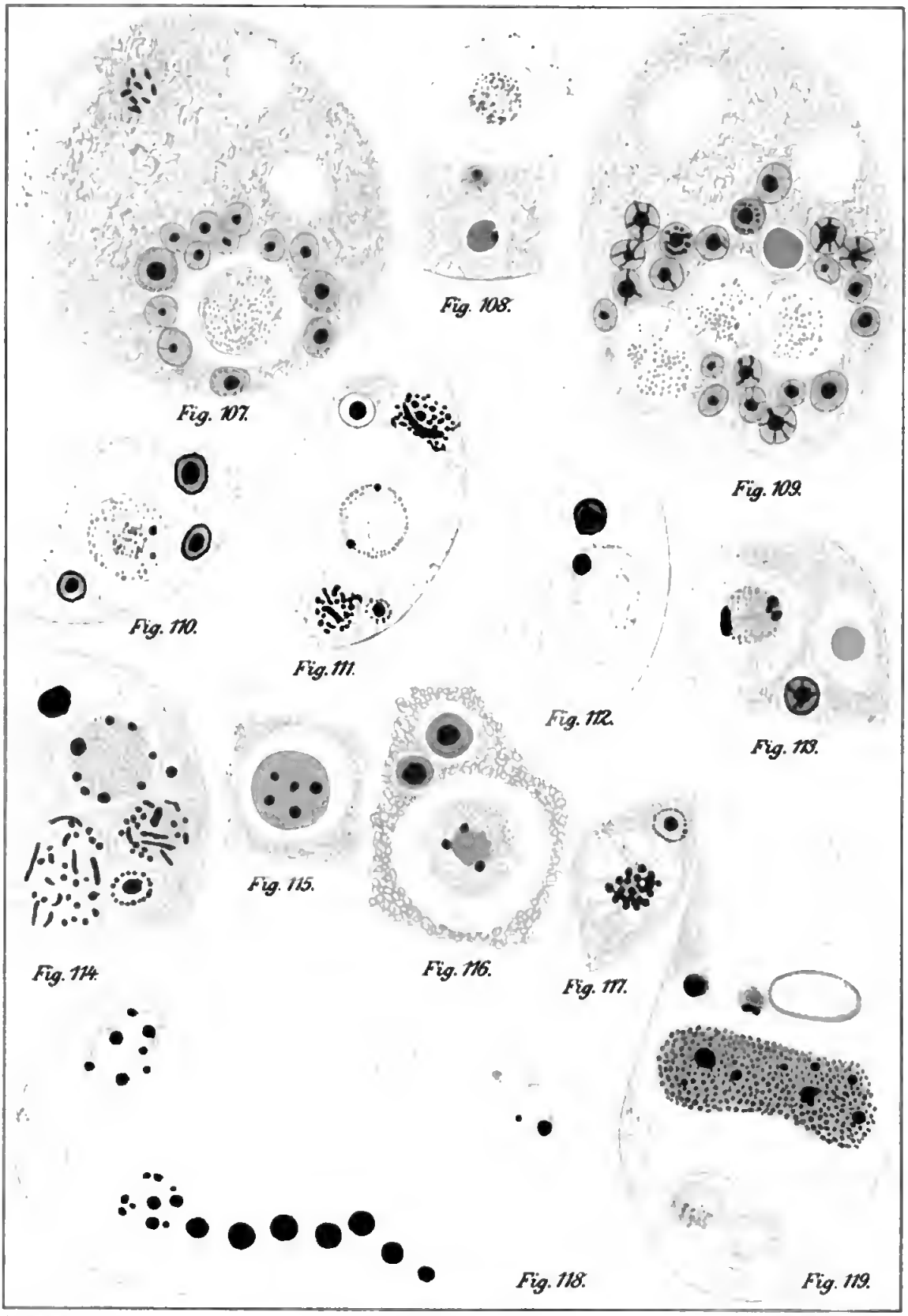


Fig. 107.

Fig. 108.

Fig. 109.

Fig. 110.

Fig. 111.

Fig. 112.

Fig. 113.

Fig. 114.

Fig. 115.

Fig. 116.

Fig. 117.

Fig. 118.

Fig. 119.

Enriques gez

Verlag v Gustav Fischer, Jena

Lith Anst v E Wesner, Jena