

# B O T A N I S C H E S   A R C H I V .

Zeitschrift für die gesamte Botanik.

Herausgegeben von Dr. CARL MEZ,

Professor d. Botanik a. d. Univers. Königsberg

I. Band, Heft 4.

Ausgegeben am 15. April 1922.

---

Verlag des Herausgebers, Königsberg Pr., Besselplatz 3 (an diese Adresse alle den Inhalt der Zeitschrift betreffenden Zuschriften). - Kommission: Verlag des Repertoriums, Berlin-Dahlem, Fabeckstrasse 49 (Adresse für den Bezug der Zeitschrift).  
Alle Rechte vorbehalten. Copyright by Carl Mez, Königsberg 1922.

---

## Anleitung zu sero-diagnostischen Untersuchungen für Botaniker

von CARL MEZ

Die Sero-Diagnostik ist aus der Immunitätslehre erwachsen. Auf ihre Theorien hier einzugehen erübrigt sich, weil diese sämtlich noch zu wenig begründet sind. Nur über das eine wird bei allen Botanikern, die sich mit diesem Forschungszweig beschäftigt haben, Übereinstimmung bestehen, dass wir in den Antikörpern, die giftige Eiweiss-Stoffe im Blut unschädlich zu machen vermögen, nicht Blut-eigene Stoffe zu sehen haben, sondern Abbau-Produkte des eingebrachten artfremden Eiweisses, des sogenannten Antigens.

Die in der Medizin vorherrschende Meinung (1), dass die Antikörper von Vorn herein im Blut vorhandene Eiweiss-Körper seien und eventuell durch das artfremde Eiweiss nur vermehrt werden, gründet sich wesentlich auf die oft beobachteten Fälle der "angeborenen Immunität" gegen infektiöskrankheiten. Ein angeborener Besitz von Antikörpern wäre sehr wohl verständlich, soweit es sich um den Schutz gegen im Lauf der Vorgenerationen häufig vorgekommene Krankheiten handelt, als eine durch Selektion gezüchtete, auf spontane Variation zurückzuführende Eigenschaft sei es einzelner Individuen sei es ganzer Rassen. Sobald aber niemals im Verlauf der Vorgenerationen dem Blut zugeführte Eiweisskörper die Bildung von Immunkörpern veranlassen oder soweit häufig vorkommende Eiweisstoffe dem Leben des mit ihnen in Blut-Mischung geratenen Organismus unschädlich sind, kann offenbar eine Selektion und die aus individueller zufälliger Bildung erblich werdende Bildung von Blut-eigenen Antikörpern nicht angenommen werden.

Gegen die zuerst von BUCHNER (2) vertretene Anschauung, dass die Antikörper unter allen Umständen dem eingeführten Art-fremden Eiweiss entstammen, kann die Beobachtung nicht aufgeführt werden, dass nach Injektion artfremden Eiweisses und starken Blut-Entziehungen die Antikörper trotzdem regulär gebildet werden. (3). Dieser Einwand hat zur Voraussetzung, dass die Antigene im Blut dauernd kreisen und im Verlauf der Blutwege die Antikörper erzeugen. Wird aber die nach unserer Meinung viel wahrscheinlichere Annahme gemacht, dass die Antigene irgend-

wo, vielleicht an den Blut-Bildungsstätten, festgelegt werden, so werden sie bei Blut-Entziehungen nicht aus dem Körper entfernt und bilden die Antikörper ungestört weiter. - Diese Anschauung hat zur Voraussetzung, dass die wirksamen Bestandteile der Antigene eventuell nur in sehr geringen Massen im eingebrachten artfremden Eiweiss sich finden und trotzdem sehr erhebliche Wirkung haben können. Niemand wird diese Voraussetzung als unmöglich oder auch nur als unwahrscheinlich bezeichnen können.

Dass die Immunstoffe dem eingebrachten artfremden Eiweiss entstammen, geht aus mehreren allgemein beobachteten Erscheinungen hervor: Zunächst spricht dafür die absolute Spezifität der Antikörper. Wie eben angedeutet, wäre diese Spezifität, als durch Natur-Auslese entstanden, eventuell bei Immunität gegen allgemein verbreitete Infektionskrankheiten denkbar, nicht aber, wenn es sich um Antikörper gegen ganz spezielle Eiweiss-Stoffe handelt, mit denen weder die die Immunkörper erzeugende Tierart noch ihre Vorfahren nach vernünftiger Überlegung jemals zusammengekommen sind. Wie soll das Kaninchen zu bluteigenen Immunkörpern gegen das Eiweiss australischer Proteaceen kommen? Wie soll es innerhalb der Proteaceen wieder spezielle Immunkörper gegen das Eiweiss von Grevillea, Hakea, Protea etc. bluteigen, von vorn herein, in sich haben? - Und so hat sich gezeigt, dass es kein Pflanzeneiweiss gibt, welches nicht spezifische Immunkörper erzeugt.

Mit der Reaktion der lebenden Substanz auf dem Leben noch unbekannt, eventuell synthetisch neu hergestellte Körper kann diese spezifische Bildung von Immunkörpern nicht verglichen werden. Denn es hat sich gezeigt, dass derartige Reaktionen niemals spezifische, sondern stets Gruppen-Reaktionen sind. Die neueren Erfahrungen über die Wirkung z.B. der Narcotica (4) zeigen dies. Die strenge Spezifität der im Blut erzeugten Antikörper aber ist ja gerade das hervorstechendste an dem ganzen Erscheinungs-Komplex, diejenige Eigenschaft, auf welcher seine Verwertbarkeit für unsere spezielle Forschungs-Richtung beruht.

Weiter ist ein Beweis für die Herleitung der Immunstoffe aus den Antigenen ihre Veränderung bei steigender Immunität. Bei unsern Objekten kann es sich nicht, wie bei den Immunkörpern gegen Typhus etc. allein um eine immer weiter gehende Anhäufung eines und desselben Körpers handeln. Denn bei steigender Immunität treten immer weiter gehende, nicht durch einfache Kumulation erklärbare Eigenschaften der Immunkörper auf. Um ein Beispiel zu nehmen: ein schwach immunisiertes Serum (Serum von geringem Titer) reichte (5) von Juglans aus nicht mehr bis zu den niederen Centrospermen-Familien herunter, während ein solches von hohem Titer mit diesen vollwertige Reaktionen ergab. Diese Erscheinung ist beim Vergleich von Seren verschieden hohen Titer bei botanischen Verwandtschafts-Untersuchungen allgemein beobachtet worden und drängt den Schluss auf, dass mit steigender Immunität eine qualitative Veränderung der Immunstoffe eintritt.

So kompliziert sich das Bild, je mehr unsere Kenntnisse sich vermehren, immer weiter und mit den Anschauungen, dass die Immunstoffe bluteigene Körper seien, ist definitiv zu brechen. - Dass die allgemeine Erwerbung der Eigenschaft des Blutes, bei Einbringen artfremden Eiweisses dieses derart zu verändern, dass durch die entstehenden Körper die schädlichen Wirkungen aufgehoben werden, eine im Kampf gegen die Infektionskrankheiten erworbene Eigenschaft des Blutes ist, kann nicht bezweifelt werden und spricht nicht gegen unsere Anschauungen. Denn diese durch Selektion immer weiter vervollkommnete Eigenschaft des Blutes stellt keine spezifische, sondern eben eine Gruppen-Reaktion im oben angezogenen Sinn dar.

Mit den besonders bei den botanisch-serologischen Arbeiten hervorgetretenen Tatsachen deckt sich am besten die Anschauung, dass wir es bei den Immunstoffen mit im Blut entstehenden Abbau-, Verdauungsprodukten der artfremden Eiweiss-Stoffe zutun haben. Vielleicht nicht rein für sich allein, sondern wohl in Verbindung mit Eiweiss-Körpern, die vom Blut des Immuntiers abgespalten und dem artfremden Eiweiss-Rest angelagert werden, aber doch im wesentlichen dem Antigen entstammend. Dabei kann die Veränderung, welche die Immunkörper bei steigender Immunität erleiden, als durch immer weiter gehenden Abbau resp. durch immer wei-

ter gehende Ersetzung weggelöster Micellen-Komplexe des Antigens durch solche des Immuntier-Blutes angesehen werden. Für die Anschauung einer reinen Denudation des centralen Molekül-Komplexes des Antigen-Eiweisses würde die steigende Verbindungsfähigkeit des Nests bei immer weiter gehender Immunisations sprechen. Aber das sind alles nur Worte, die ebenso wenig einen Einblick in die uns noch völlig unbekanntem innern Zusammenhänge gewähren, wie dies die berühmten Theorien von den Seitenketten etc. tun.

Bei der ganzen Sero-Diagnostik haben wir es mit blutiger Empirie zu tun, mit der Beobachtung, dass in Millionen von Fällen die Wirkung der Ursache folgte, ohne dass wir auch nur eine Ahnung von den sich abspielenden Vorgängen haben.

Über die Sicherheit und Zuverlässigkeit der Methode heute auch nur noch ein Wort zu verlieren wäre unnütz. Kein gerichtlicher Mediziner scheut sich mehr, aufgrund der Sero-Diagnostik sein Gutachten abzugeben, das eventuell ein Todesurteil zur Folge hat; bei unsern botanischen Versuchen haben sich in Zehntausenden von Einzelfällen, in Hunderttausenden von Reaktionen, noch keine Widersprüche der Serum-Methode und noch keine Ergebnisse gezeigt, welche an sich unverminftig gewesen wären. Wenn es manchem nicht in den Kopf will, dass die Primulales, die Ericales mit den "übrigen" Sympetalen stammesgeschichtlich nichts zutun haben, so wird eben die Systematik unlernen müssen. Was bisher auf Sentiments und allgemeine Erwägungen über Ähnlichkeiten und Unähnlichkeiten begründet wurde, steht in den allermeisten Fällen in bestem Einklang mit den Ergebnissen der Sero-Diagnostik. Ich stimme HOFFMANN (6) voll zu, wenn er den Scharfsinn hervorhebt, der in den allermeist auf so arbiträre Merkmale begründeten Zusammenreihungen, um nicht Zusammen-Reimungen zu sagen, unseres heutigen natürlichen Systems steckt.

Wer die Bestätigung seiner gewöhnten Anschauungen durch die Sero-Diagnostik gern mitnimmt, soll sich nun aber nicht von den abweichenden Ergebnissen derselben abwenden. Über die Phantasien HALLIER's, über die Pleiophylie der Dicotylen etc. wird ernsthaft diskutiert; die auf den unsichersten, rein gefühlsmässigen Schlüssen beruhenden Anschauungen WETTSTEINS's, LOTSY's sind in allgemein und mit Recht hochgeschätzte Lehr- und Handbücher übergegangen: so wird sich auch die Sero-Diagnostik durchsetzen. Denn sie hat einen ungeheuren Vorteil gegenüber allen andern phylogenetischen Methoden: sie ist experimentell, kann jeden Augenblick nachgeprüft werden.

Nicht auf unsichere und den Einflüssen der Aussenwelt direkt ausgesetzte, deshalb eventuell convergent ausgebildete Eigenschaften der Lebewesen bezieht sich die Sero-Diagnostik, sondern, worauf HOFFMANN (7) mit Recht hinweist, auf wirkliche Verwandtschafts-Verhältnisse, nämlich auf die chemischen Verwandtschaften der Eiweiss-Stoffe. Wie wenig wir diese chemischen Verwandtschaften noch zu definieren vermögen, hat mit der Anwendung der Methode an sich nichts zu tun. Sie ist unerschütterlich, bis die erste nicht auf Unvollkommenheit der Untersuchung beruhende, sondern bei untadeliger Anwendung der Methode sich ergebende Unstimmigkeit erwiesen wird. Zu solchen Unstimmigkeiten würde ich z.B. rechnen Reaktionen, die von Endgliedern wohl charakterisierter Zweige des serologischen Stammbaums zu andern Endgliedern (also z.B. von den Urticales zu den Rhoadales, Sapindales, Tubiflorae und von diesen unter sich) reichen würden. Die Familien, welche nicht miteinander reagieren können, sind aus dem am Ende gegebenen serologischen Stammbaum ersichtlich: jede untadelige Reaktion, die sich derart ergeben würde, müsste das ganze Gebäude der botanisch-serologischen Stammesforschung erschüttern.

Dagegen sehe ich in kleinen Abweichungen und kleinen Unstimmigkeiten, die sich da und dort ergeben haben, keinen Grund, die ganze Methode für unsicher zu halten sondern allein den Antrieb, mit neuen Untersuchungen dort einzusetzen und die Zweifel aufzuklären. Dazu ist aber bei allem Fleiss und aller Erfahrung ein einziges Institut nicht in der Lage. Eine anderweitige Nachprüfung, Ergänzung und Erweiterung der bisherigen serologischen Befunde ist wünschenswert.

Dass diese nicht bereits längst eingesetzt hat, liegt wohl hauptsächlich an der dem Botaniker ungewöhnten, seinem sonstigen Arbeitsgebiet so weit entfernt liegenden Neuheit der Methode. Mit Versuchstieren zu arbeiten, "Vivisektion" zu

treiben, blutige Hände zu bekommen ist dem friedlichen Betrieb der Botanik scheinbar so widersprechend, dass es begreiflich ist, wenn die Botanik sich bisher im Allgemeinen von der Sero-Diagnostik fern gehalten hat. Dazu kommt, dass man alles, auch die gerade hier inbetracht kommenden Untersuchungs-Methoden kennen und können muss. Die paar ersten Versuchstiere gehen auch bei den unter steter Überwachung und Anleitung stattfindenden Untersuchungen in meinem Institut den Anfängern meist nutzlos verloren und nur die eigene Erfahrung lehrt mit der Zeit, die Methode beherrschen.

Aus den medizinischen Anleitungen ist über die Methode und ihre Ausführung das Nötige zu ersehen und wir haben die Sache auch zuerst im hygienischen Institut lernen müssen; wenn aber der Botaniker sich mit solchen Untersuchungen beschäftigen will, und ich möchte darauf hinweisen, dass dies aus mehr als einem Grund sehr wünschenswert wäre, so wird er am liebsten botanischer Anleitung folgen, die vom botanischen Standpunkt aus manches, was dem Mediziner vielleicht wichtig ist, weniger betont, die Schwierigkeiten aber, die der Mediziner bei seiner andersartigen Schulung leicht vermeidet, vielleicht auch gar nicht empfindet, hinwegzuräumen vermag.

### I. Die Versuchstiere.

Als Versuchstiere eignen sich am besten Kaninchen: sie liefern mehr Serum als Meerschweinchen oder Ratten, sind leichter zu behandeln als die letzteren und billiger zu halten als alles andere Getier. In botanischen Gärten wird man während der warmen Jahreszeit mit der Ernährung keine Schwierigkeiten haben. Doch sind für geimpfte Tiere neben dem Wasser Heu und Hafer die alleinige Nahrung; sonst ist Hafer wenigstens als Beifütterung notwendig. - Ein mit der Wartung der Kaninchen beauftragter Arbeiter wird bald die nötige Liebe zu seinen Pfleglingen haben; er muss soweit gebracht werden, dass er selbständig das Wohlbefinden der Tiere zu beurteilen vermag und insbesondere bei plötzlichem Abfallen der Gesundheit rechtzeitig benachrichtigt, damit eventuell noch Notschlachtungen vorgenommen werden können. Jedes Tier gewinnt mit der auf seine Immunisation verwendeten Arbeit hohen Wert!

Die Stallung haben wir an das Gewächshaus angebaut, sodass auch im Winter völlige Frostfreiheit besteht; für saubere, luftige und trockene Unterkunft ist gesorgt.

Als Versuchstiere verwenden wir die gewöhnliche Landrasse, die sich besser bewährt hat als höher gezüchtete Rassen. Es empfiehlt sich sehr, die Tiere selbst zu ziehen, um vor der Einschleppung von Krankheiten geschützt zu sein. Ein einziges mit Coccidiose behaftetes Tier bringt allgemeines Sterben und zwingt zu kostspieligen Desinfektionen der Stallungen. - Ist es unvermeidlich, fremde Tiere zu kaufen, so müssen dieselben wenigstens 3 Wochen lang von den übrigen getrennt und in anderem Raum Quarantäne durchmachen.

### II. Die Vorbereitung der Versuchstiere.

Sollen die Tiere verwendet werden, so erhalten sie zunächst wenigstens eine Woche lang besonders gutes und reichliches Futter. Insbesondere wird ihnen die Hafer-Ration nicht mehr zugemessen, sondern sie erhalten davon soviel sie mögen. Reichliche Grünfütterung ist in diesem Stadium zu vermeiden, Wruken sind gar nicht mehr zu geben.

Vor der ersten Impfung erhalten die Tiere ihre Erkennungsmarken (messingene Briefklammern mit Nummern) durch ein Ohr gesteckt. - Nach der ersten Impfung werden die Tiere von den ungeimpften getrennt und bleiben es bis zu Ende. Man kann die geimpften Tiere zusammen halten, doch trenne man die Geschlechter. - Die Nahrung besteht nun nur noch aus Heu, Hafer und Wasser. - Vor der Schlachtung müssen die Tiere völlig isoliert werden und 24 Stunden lang hungern, weil sonst leicht unkontrollierbare Trübungen (wohl aus im Blut kreisenden und noch nicht assimilierten Nahrungs-Stoffen bestehend) auftreten.

## III. Die Vorbereitung der Antigene.

Alle als Antigen (d.h. zur Erzeugung eines Immunserums) zu verwendenden Samen müssen von vorn herein in genügender Menge vorhanden sein; wie gross diese Menge ist, wird schon bei den Vorversuchen aus der Intensität der Fällung mit ES-BACH-Lösung sich ungefähr ergeben. Ist der Niederschlag nur gering, so wird man in der Regel mehr Samen zur Immunisation brauchen als im umgekehrten Fall. Doch ist diese Regel keineswegs ohne Ausnahme! Auch rechne man bei Beginn jeder Immunisation mit Tier-Verlusten und Sorge dafür, dass man dann nicht den Versuch aus Samen-Mangel abbrechen muss.

Die Samen brauchen nicht frisch zu sein, wenn sich auch häufig aus frisch gesammelten Samen mehr Eiweiss in Lösung bringen lässt als aus alten. Sehr gut verwendbar sind die in botanischen Gärten aus dem Samenaustausch von den Vorjahren liegen gebliebenen Sämereien, auch wenn sie die Keimfähigkeit verloren haben. Es ist bekannt, dass man sich auf die Bestimmungen der botanischen Gärten nicht immer felsenfest verlassen kann! - Auch aus Herbarien stammende reife Samen, wie es scheint beliebig hoch im Alter, und Alkohol-Material der Sammlungen ist verwendbar (8). Dies stimmt gut mit den Erfahrungen der medizinischen Forscher (9) überein, wonach auch stark eingetrocknetes Material (bis zu 70 Jahren), auch gefrorenes, sonnenbestrahltes, nicht zu stark gefaultes noch die Reaktion zulässt. Dagegen ist in Formalin, Schweflige Säure, Sublimat eingelegt gewesenes Material für die Untersuchungen nicht brauchbar.

Die Samen werden behufs Verwendung so gut dies ohne besonderer Hilfsmittel möglich ist, von dem Ballast, den Frucht- und Samenschalen befreit. Dies braucht nicht soweit zu gehen, dass man z.B. bei Umbelliferen-Früchten das Pericarp entfernt. Man wird vermeiden, dass die überwiegende Menge des herzustellenden Pulvers aus Ballast besteht, sich aber nicht zu ängstlich mit der Reinigung abquälen. - In vielen Fällen ist es aber nötig, peinlicher zu Werk zu gehen, nämlich überall dort, wo in der Frucht- oder Samenschale grössere Schleimmengen vorhanden sind. Diese sind sowohl für die Injektionen wie für die Reaktionen ausserordentlich störend. Bei Injektionen liegen sie oft wochenlang als grosse Depôts in der Bauchhöhle der Kaninchen und verhindern die Aufnahme des Eiweisses. Durch vorherigen Einweichen der Samen und Abziehen der schleimführenden Schichten wird man öfters diese Störung beseitigen können. - Solche eingewiechte Samen müssen dann natürlich wieder getrocknet werden.

Die darauf nötige Pufferisation soll ein mittelfeines Pulver nach Vorschrift des Arzneibuchs ergeben. Sie wird im Acaht- oder Porzellanmörser vorgenommen. Die Pulvermühle ist niemals genügend rein zu halten, um zu den Versuchen verwendet werden zu dürfen. Metallmörser ertragen die in Ausnahmefällen nötige Reinigung mit Säure nicht. - Sehr feines Material, besonders Farnsporen, haben wir früher mit Schmirgel-Pulver zerrieben. Wir sind davon abgekommen, weil die Adsorption des Eiweisses durch die feinen Schmirgel-Körner die Ausbeute an gelöstem Eiweiss zusehr vermindert hat. Bei genügend langer Bemühung erhält man im rauhen Mörser auch ohne Reibemittel eine genügend feine Masse, die feucht bis teigartig werden soll.

Von grösster Wichtigkeit ist, dass der Mörser nach jeder Verwendung sofort auf's Feinlichste gereinigt wird. Wer bedenkt, wie minimale Quantitäten von Eiweiss zur Durchführung der Fällungen eventuell führen kann, wird sich dessen bewusst sein, dass auch die geringste Unsauberkeit beim Ausgangs-Material vermieden werden muss. - Die Reinigung der Mörser findet mit gewöhnlichem Wasser und oftmaligem, intensivem Ausreiben mit Alkohol statt. Nur in Ausnahmefällen ist Salzsäure zu verwenden, welche sich aus den Mörsern nur sehr schwer wieder entfernen lässt.

Das so gewonnene Pulver ist in vielen Fällen für die Verwendung noch nicht bereit, sondern muss überall dort, wo fettes oder aetherisches Öl in grösserem Ausmass vorhanden ist, durch Alkohol und Äther extrahiert werden. Damit gehen auch die eventuell vorhandenen giftig wirkenden Alkaloide etc. in Lösung und

werden entfernt. Fettröpfchen, welche alle Filter passieren, führen zu Emulsionen, die das Bild der Reaktionen trüben. - Bei der Verwendung der Samenpulver behufs Immunisation ist im allgemeinen eine Extraktion des Fettes unnötig; dazu verwenden wir die Alkohol-Äther-Extraktion nur, wenn giftige Stoffe aus den Samen entfernt werden sollen. In sehr vielen Fällen, besonders wenn giftige Eiweiss-Körper in den Samen vorhanden sind, versagt allerdings auch diese Extraktion.

Man halte sich von jedem Samen ein grösseres Quantum gepulverten Materials; oft ist es im Lauf der Reaktionen wünschenswert, vorher im Plan noch nicht vorge-sehene Reaktionen einzuschieben und dies kann nur dann ohne Zeitverlust erreicht werden, wenn bereits vorgearbeitet ist. - In gut geschlossenen Gläsern halten sich die Pulver zur Zufriedenheit.

Zur Vorbereitung der Pulver gehört noch deren approximative Untersuchung auf den Gehalt an löslichem Eiweiss. Dazu digeriert man bei Zimmertemperatur 0,25 gr des Samenpulvers mit 20 ccm physiologischer Kochsalzlösung (0,85%), filtriert durch doppeltes Filter und setzt ESBACH-Lösung (1,0 Pikrinsäure, 2,0 Zitronensäure, 100,0 dest. Wasser) zu quoad satis. Der entstehende Niederschlag stellt das ausgefällte, in Lösung gewesene Eiweiss dar; seine Menge wird nach 24-stündigem Absitzenlassen nach der Höhe der Säule gemessen und dieses Mass den Samenpulvern zunotiert.

Die Lösungen aller Samenpulver auf gleichen Eiweiss-Gehalt beim Gebrauch einzustellen ist eine Forderung, die mehr theoretische als praktische Bedeutung besitzt, soweit es sich um die Immunisation der Versuchstiere handelt. Wir suchen zwar, wenn dies ohne Schwierigkeit geht, durch Anwendung von bald grösseren bald kleineren Mengen des Samenpulvers, je nach seinem Gehalt an löslichem Eiweiss, auf die gleiche Menge physiol. Kochsalzlösung gleichen Eiweiss-Gehalt der Extrakte zu erreichen. Aber dies Verfahren ist nur beschränkt anwendbar, da bei eiweiss armen Samen häufig zu dicke Samenbreie entstehen, die selbst mit Hilfe der Luftpumpe nur sehr unvollkommen filtrieren. Bei solchen Eiweiss-armen Samen kann man die Extrakte im Vakuum eindicken bis sie die gewünschte Konzentration haben; bessere Erfolge unter Aufwendung geringerer Mühe haben wir dadurch, dass in solchen Fällen die Zahl der Injektionen erhöht wird.

Es hat sich bei einer grösseren Zahl von Samen gezeigt, dass die Extraktion mit physiologischer Kochsalzlösung entweder gar kein Eiweiss in Lösung bringt, oder nur sehr geringe Mengen desselben. Nun ist zwar zu betonen, dass wir über die die Immunität erzeugenden Eiweiss-Körper gar nicht unterrichtet sind. In der Kochsalz-Lösung befinden sich wahrscheinlich auch viele nicht verwandtschafts-spezifische Körper und deren Masse im Vergleich zu den spezifischen ist mit einfacheren Mitteln niemals bestimmbar. Die Geschwindigkeit und Höhe der Immunisation, die im übrigen dazu noch sehr von der Individualität des Versuchstiers abhängt, braucht deshalb, obwohl sie es gewöhnlich tut, keineswegs mit der nach ESBACH gemessenen Eiweiss-Menge im Extrakt parallel zu gehen. Deshalb erzielt man öfters auch mit recht Eiweiss-armen Extrakten gute Immunitäten. Man versucht deshalb unter allen Umständen zunächst, mit physiol. Kochsalzlösung behufs Gewinnung des Antigens auszukommen, weil die Ergebnisse dieser Methode uns, nach vielen Vergleichen, etwas zuverlässiger zu sein scheinen.

Geht die Extraktion mit Kochsalzlösung aber nicht, so verwenden wir anstelle dieses Mittels 0,1% Natronlauge zur Samen-Extraktion. Man kann selbst, in besonders schwierigen Fällen, bis zu 1% Lösung gehen. Dagegen hat sich die Extraktion mit phosphorsauren Salzen nicht bewährt. Andere Lösungsmittel auszuprobieren hatten wir keine Veranlassung, weil wir mit den angegebenen immer auskamen. - Die 0,1% Natronlauge-Lösung kann den Tieren ohne weiteres eingespritzt werden; die stärkeren Konzentrationen sind vor dem Gebrauch mit Essigsäure zu neutralisieren.

Obgleich die Pulver nicht steril sind, werden doch stets sterile Lösungsmittel wie auch sterile Gefässe zur Gewinnung der Injektions-Flüssigkeit verwendet. Sogut dies möglich ist, soll die Infektions-Möglichkeit herabgemindert werden.

## IV. Die Immunisation der Tiere.

Es wird 5 gr Samenpulver abgewogen, dasselbe mit 25 ccm physiologischer Kochsalzlösung (0,85%)  $\frac{1}{2}$  Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen, alle 10 Minuten umgerührt, darauf durch ein doppeltes Papierfilter, eventuell mit Hilfe der Luftpumpe, abfiltriert. Dabei kommt es für die Immunisation nicht darauf an, dass das Filtrat völlig klar ist. Darauf wird nochmals die ESBACH-Probe gemacht, ob in dem Auszug wirklich die vorher bestimmte ungefähre Eiweiss-Menge vorhanden ist.

Subcutane Injektionen zu machen hat bei unsern Objekten keinen Zweck; sie sind langsam in der Wirkung und unsicher im Erfolg. Es stehen uns die sichereren Wege der intraperitonealen und der intravenösen Injektion zur Verfügung. Welcher von beiden einzuschlagen ist, hängt von dem Immunisations-Material und auch von der Individualität des zu immunisierenden Tiers ab.

Bei der intravenösen Injektion kommt man im allgemeinen mit geringeren Antigen-Mengen aus. Sie wird deshalb besonders dann zu wählen sein, wenn sehr kostbares Material (z.B. Auszüge aus Sporen) oder sehr schwache Auszüge (z.B. von kleinen, mit viel Ballast beladenen Samen, wie denen von Salix, Typha etc.) zur Immunisation verwendet werden sollen. Bei der intravenösen Injektion kommt es häufiger zu Lähmungen und lähmungsartigen Zuständen, die oft den Tod herbeiführen, zu Krämpfen, Durchfällen und unwillkürlicher Entleerung des Harns, als bei der mehr schonenden intraperitonealen Injektion. Auch sind die Anaphylaxie-Verluste bei intravenöser Applikation häufiger als bei intraperitonealer. Trotzdem wird man in vielen Fällen nicht ohne intravenöse Applikation auskommen und dieselbe besonders dann mit der intraperitonealen abwechselnd anwenden, wenn die Immunisation mit der letzteren Methode allzu zögernd und unvollkommen erreicht wird. Eine einzige intravenöse Injektion zwischen sonst intraperitonealen kann zu erheblicher Abkürzung der ganzen Prozeduren führen! Wird der mit der darauf verwendeten Mühe immer höher steigende Wert eines Versuchstiers und die dauernde Gefahr seines Verlustes in dem durch die Immunisation geschwächten Zustand und durch die Immunisations-Verletzungen selbst entstehenden Gefahren erwogen, so kommt man gerade zur Abkürzung des Verfahrens häufig gegen Ende der einzelnen Versuche gern zur intravenösen Impfung.

Diese wird wie folgt ausgeführt: (ich schildere hier für Botaniker, nicht für Mediziner).

Das Tier wird mit Tüchern soweit umwickelt, dass nur noch der Kopf frei ist und in diesem Zustand von einem Assistenten gehalten. Das Ohr wird an der Injektionsstelle mit einer feinen Scheere, sogut dies ohne allzu grosse Mühe geht, von Haaren befreit und durch Reiben mit Alkohol 96% gereinigt und zugleich desinfiziert. Darauf reibt man mit einem in Xylol getränkten Wattebausch das Ohr ab und klopft es, wenn dies noch nötig sein sollte, d.h. wenn die Venen noch nicht genügend angeschwollen sind, und dadurch hervortreten, mit der Scheere leicht ab.

Dann füllt man die Injektionspritze mit dem Eiweiss-Auszug, spritzt soviel des Inhalts aus, dass keine Luft in die Vene kommen kann, und sticht die Nadel der Spritze vorsichtig, von oben nach unten, in die Randvene des Ohrs ein. Es empfiehlt sich, dies in der Nähe des Ohr-Endes zu tun, weil man beim Durchstechen der Vene (wenn also die Injektionsnadel nicht in derselben bleibt) dann noch Platz für weitere Injektionen behält. - Das Vorschieben der Nadel in der Venenbahn ist ohne Schwierigkeit feststellbar und bei kurzer Übung leicht mit Sicherheit zu erreichen. Darauf injiziert man langsam und kontinuierlich bei der ersten Injektion 2 ccm des Auszugs.

Nach dem Herausziehen der Nadel drückt man von beiden Seiten mit den Daumen-nägeln die Vene und stillt dadurch die Blutung; sollte dies nicht genügen, so umwickelt man das Ohr an seiner Basis kurze Zeit mit einem Bindfaden. - Auf die kleine Wunde kommt ein Watteflöckchen.

Noch einfacher ist die intraperitoneale Impfung: sie wird von uns gewöhnlich ausgeführt. Man verfährt dabei wie folgt:

Ein Assistent hält das Tier an beiden Hinterbeinen mit einer, an beiden Vorderbeinen mit der andern Hand. Dadurch fallen die Gedärme, soweit dies möglich ist, nach oben und man kann leichter in die untere Bauchpartie injizieren. In

dieser wird nun an einer Stelle das Haar mit einer Scheere auf ca 2 Quadratcentimeter entfernt, die entblösste Stelle mit Alkohol 96% gut abgerieben und dann mit zwei Fingern die Oberhaut in einer Falte aufgehoben. Mit steriler Scheere wird diese Falte derart durchschnitten, dass ein ca  $\frac{1}{4}$  Quadratcentimeter grosser Fleck der Muskulatur frei liegt. Dann sticht man mit der Kanüle einer Injektionspritze ("Recordspritze"), die durch  $\frac{1}{2}$ -ständiges Kochen sterilisiert war, durch die Bauchwand hinein. Wir haben früher stumpfe oder rund geschliffene geschärfte Kanülen genommen; es geht aber auch mit spitzen Kanülen, bei Anfängern sogar noch besser. Der Laie wundert sich, dass keine Verletzung der Därme eintritt; diese weichen aber der Kanüle sehr vollständig aus und es ist ein unglücklicher recht seltener Zufall, wenn einmal einer angestochen wird. Dann allerdings ist das Tier und mit ihm die auf es verwendete Mühe verloren. - Neuerdings haben wir das Verfahren noch weiter vereinfacht, weil bei der hier beschriebenen Prozedur die Infektions-Gefahr immerhin noch ziemlich gross ist. Sie kann ohne Schaden herabgemindert werden indem man die Haut nicht durchschneidet, sondern mit der Kanüle durch sie hindurchsticht; damit haben wir die besten Erfolge erzielt. Nur muss man dreist zustechen, um wirklich die Bauchwand zu durchdringen.

Die Injektion, welche steigend bis zu 10 ccm mit 4 ccm beginnt, erfolgt wieder langsam kontinuierlich; darauf wird die Kanüle herausgezogen und die Wunde mit einem Bausch von Collodium-Watte verschlossen. Früher von uns angewendetes Jodoform-Collodium hat sich wegen des Verklebens der Haare nicht besonders bewährt. - Wird die Injektion ohne Durchschneiden der Haut ausgeführt, so kommt nur ein Pinselstrich Jodlösung (10%) auf die kleine Stichwunde.

Die intraperitoneale Injektion wird von den Tieren in der Regel (zunächst wenigstens) besser ertragen als die intravenöse. Die einsetzenden Reaktionen sind weit milder und in der Regel ist nach kurzer Zeit den geimpften Tieren wenig mehr anzumerken. Im ungünstigen Fall, besonders wenn giftige Eiweiss-Körper eingespritzt wurden, tritt nach 10 Minuten bis  $\frac{1}{2}$  Stunde der Tod ein. Als Samen, bei denen wir solche schlimmen Erfahrungen gemacht haben ohne dass von ihnen Giftwirkung bekannt gewesen wäre, nenne ich diejenigen von *Viola tricolor*, *Cumellia japonica*, *Phytolacca americana*, *Rhododendron flavum*. - Mit solchen Samen weiter impfen zu wollen, eventuell den Versuch zu machen, die Tiere durch ganz kleine Anfangsgaben an das Eiweiss zu gewöhnen, hat allermeist keinen Zweck und führt nur zum Verlust immer weiterer Tiere. Es ist bedauerlich, dass durch derartige unüberwindbare Misserfolge mehrfach wichtige Immunisationen nicht durchgeführt werden konnten; von den gleichen Familien werden andere Spezies zu prüfen sein, ob sie besser verwundbar sind.

In anderen Fällen tritt gleichfalls ungünstiger Ausgang, aber später, ein. dann sind es meist nicht giftige Eiweiss-Stoffe, sondern andere Giftstoffe, die die Ursache des Misslingens darstellen. So wirken z.B. Saponine bei starken Injektionen nach ca 2 Stunden, nach schwachen erheblich später tödlich. Auch mit den Saponin-haltigen Samen kann man die Immunisation nicht erzwingen, selbst wenn man diese Stoffe nach ABDERHALDEN (10) zerstört. - Nach jedem Todesfall muss die Sektion gemacht werden. Kann man das zunächst selbst noch nicht, so bitte an einen Mediziner zur Hilfe. Es kommen für uns nur wenige bei der Sektion zu entscheidende Fragen inbetracht; nach kurzem lernt man das genügend selbst machen. So ist nach der Einwirkung der Saponine das haemolytische Blutbild bezeichnend. Ist dies vorhanden, so verzichte man auf weitere Versuche mit der betr. Pflanzenspezies.

In anderen Fällen dagegen, wenn der Tod der Tiere nicht sehr rasch eintritt und wenn keine Haemolyse vorliegt, ist es sehr wohl möglich, mit ganz kleinen Gaben des Antigens zu beginnen und das Tier an die Schädlichkeit zu gewöhnen. Auch dann, wenn nach den Injektionen starke Durchfälle der Tiere eintreten, pflegt dies der Fall zu sein. Angesichts der Tatsache, dass von vielen Pflanzenfamilien nur ganz wenige Spezies in den europäischen Gärten kultiviert werden und deshalb das Samenmaterial selten ist, hiesse es auf viele dringend notwendige Untersuchungs-Objekte verzichten, wenn man nach dem ersten Misserfolg stets gleich die

Sache aufgeben wollte.

Wieder in anderen Fällen treten lähmungsartige Erscheinungen, besonders der hinteren Extremitäten, oder Krämpfe oder Durchfälle etc, ein, ohne zum Tode zu führen. Solche Erscheinungen können sich nach kurzer Zeit, eventuell im Laufe eines Tages, wieder zurückbilden und werden bei den folgenden Injektionen immer weniger auffällig.

Noch häufiger sind die erfreulichen Fälle, in denen das Tier von der Injektion wenig Notiz nimmt und manchmal direkt nach ihr weiter frisst. Allerdings weicht auch hier das zunächst vorhandene Wohlbefinden nach ca.  $\frac{1}{2}$  Stunde einem vorübergehenden Krankheitsbild, dessen Ursache die mit der beginnenden Resorption des artfremden Eiweisses einsetzenden Fieber-Erscheinungen sind. Aber das hat, jedenfalls bei den ersten Injektionen, keine ungünstige Bedeutung. Gewöhnlich sind die geimpften Kaninchen spätestens den folgenden Tag wieder völlig munter und fressen, als ob nichts geschehen wäre.

Die folgenden, zur Erreichung der Immunität notwendigen Injektionen werden je nach dem Verhalten der Tiere, verschieden appliziert. Zur zweiten warte man 3 Tage; wird diese gut vertragen, so kann man die 3. fünf Tage darauf anlegen; bei dauerndem Wohlbefinden der Tiere kann schliesslich jeden dritten Tag geimpft werden. Auch werden zweckmässiger Weise die Injektionsmengen je nach dem Befinden der Tiere gesteigert oder vermindert. Muss das Tier an einen Auszug gewöhnt werden, so beginne man mit 2 ccm und steige dann allmählig bis zu 10 ccm. Dies ist die Normalmenge, ohne dass gesagt werden soll, dass sie nicht in Einzelfällen, und zwar manchmal erheblich, überschritten werden könne.

Besonders bei der vierten bis sechsten Injektion kann es zu anaphylaktischen Erscheinungen kommen; die Tiere fiebern übermässig hoch, bekommen häufig Krämpfe und gehen manchmal binnen ganz kurzer Zeit zugrunde. Gegen diese Anaphylaxie sind wir machtlos; wie können sie nicht mit Sicherheit vermeiden. Manchmal nützt es, die Injektionen sich jeden zweiten Tag folgen zu lassen, manchmal ist eine Verlängerung der Intervalle vorteilhaft. Regeln lassen sich da nicht geben. Doch geht aus allem hier angeführten hervor, wie notwendig die ständige verständige Beobachtung der Versuchstiere ist und wie wichtig die Übergabe des Geschäfts als Kaninchenwärter an einen zuverlässigen Mann, der Zwischenfälle stets sofort bemerkt und auch meldet.

Die anaphylaktischen Erscheinungen sind zum Glück sehr von der Individualität der Tiere abhängig. Gerade ihretwegen verwenden wir den robusten Landschlag und keine Zuchtrassen, denn wir haben gefunden, dass die robusten Rassen die Anaphylaxie zwar nicht weniger zeigen, aber leichter überstehen als die hochgezüchteten.

#### V Die Probe-Blutabnahme

Der Eintritt der Immunität ist sowohl von den verwendeten Antigenen wie ganz besonders von den Individualitäten der Tiere abhängig, höchst verschieden und kann niemals vorausgesagt werden, auch dann nicht, wenn man hintereinander mehrere Kaninchen mit dem gleichen Antigen behandelt. Wir haben Tiere gehabt, die sich überhaupt nicht immunisieren liessen. Die Bildung der Antikörper, ihre Anhäufung und Qualität muss demnach in jedem Fall durch Probe-Blutabnahmen und Feststellungen der Titer der erreichten Immunitäts-Stufen genau verfolgt werden.

Dabei wird man sich dessen bewusst sein müssen, zu welchem Zweck das Serum benützt werden soll. Hohe Immunitäten (1:50000 und darüber) werden keine speziellen Ergebnisse liefern, sondern ganze Äste des Systems umfassen. Derart hochwertige Sera lehren, was alles in einen ganz grossen Verwandtschaftskreis hinein gehört: die Reaktionen von den Pinaceen zu den Selaginellaceen und den Magnoliaceen (11), diejenigen von den Fagaceae zu den niederen Centrospermen (12), die von den Rhamnaceen durch den ganzen Columniferen-Ast hindurch (13), die von den Cucurbitaceen aus den ganzen Tubifloren-Ast umfassenden Reaktionen (14) sind solche Ergebnisse ganz hochwertiger Sera. Zwar geben diese theoretisch und in vielen Fällen auch praktisch eine Abstufung der Reaktionen derart, dass

dem Antigen-Formenkreis sehr nahe stehende Formen überaus starke, ihm entfernter stehende mit der Entfernung immer schwächere Reaktionen liefern; aber dies ist nicht allein von dem Titer des Immunserums, sondern auch von der im Einzelfall stets unbekanntem Menge des in den geprüften Samen-Auszügen niederfallenden Eiweisses im allgemeinen (diese Quantitäten brauchen weder mit den Mengen überhaupt gelöster Eiweiss-Stoffe noch den Mengen der Immunkörper proportional zu sein!) abhängig. Deshalb kann man diese Intensitäts-Abstufungen nicht blindlings für Schlüsse verwenden und kann auf die Mengen der mit sehr hochwertigen Sera erzielten Niederschläge keinem im einzelnen zuverlässigen Stammbaum der Eiweiss-Verwandtschaft begründen.

Sollen die gegenseitigen Verwandtschafts-Verhältnisse sich näher stehender Formenkreise geprüft werden, (also z.B. die Anordnung der Familien der Monocotylen, der Tubifloren), so gibt ein sehr hochwertiges Serum nur vieldeutige Auskunft; seine Ergebnisse können eventuell durch Kombination mit anderen Versuchen für den speziellen Zweck noch nutzbar gemacht werden, aber die eigentliche Absicht wird verfehlt. Dazu sind niedere Immunisationen (etwa bis 1 : 12800) zu verwenden.

Ob überhaupt Immunität eingetreten ist und wie hoch diese ist, wird durch die Probe-Blutabnahme kontrolliert. Man verfährt dabei wie folgt:

Die Probe-Blutabnahme geschieht stets aus der Randvene des Ohrs. Dazu wäscht man das Ohr wie oben (p. 183) dargestellt sauber mit Seifenwasser, desinfiziert mit Alkohol und reibt das Ohr mit einem in Xylol getauchten Wattebauch ein. Leichtes Klopfen mit der Scheere lässt die Vene noch intensiver anschwellen. Darauf spannt man das Ohr über den Finger und schneidet mit steriler Scheere die über der Vene liegende Haut ganz vorsichtig ab, sodass auf eine ca. 0,25 Quadratcentimeter grosse Strecke die Randvene blossgelegt wird. Diese wird dann mit einem sterilen Messer der Länge nach ein wenig angeschnitten und ca. 5 ccm des herausquellenden Blutes in einem sterilen Centrifugen-Gläschen aufgefangen.

Die Blutung wird danach durch die oben (p. 183) angegebenen Mittel gestillt; ist sie stark, so kann die Vene vorübergehend mit einer Klemme komprimiert werden; zeitweises Abschneiden der Ohrbasis mit einem Bindfaden ist das Auskunftsmittel in den schwierigsten Fällen. Von einem Umstechen der Verletzungsstelle sind wir abgekommen.

Das entnommene Blut wird durch einen sterilen Wattebausch verschlossen und kühl gestellt. Eisschrank ist nur in heissen Sommermonaten nötig.

Nach Erstarrung des Blutes wird es gleich mit erkalteter steriler Platinnadel oder mit einem dünnen Glasstab von der Wandung des Gefässes abgelöst und darauf ca. 10 Minuten mit der elektrischen Zentrifuge zentrifugiert. Dann steht das helle Serum über dem Blutkuchen. Es wird in ein zweites Zentrifugengläschen abgegossen und nochmals ebenso lange zentrifugiert.

#### VI. Die Titer-Stellung.

Zu allen im Folgenden beschriebenen Manipulationen sind im Autoklaven sterilisierte, spiegelblank gereinigte Glassachen zu verwenden!

Unter Titer versteht man den Verdünnungsgrad, in welchem das erzielte Immunserum mit dem Antigen noch unzweifelhafte Niederschläge erzeugt. Diese Niederschläge müssen sich absetzende, beim Aufschütteln flockige Substanzen sein. Trübungen, welche sich nicht flockig bzw. schlierenartig aufschütteln lassen, haben ausser Betracht zu bleiben! Zwar ist die Unterscheidung zwischen Trübung und ganz minimaler Ausflockung oft schwierig und in gewissen Grenzen subjektiv, aber hier muss Übung den Blick schärfen. Man halte sich daran, skeptisch zu sein und lieber einmal eine schwache Ausflockung nur als Trübung zu werten und demnach zu vernachlässigen wie umgekehrt - Irgend stärkere Reaktionen sind ganz unzweifelhaft und können, auch bei den Versuchen nicht voll Ausgebildeter, nicht leicht missdeutet werden.

Bei der Stellung des Titers könnte man sowohl mit Verdünnung des Immunserums wie der Antigen-Lösung arbeiten; wir verwenden den letzteren Weg, weil das

Immunserum zunächst nur in ganz geringer Menge zur Verfügung steht.

Der Eiweiss-Auszug des zur Immunisation verwendeten Samens (verg oben, p. 183) muss, wenn der Titer gestellt werden soll, im Gegensatz zu dem zur Immunisation benützten der auch etwas trübe sein darf, spiegelblank sein. Gemüht zur Erreichung dieser Eigenschaft einmalige Filtration nicht, so muss sie bis zum Erfolg wiederholt werden. - Hierbei zeigt sich die Wichtigkeit der vorherigen Entfernung von Ölen aus dem zu extrahierenden Samenpulver (vergl oben, p. 182).

Man stellt in einen hinten mit verschiebbaren schwarzen Zeugstreifen, durch die das Licht abgeblendet werden kann, versehenen Reagenzglas-Ständer 10 sehr dünne Reagenzgläser und beschickt dieselben in der Weise, dass man immer aus dem vorhergehenden 1 ccm der dort vorhandenen Mischung wieder mit 1 ccm steriler physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und zuverlässig umschüttelt, die aufeinander folgenden 7 Gläschen mit den Verdünnungen 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200 bis 1:51200. - Die drei letzten Gläschen werden behufs Kontrolle beschickt mit: 1 ccm Eiweiss-Lösung des Antigens ohne jede Beimischung; 1 ccm physiologische Kochsalzlösung mit 0,1 ccm Immunserum; 1 ccm Eiweiss-Lösung des Antigens in Verdünnung 1:1000 mit 0,1 ccm Normal-Kaninchenserum.

Das Normal-Kaninchenserum hat bei uns der sonst zu Versuchen nicht verwendete Zuchtbock zu liefern; es wird aus der Ohrvene in der oben beschriebenen Weise gewonnen und ist zu jedem Versuch immer neu herzustellen.

Hält man die oben für Füllung der Gläschen 1 - 7 angegebene Reihenfolge genau inne, so kann man die gleiche Pipette benutzen. Schulung im Abmessen von kleinen Flüssigkeitsmengen, wie sie z.B. bei der chemischen Massanalyse gelernt wird, ist zu gutem Erfolg erforderlich.

Die Gläschen bleiben offen, höchstens wird ein Stück reines Papier über sie gelegt. Die früher angewendete Verschlussung mit Wattepfropfen haben wir aufgegeben, weil dadurch leicht flöckchen in die Proben geraten, welche zu Täuschungen Veranlassung geben können.

Früher haben wir sogleich nach Zusammengabe der Flüssigkeiten dieselben stets sofort innig gemischt; wir warten samit jetzt etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde, um eventuell auftretende "Uhlenhuth'sche" Ringe zu beobachten (15).

Bei der Ausführung dieses Verfahrens, welches auf einer Niederschlags-Bildung an der Grenze der übereinander geschichteten Flüssigkeiten beruht, hat man vorichtig darauf zu achten, dass das Serum zu den Extrakten an den Wandungen der Reagenzgläser herabläuft und nicht direkt in die Flüssigkeit getropft wird. Da das Serum spezifisch schwerer ist, sinkt es nach unten. Liegt nun Eiweiss-Verwandtschaft vor, so tritt an der Berührungsstelle zwischen Serum und Extrakt ein deutlicher weisser Ring auf, der sich nach einiger Zeit in eine Wolke verwandelt. Das Eintreten dieses Phaenomens ist stets hoch willkommen, weil es in den meisten Fällen das sichere Gelingen der Immunisation ankündigt. Doch treten die "UHLENHUTH'schen Ringe" bei unsern Objekten, die im allgemeinen einen niedrigen Eiweiss-Gehalt haben, höchstens bis zu einer Verdünnung 1:1600 auf; meist kann man nur in den Verdünnungsgläschen 1:200 und 1:400 damit rechnen.

Nach einer halben Stunde werden alle Reagenzgläser (also auch die mit den UHLENHUTH'schen Ringen) gut durch Schütteln gemischt und in einen Brutschrank von 37 Grad konstanter Temperatur untergebracht. Nach 12 Stunden wird der Verlauf der Reaktion festgestellt. Nach dieser Zeit hat sich der Niederschlag, soweit er vorhanden ist, zu Boden gesetzt. Durch kurzes Aufschütteln wird er aufgerührt und muss sich dann (meist durch Schlieren-Bildung) unzweifelhaft von der im Übrigen klaren Flüssigkeit abheben.

Die letzte unzweifelhafte Bildung eines Niederschlags (nicht! einer Trübung) bezeichnet den Titer des Serums: 1:51200 heisst, dass in dem Gläschen mit Verdünnung 1:51200 des geprüften Eiweiss-Auszugs sich noch der Niederschlag gebildet hatte.

Dabei ist zur Wertung des ganzen Versuchs unerlässliche Vorbedingung, dass die Gläschen 8 - 10 vollkommen klar geblieben sind. Ist in einem derselben auch nur eine schwache Trübung entstanden (es braucht in diesem Fall kein Niederschlag

zu sein!), so hat der ganze Versuch keinen Wert und muss nach einem Tag etc. wiederholt werden. Nur dann können mit der Methode wirklich verlässliche Ergebnisse erzielt werden, wenn äusserste Skepsis herrscht.

Je nachdem ein Serum hohen oder geringen Titer erzielen soll (siehe oben, p. 185) wird die Immunisation nach ergebnisvoller Titerbestimmung abgebrochen oder fortgesetzt; sie ist durch immer neue Titerbestimmungen zu überwachen. Man kann sich nämlich nie darauf verlassen, dass ein einmal erreichter Titer nun konstant bleibt. Die Fälle, in denen trotz weitergehender Immunisation der Titer zurückging, sind uns nicht selten vorgekommen. Darauf sei ganz besonders hingewiesen!

#### VII. Gewinnung des Immunserums.

Hat die Probe-Blutabnahme einen genügenden Titer des Immunserums ergeben, so zögere man nicht, das Erreichte festzuhalten und das Serum zu gewinnen.

Angesichts der geringen Konstanz der Immunisation bzw. der Unsicherheit dieser Konstanz und weiter deswegen, weil bei Serum-Untersuchungen der Wert der einzelnen Reaktion wächst und ihre Beweiskraft zunimmt mit jeder parallelen Reaktion sei es zu den gleichen Formenkreisen, sei es zu Verwandten derselben, sei es zu ganz fernstehenden Gruppen (in letzterem Fall mit negativem Ausgang); endlich deswegen, weil strengstens miteinander vergleichbar hauptsächlich die von einem und demselben Immunserum gelieferten Ergebnisse sind, machen wir niemals die von Medizinern besonders zu theoretischen Zwecken vielfach geübten partiellen Blutabnahmen, sondern gewinnen das ganze erreichbare Serum stets auf einmal. Das Tier wird geschlachtet.

Dass die Tiere vor der Schlachtung 24 Stunden lang völlig ohne Nahrung bleiben müssen, wurde oben (p. 181) angegeben und begründet.

Die ältere Methode, welche wir neuerdings weniger benützen, bestand darin, das Tier durch die Karotis ausbluten zu lassen. Dazu wird das Kaninchen, auf dem Rücken liegend, auf ein Kaninchenbrett, wie solche in medizinischen Instituten allgemein im Gebrauch sind, derart festgebunden, dass der Kopf durch die besondere Vorrichtung des Brettes festgehalten wird. Das Tier ist unbeweglich fixiert.

Nun wird mittels einer Scheere der Hals von Haaren frei gemacht und mittels eines scharfen Messers die Oberhaut gespalten, dann nach beiden Seiten hin zurückgelegt und darauf mittels zweier Pinzetten die Halsmuskeln soweit beiseite präpariert, dass die Karotis, auf einer Seite des Kehlkopfs, frei gelegt wird. Sie ist, was dem Botaniker gesagt sei, durch das starke Pulsieren sowie durch einen ihr entlang verlaufenden weissen Nervenstrang unverkennbar bezeichnet, und wird nun mit nur stumpfen Pinzetten (jede Verletzung ist zu vermeiden!) frei präpariert. Ist dies geschehen, so wird sie nach der Kopfseite zu mit einem Faden abgebunden, nach der Körperseite zu in einer Entfernung von ca. 2 cm durch eine Klemme zugedrückt und dann zwischen diesen beiden Stellen mit der Scheere glatt durchschnitten. Ist die Klemme geöffnet, so fliesst das Blut in starkem Strahl aus und wird direkt in sterilen Zentrifugen-Gläschen, welche nicht über  $\frac{3}{4}$  gefüllt werden dürfen, aufgefangen. Das Tier wird vollständig ausbluten gelassen, doch geht auch dann noch ein Teil des Blutes, welcher in den innern Organen steckt, verloren. Deswegen sind wir zu der folgenden, von UHLENHUTH und WEIDANZ (16) angegebenen Schlachtmethode übergegangen:

Das Tier wird mit Chloroform tief narkotisiert, auf das Kaninchenbrett befestigt wie oben angegeben und darauf die Brust mittels einer Scheere möglichst von Haaren befreit. Dann wird mit einem scharfen Skalpell der Brustkorb freigelegt und darauf geöffnet. Dann schneidet man die Aorta direkt über dem Herzen durch und lässt das Tier in die Brusthöhle ausbluten. Mit steriler Pipette wird das Blut in die Zentrifugen-Gläschen gefüllt. - Diese Methode empfiehlt sich nicht nur wegen der reichlicheren Serum-Ausbeute, sondern auch deswegen, weil die Tiere bei ihr nicht leiden.

Die weitere Behandlung des Serums geschieht genau wie oben (p. 185) für die Probe-Blutabnahme angegeben wurde.

Von einem brauchbaren Serum muss folgendes gefordert werden: 1. es muss ab-

solud klar sein, darf auch keine Opaleszenz zeigen; 2. es darf kein Antigen mehr im Blut enthalten sein.

Über die Klarheit des Serums ist kein Wort zu verlieren; sie hängt allein von genügender Aus-Zentrifugierung und eventuell Filtration ab. Die Opaleszenz dagegen, welche in auffandem Licht zu prüfen ist, ist nicht vom Arbeiten abhängig, sondern in ihrer Entstehung noch unbekannt. Sie könnte wohl mit der Verdauung des Tiers zusammenhängen und um sie zu vermeiden muss dasselbe 24 Stunden vor dem Schlachten hungern - Opalisierende Sera sind durchaus unzuverlässig; sie geben unter Umständen (was sich aus ihrem eventuellen Gehalt an fremden, vielleicht durch Blut-Verdauung der Futterstoffe gebildeten Immunstoffen folgern lässt) ganz falsche Reaktionen und sind deshalb niemals zu verwenden. - Über Erfahrungen, welche wir mit den im Blut befindlichen Abbau-Stoffen der Nahrung bei der Immunisation von Tieren mit Hafer (der ihre Haupt-Nahrung bildete) gewonnen haben, wird später WORSECK berichten.

Auch wenn im Blut noch Antigen enthalten ist, sind die Sera unzuverlässig. Es können dann gleichfalls ganz unkontrollierbare Fällungen auftreten. Der Antigen-Gehalt ist nicht an dem Aussehen der Sera erkennbar, um ihn mit Sicherheit auszuschliessen wartet man mit dem Schlachten bis 8 Tage seit der letzten Immunisation verflossen sind. Dann kann man mit Sicherheit darauf rechnen, dass das in's Blut aufgenommene Antigen verarbeitet ist.

Zunächst völlig blanke Sera können sich nach einiger Zeit nachträglich trüben. Sie erleiden dadurch keine Einbusse in ihrer Wirkung, müssen aber, um bei den Ablesungen nicht zu Fehlern zu führen, vor der Verwendung filtriert werden.

Bei der zuerst von uns angewendeten Filtration durch BERKEFELD-Filter hat sich eine erhebliche Minderung des Titers in mehreren Fällen gezeigt. Es ist anzunehmen, dass dies von der Adsorption der wirksamen Eiweiss-Stoffe durch die grosse Oberfläche der Filtermasse bedingt wird. Deshalb sind wir zur alleinigen Verwendung von Asbest-Filtern übergegangen. Dieselben stellen zu einer Kugel aufgeblasene Röhren dar, die nach der unteren Röhre hin mit einer Glasträne abgeschlossen ist. Über der Glasträne wird die Asbest-Aufschwemmung gleichmässig verteilt, der Apparat dann an die Wasserstrahl-Luftpumpe angeschlossen und so filtriert.

Ist vorherige Sterilisation des Apparats vorgenommen worden, so gelingt eine völlig bakterienfreie Gewinnung des Serums. Doch hat die Sterilität desselben bei andern Versuchen, welche sofort an die Serum-Gewinnung anschliessen, keine so grosse bedeutung wie bei medizinischen Arbeiten.

Auf die Erscheinung des Gelatinierens der Sera hat zuerst GOHLKE (17) aufmerksam gemacht; sie ist uns auch später noch manchmal vorgekommen und, was auch GOHLKE betont, besonders bei dem zur Conglutination benötigten Rinder Serum relativ häufig. Derartiges gelatinierendes Serum erstarrt nach kurzer Zeit zu einer erst durchsichtigen dann undurchsichtig werdenden Gallerte, ohne doch seine Wirksamkeit zu verlieren. Seine Applikation ist allerdings, da es nicht mehr mit dem Antigen-Auszug gemischt werden kann, nicht anzuraten. Gelatinierendes Rinder Serum haben wir prinzipiell niemals, auch nicht nach dem Auspressen, verwendet, sondern stets durch flüssig bleibendes ersetzt. - Aus dem gelatinierenden Kaninchenserum, welches nur sehr selten vorkommt, kann man durch die Zentrifuge immer noch ein, wenn auch geringeres Quantum flüssigen Serums durch Auspressen gewinnen. Selten erstarrt in der Folge auch dieses noch und dann ist eben, wie in so vielen andern Einzelfällen bei der Sero-Diagnostik, der Versuch nicht verwendbar.

Mit Bakterien-Infektion der Sera haben wir keine Schwierigkeiten gehabt. Die allergrösste Menge wurde stets frisch nach der Gewinnung verarbeitet; soweit Sera aufgehoben wurden, hat sich die sofort zu beschreibende Konservierung mit Thymol stets bewährt.

#### VIII. Konservierung der Immunsera.

Ist es aus irgend einem Grund nicht möglich, die Verarbeitung der Sera ihrer Gewinnung sofort folgen zu lassen, so können sie ohne Bedenken und ohne dass eine Minderung des Titers auftritt, bis zu 4 Tagen im Eisschrank gehalten werden.

Trotz der bekannten bactericiden Wirkung des Serums sie noch länger ohne besondere Konservierung zu lassen haben wir stets vermieden, obgleich nach 3 - 4 Tagen kaum jemals eine Veränderung der Sera im Eisschrank weder nach ihrem Aussehen noch nach ihrer Wirkung zu beobachten war und es demnach eigentlich nicht einzusehen ist, weshalb sie sich nicht noch erheblich länger halten sollten. Viele medizinische Forscher berichten von guten Ergebnissen bei längerer Aufbewahrung im Eisschrank.

Bei dieser Aufbewahrung treten in den Ersten Tagen manchmal die oben (p. 189) angemerkt Trübungen ein; sie sind, wie bemerkt, durch Filtration zu beseitigen.

Sollte Serum längere Zeit konserviert werden, (eine Sammlung von Immunsera anzulegen ist der grosse Wunsch des hiesigen Instituts, doch blieb er bisher unausgeführt, weil niemals nennenswerte Serum-Mengen von den Untersuchungen übrig blieben und die Umstände der Zeit speziell für diesen Zweck vorzunehmende Immunisationen zunächst noch der Kosten wegen verbieten), so verfahren wir in der Weise, dass wir es mit 0,5% Thymol versetzen und steril in sterile Ampullen aus braunem Glas einschmelzen.

Die Eintrocknung der Sera auf Papier wurde von uns auch ausprobiert, ohne dass wir auf die Dauer damit zufrieden gewesen wären. Diese Methode hatte neben der Konservierung insbesondere auch die Frage der Dosierung zu lösen versucht. Sind die Titer bestimmt, so kann man bei mit Serum gleichmässig getränktem Papier nach der verschiedenen Grösse der abgeschnittenen Stückchen, die in physiologischer Kochsalz-Lösung ausgelaugt werden, genau die Serum-Mengen, welche bei verschiedenen Sera gleichem Titer entsprechen, zur Anwendung bringen. Aber so schön und einfach diese Lösung der schwierigen Dosierungs-Frage erschien, so schlecht hat sie sich in der Praxis bewährt, weil die Sera auf Papier eingetrocknet ihre Wirksamkeit allmählig und in verschiedenem Grade änderten. Auch beruhte die Anwendung dieses Dosierungs-Versuchs auf der wahrscheinlich irrigen Voraussetzung, dass mit steigender Immunisation nur eine Kumulation derselben spezifischen Stoffe stattfindet.

#### IX Die Präcipitations-Reaktion.

Die Präcipitation ist die zuerst aufgefundene und einfachste sero-diagnostische Methode. Sie wurde in ihren Grundzügen bereits oben (p. 187) bei der Schilderung der Titer-Bestimmung beschrieben. Sie beruht darauf, dass beim Zusammenbringen von Immunsorum und dazu gehörigem Antigen spezifische Niederschläge (Ausflockungen) entstehen. Es hat sich bekanntlich herausgestellt (UHLENHUTH, EHLENHUTH, WASSERMANN und STERN, WASSERMANN und SCHÜTZE), dass man auf diesem Weg die Spezifität von Vogeleiern, die Ungleichheit von Menschen- und Tierblut, die Gleichheit des Blutes des Menschen und der Primaten nachweisen kann. Auf zoologischem Gebiet hat NUTTALL (18) an 900 verschiedenen Blutsorten mit 30 verschiedenen Antiseris verwandtschaftliche Beziehungen in der Tierreihe mit Erfolg studiert. Beim Arbeiten mit pflanzlichen Eiweiss-Stoffen hatten zuerst MAGNUS und FREIDENTHAL (19) den ganz grossen Erfolg, die Eiweiss-Verwandtschaft von Tuberculis mit Saccharomyces festzustellen; es ist zu bedauern, dass diese Forscher nicht damals bereits mit phanerogamen Samen Versuche angestellt haben, denn wir würden dadurch bereits erheblich früher die Aufklärung über das natürliche System dieser so sehr im Argen gelegenen Abteilung erhalten haben.

Beim Arbeiten mit den Samenextrakten der Phanerogamen ist es in meinem Institut gelungen, den Stammbaum der höheren Pflanzen von den Lycobiales bis zu den Compositae herauf zunächst in grossen Umrissen, dann auch wenigstens teilweise schon in genaueren Einzelheiten festzustellen. Wenn auch grosse Kreise der Systematiker "von den Serum-Reaktionen nichts halten", so sollten sie doch wenigstens, wenn sie auch nicht selbst nach der Methode arbeiten wollen, sich die Sache bei uns ansehen. Wir wollen gerne ein Tier immunisieren und dann könnte einer der Herren und unbekannte Samenpulver bringen; aberer müsste bei den Reaktionen dabei sein, denn eine solche Probe würde nicht zu unserer Prüfung (das müssten wir ablehnen), sondern zu seiner Belehrung stattfinden.

Das Arbeiten mit dem Untersucher unbekanntem, nur mit Nummern bezeichneten Pulvern ist uns geläufig. Bereits GOHLKE (20) hat gegen SAULI darauf aufmerksam gemacht, dass bei den Ablesungen eine gewisse subjektive Beeinflussung leicht möglich ist, wenn man ungefähr weiss, ob eine Reaktion zu erwarten ist oder nicht. Um alle derartigen Auto-Suggestionen auszuschalten, arbeiten wir in neuerer Zeit prinzipiell nur noch blind, d.h. mit dem Untersucher unbekanntem Pulvern. Erst wenn alle Ablesungen fertig sind, wird nachgesehen, welche Namen den Buchungen entsprechen.

Die Durchführung der Präcipitations-Reaktionen wurde oben (p. 187, 188) beschrieben. In gleicher Weise wie dort ist zunächst noch keine innige Mischung der Flüssigkeiten, sondern eine vorsichtige Überschichtung anzustreben, um wenn möglich die UHLENHUTH'schen Ringe zu beobachten. Nach  $\frac{1}{2}$ -stündigem Verweilen im Thermostaten wird darauf hin untersucht und dann erst die innige Vermengung der Flüssigkeiten durch Umschütteln vorgenommen. Dann findet die zweite und definitive Ablesung nach  $1\frac{1}{2}$  weiteren Stunden statt.

Besonders darauf hingewiesen sei, dass es bei Verwendung von 0,1% Natronlauge-Extrakten zur Anstellung der Reaktionen absolut notwendig ist, vorher eine genaue Neutralisation mit Essigsäure vorzunehmen. Es hat sich bei Verwendung solcher Extrakte gezeigt, dass entsetzende Niederschläge wieder aufgelöst wurden; auch kamen Fälle vor, in denen in den ersten Gläschen, welche doch die stärksten Niederschläge zeigen müssten, diese gar nicht auftraten, während sie sich in den folgenden normal zeigten. Die Erklärung ist, dass mit immer stärkerer Verdünnung auch die Alkaleszenz immer schwächer wurde und damit ihre für die Reaktionen schädliche Wirkung allmählig aufhörte.

Über die Wertung der Ergebnisse wird unten zu handeln sein; hier sei nur gesagt, dass wir sehr starke Fällung mit xxx, mittelstarke mit xx, schwache aber unzweifelhafte mit x bezeichnen. Treten Trübungen auf, so werden diese als Tr notiert; - bedeutet Reaktionslosigkeit. Diese Zeichen werden nach subjektivem Empfinden gesetzt. Ist die Praecipitation "dick wie Erbsuppe", so kann man auch bis zu xxxx gehen; das alles hat aber nur, wie gezeigt werden wird, geringere Bedeutung, wenn nur überhaupt unzweifelhafte Reaktion vorhanden ist. Bei der Wertung der Ergebnisse wirken so viele verschiedene Faktoren zusammen, dass es auf kleinere Inkongruenzen, wie sie bei demselben Beobachter zu verschiedenen Zeiten, bei verschiedenen Beobachtern gleichzeitig vorkommen, und bei der Subjektivität der Abschätzungen unvermeidlich sind, weniger ankommt. Immerhin wird man, da bei jedem Versuch zugleich auch derjenige mit dem Antigen wiederholt werden muss, an der Stärke dieses Ausfalls einen Masstab für die Abschätzung der anderen haben.

Um Verwandtschafts-Reaktionen durchzuführen ist einige Tage, bevor man das Immantier schlachten will, besser noch vorher, die ganze Menge der Samenpulver, welche geprüft werden sollen, bereit zu stellen, eventuell herzustellen. Die Aufbewahrung der Samen in bereits fertiger Pulverform ist besonders dann wichtig, wenn ein Tier krank wird, sodass man, auch ohne seine völlige Fertigstellung abwarten zu können, zur Notschlachtung schreiten muss.

Am Tage der Schlachtung werden in sterilisierten Erlennmeyer-Kölbchen, die mit Wattestopfen verschlossen sind, die Eiweiss-Auszüge, wie oben (p. 183) beschrieben wurde, fertiggestellt. Durch bei der Extraktion erfolgende Variation der zu extrahierenden Menge des Samenpulvers je nach seinem Gehalt an löslichem Eiweiss stellt man alle Auszüge ungefähr auf gleichen Eiweiss-Gehalt. Am folgenden oder nächstfolgenden Tag werden (nach vorheriger Kontrolle, ob die Eiweiss-Auszüge auch alle klar sind; getrübe sind von neuem zu filtrieren) die Reaktionen gemacht wie oben, bei Beschreibung der Tierrstellung angegeben wurde und die Ablesungen durchgeführt.

#### X. Die Conglutinations-Reaktionen.

Die Conglutination soll nach den Medizinern, denen wir diese wie die anderen serologischen Methoden verdanken, ausgearbeiteten Theorien von der Präcipitation prinzipiell verschieden sein; sie liefert aber die gleichen Ergebnisse und wird

sich wahrscheinlich nur als methodologische Variation herausstellen. Sie hat vor der Präcipitation den sehr grossen Vorteil, dass sie viel weniger Immunsérum verbraucht und dass ihre Ergebnisse häufig (aber keineswegs immer!) deutlicher sind. Andererseits müssen wir bei der Conglutination auf so überzeugende Erscheinungen, wie sie die UHLENHUTH'schen Ringe sind, verzichten. - Die Sparsamkeit im Verbrauch von Immunsérum liess uns von Anfang an die Conglutination bei allen Untersuchungen bevorzugen; sie wird bei uns, wenn dies irgend möglich ist, durch gleichzeitige Anwendung der Präcipitation verifiziert. Ist aber das Immunsérum knapp, so wird die Conglutination allein ausgeführt. Wir haben keinen Grund, von diesem Vorgehen in Zukunft abzuweichen.

Zu den oben als für die Präcipitation notwendig bezeichneten Dingen tritt bei den Conglutination noch das Rindersérum hinzu. Da die Zentrifuge an dem zur Präcipitation bestimmten Tag für diese in Tätigkeit ist, pflegen wir die Conglutination am nächstfolgenden durchzuführen. Es werden dafür die gleichen Eiweiss-Extrakte verwendet, die schon für die Präcipitationen hergestellt waren.

Das Rinderblut wird morgens früh vom Schlachthof von einem eben geschlachteten Tier geholt und das Rindersérum genau ebenso, wie oben für das Kaninchensérum beschrieben wurde, gewonnen. Alle an dieses dort gestellte Anforderungen gelten auch für das Rindersérum.

Behufs Reaktion werden darauf 5 Reagenzgläser wie folgt beschickt:

1.	Glas	mit	1	ccm	Samen-Extrakt	plus	0,08	ccm	Immunsérum
2	"	"	1	"	"	"	0,02	"	"
3	"	"	1	"	"	"	0,01	"	"
4	"	"	1	"	"	"	0,005	"	"
5	"	"	1	"	"	"	0,000	"	"

Nach gutem Durchschütteln der Flüssigkeiten kommen dieselben darauf in den Thermostaten und werden 2 Stunden bei 37 Grad gehalten. Dadurch findet die "Sensibilisation" der Mischung statt. Ob es sich dabei um eine fermentartige, durch das Immunsérum bewirkte Umwandlung der Eiweiss-Körper des Extrakts, um eine Immunkörperbildung in vitro handelt, ist nicht bekannt, könnte aber wohl der Fall sein. Die an sich bei der Zusammengabe von Immunsérum und Antigen zu erwartende Präcipitation tritt nicht ein, weil bei der sehr geringen Menge des beigegebenen Immunsérum dazu nicht Zeit ist (sie wird, wie oben angegeben, von uns erst nach 12 Stunden registriert und die rasch erscheinenden UHLENHUTH'schen Ringe treten nur bei stärksten Eiweiss-Konzentrationen auf).

Nach 2 Stunden wird jedem der aus dem Brutschrank genommenen Gläschen 0,4 ccm des Rindersérum zugefügt, innig durch Umschütteln gemischt und dann wieder in den Brutschrank gestellt.

Die Reaktionen treten nun sehr bald ein; soe werden nach 20, 40, 60, 90 und 120 und 150 minuten kontrolliert und in derselben Weise, wie oben für die Präcipitation angeführt, angemerkt.

Das Gläschen 5 darf keine Veränderung zeigen; es stellt den Kontroll-Versuch dar. Bei auch nur schwacher Trübung in Gläschen 5 sind die Versuche 1 - 4 als nicht beweiskräftig zu verwerfen.

Sowohl bei der Conglutination wie bei der Präcipitation sind nachträgliche Veränderungen der Flüssigkeiten, also z.B. nach den angegebenen Zeiten eintretende Ausflockungen, nicht zu werten. Man halte sich, um zu brauchbaren Ergebnissen zu gelangen, genau an die angegebenen Zeiten. Die ganzen Serum-Methoden sind, wie oben gesagt, blutige Empirie und nur unter den angegebenen, genau inne zu halten den Umständen gewonnene Resultate haben sich bisher als brauchbar erwiesen.

#### XI. Die vorläufige Wertung der Ergebnisse.

Wurde die Summe eines ganzen Versuchs mit dem gewonnenen Immunsérum in der geschilderten Weise durchgeführt, so kommt man zu Tabellen, wie ich sie z.B. der Arbeit von PREUSS (21) auszugsweise entnehme und auf Seite 193 wiedergebe.

Bei diesen Tabellen wird zunächst jeder Versuch, welcher nur Trübung zeigt,

ausser acht gelassen Trübungen können zwar, da natürlich jede Fällung mit einer Trübung beginnt die Anfänge von Fällungen sein. So wurde (22) mit niederem Titer von Juglans regiaaus mit den niederen Centrospermen-Familien starke Trübungen erhalten, die sich bei hohem Serum-Titer zu unzweifelhaften Niederschlägen verdichteten. Aber in anderen Fällen, und diese stellen die Mehrzahl dar, haben Trübungen keine Verwandtschafts-anzeigende Bedeutung gehabt, sondern zeigten nur unkontrollierbare Unregelmässigkeiten an

Immunsrum von Reseda grandiflora, Präcipitation

Extrakt von	0,1 ccm I. S. plus Extrakt					0,1 ccm N S plus Extrakt			R E	Eiweiss nach Esbach	
	1: 200	1: 400	1: 800	1: 1600	1: 3200	1: 6400	1: 200	1: 400			1: 800
Reseda grandiflora	xxxx	xx	xx	x	x	x	-	-	-	-	xx
Cleome Candelabrum	x	x	x	x	-	-	-	-	-	-	xx
Cheiranthus Cheiri	xx	x	x	x	-	-	-	-	-	-	xx
Akebia quinata	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	xx

Immunsrum von Reseda grandiflora, Conglutination

Nr	Extrakt von	E ccm	I.S. ccm	N.S. ccm	2 Stunden im Brutschrank	R S ccm	Ausflockung nach						Eiweiss nach Esbach
							20'	40'	60'	90'	120'	150'	
1	Reseda grandiflora	1,0	0,08	-		0,4 Tbg	x	xx	xxx	xxx	xxx	xx	
		1,0	0,02	-		0,4 Tbg	x	x	xx	xx	xx		
		1,0	0,01	-		0,4 Tbg	Tbg	Tbg	x	x	x		
		1,0	0,005	-		0,4 Tbg	Tbg	Tbg	Tbg	x	x		
		1,0	-	-		0,4	-	-	-	-	-		
		1,0	-	0,08		0,4	-	-	-	-	-		
2	Cleome Candelabrum	1,0	0,08	-		0,4 Tbg	x	x	xx	xx	xx	xx	
		1,0	0,02	-		0,4	-	Tbg	x	x	x		
		1,0	0,01	-		0,4	-	-	Tbg	Tbg	Tbg		
		1,0	0,005	-		0,4	-	-	-	-	Tbg		
		1,0	-	-		0,4	-	-	-	-	-		
		1,0	-	0,08		0,4	-	-	-	-	-		
3	Cheiranthus Cheiri	1,0	0,08	-		0,4 Tbg	x	xx	xx	xx	xx	xx	
		1,0	0,02	-		0,4 Tbg	Tbg	x	x	x	x		
		1,0	0,01	-		0,4	-	Tbg	Tbg	Tbg	Tbg		
		1,0	0,005	-		0,4	-	-	Tbg	Tbg	Tbg		
		1,0	-	-		0,4	-	-	-	-	-		
		1,0	-	0,08		0,4	-	-	-	-	-		
4	Akebia quinata	1,0	0,08	-		0,4	-	-	-	Tbg	Tbg	xx	
		1,0	0,02	-		0,4	-	-	-	-	-		
		1,0	0,01	-		0,4	-	-	-	-	-		
		1,0	0,005	-		0,4	-	-	-	-	-		
		1,0	-	-		0,4	-	-	-	-	-		
		1,0	-	0,08		0,4	-	-	-	-	-		

Ferner werden alle Versuche, bei denen die Kontrolle sich nicht vollkommen unverändert gehalten hatte, vernachlässigt. Auch hier muss man durchaus rigoros sein. Nur spiegelblau bleibende Kontrollen können gelten; selbst leichte Opaleszenz derselben macht den betr. Versuch suspekt und deshalb unbenützlich.

Endlich haben diejenigen Versuche ausser acht zu bleiben, bei denen die Eiweiss-Prüfung nach ESBACH kein Eiweiss im Extrakt gezeigt hatte.

Der (allermeist übergrosse) Rest der Einzelversuche wird, wenn Conglutination und Präcipitation gleiche Ergebnisse geliefert haben, zur weiteren Verwertung gezogen; sind aber erhebliche Differenzen zwischen den Resultaten dieser beiden Methoden vorhanden, so müssen die Versuche mit dem gleichen Immuserum wiederholt werden. Bleibt die Differenz bestehen, so ist zu unterscheiden:

Fundamentale Fehler zwischen den Ergebnissen der beiden Methoden sind so ausserordentlich selten, dass sie unbedenklich auf Versuchs-Fehler zurückgeführt werden können. Wenn die Conglutination keine, die Präcipitation deutliches Ergebnis liefert, oder umgekehrt, so bleiben die betr. Versuche ausser Wertung. Ist dagegen der Unterschied unbedeutend, d.h. tritt zwar unzweifelhafte Fällung in beiden Versuchsreihen ein, unterscheidet sie sich aber nur durch die Intensität, so werden die betr. Versuche unter besonderer Vorsicht verwertet. Die Sero-Diagnostik ist nicht in ihren Ergebnissen auf den Ausfall einzelner Reaktionen eingestellt, sondern ihre Resultate werden durch parallele Versuche immer wieder hundertfältig verifiziert und kontrolliert, sodass, wenn solche kleine Abweichungen bei einer Methode, von deren Theorie wir absolut nichts wissen und deren Mechanismus wir blind gegenüber stehen, vorhanden sind, wir durch vielfältige andere Versuche von verwandten Ausgangspunkten aus im Verlauf der Gesamt-Untersuchung die notwendige Kritik anzuwenden mit Sicherheit lernen.

## XII. Die definitive Auswertung der Versuche.

Das Ergebnis aller von einem Immunisations-Ausgangspunkt her mit Erfolg gemachter Versuche muss sich in ein Diagramm zusammenstellen lassen, welches, mit den Diagrammen aller andern Ausgangspunkte kombiniert, zur Konstruktion eines Stammbaums führt. Diesen so gewonnenen Stammbaum sehen wir als den phylogenetischen Stammbaum des natürlichen Systems an, weil er reale Verwandtschaften, nämlich physiologisch-chemische Eiweiss-Verwandtschaften anzeigt und von aller durch Convergenz erworbenen Verdunkelung, wie sie die Konstruktion eines Stammbaums nach morphologischen Merkmalen so schrierig macht, frei ist.

Die morphologischen Veränderungen, welche im Lauf der Differenzierung der organischen Reiche eingetreten sind und von gemeinsamen Ausgangspunkt her zur Bildung veränderter äusserer Gestaltungen geführt haben, sind doch wohl, da die Morphe durch die Eigenschaften der lebendigen Substanz, also durch den Chemismus des Eiweisses bedingt wird, nichts anderes als die Manifestationen von Eiweiss-Veränderungen. Nicht das Auftreten einer 4-zähligen Blüte in einem sonst 5-zähligen Formenkreis oder eines zerschlitzten Blattes in einem sonst mit ungeteilten Blättern versehenen Formenkreis ist die Variation, sondern die Veränderung der Eiweisskörper, welche diese Bildungs-Abweichungen bedingt. Das wird von der "morphologischen" Systematik ziemlich allgemein übersehen.

Nun fragt sich, und diese Frage ist von fundamentaler Bedeutung für die Wertung unserer Versuche und Methode, ob im Chemismus der Eiweiss-Substanzen an irgend einer Stelle bereits Convergenz beobachtet wurde. Dies würde z.B. anzunehmen sein, wenn bei der Combination der Ergebnisse tadelloser Reaktionen sich Stammbäume ergeben würden, welche von getrennter Basis her nach oben zusammenliefen. Auch würde auf Eiweiss-Convergenz zurückzuführen sein, wenn im Eiweiss-Stammbaum sehr weit auseinander liegende Formen miteinander Reaktion geben würden. Ich habe oben ausgesprochen, dass mit dem ersten Nachweis einer solchen Unstimmigkeit, die nicht auf methodologische oder Versuchsfehler zurückgeführt werden könnte, das ganze Gebäude des Eiweiss-Stammbaums in's Wanken kommen müsste. Wir haben unsere grosse Zuversicht dadurch gewonnen, dass bei nun hunderttausenden von Versuchen noch nicht das kleinste Anzeichen von Eiweiss-Convergenz

beobachtet würde

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen haben gelehrt, dass die unter Umständen sehr auffälligen morphologischen Ausgestaltungen parallel gehende Eiweiss-Differenzen sehr geringfügig sein können. Wir sind uns ja dessen bewusst, dass wir bei unsern Versuchen nicht das formbestimmende lebende Eiweiss, die lebendige Substanz, differenzieren, sondern nur tote, vielleicht ganz nebensächliche, sich aber mit der lebenden Substanz ändernde Verbindungen relativ sehr wenig komplizierter Zusammensetzung

Für eine sprunghafte Variation der Eiweiss-Körper, soweit man diesen Ausdruck gebrauchen darf, haben wir nur ganz wenige und zugleich noch nicht genügend sicher gestellte Anzeichen. Ich möchte dahin rechnen die relativ sehr schwachen Reaktionen der Papaveraceae zu den Capparidaceae und Cruciferae und die ebenfals relativ schwachen Reaktionen der Primulales mit denjenigen Centrospermen-Familien, welche den Anschluss bieten. Allerdings ist besonders dieser letzte Fall noch durch Gewinnung eines Immunserums von den Plumbaginaceae noch besonders zu klären. - Man glaube nicht, dass diese schwachen Reaktionen als Beweis angeführt werden könnten gegen die Brauchbarkeit der Methode an sich, denn weder die Papaveraceae noch die Primulales geben sonst mit irgend welchen anderen Formenkreisen überhaupt auch nur die geringste Reaktion. - Wenn die Geringfügigkeit dieser Reaktionen sich auf die Dauer bestätigen und nicht als besondere Versuchs-Varianten herausstellen sollten, so würden sie bedeuten, dass sich der Eiweiss-Chemismus zwischen den hohen Ranales über die Resedaceae bis zu den Capparidaceae nur relativ wenig, zwischen diesen und den Papaveraceae dagegen (wie oben bezeichnet sprunghaft) reheblicher verändert hätte. Dass diese allerdings wenigen Fälle, in welchen wir zu solchen Vermutungen (als Erkenntnis können wir sie noch nicht bezeichnen) gelangt sind, relative Endglieder der heutigen Entwicklung darstellen, sei nebenbei erwähnt. - In anderen Fällen, wo relative Endglieder vorliegen (z.B. die Compositae als Ende der Campanulaten-Reihe) ist dagegen nur ganz minimale Eiweiss-Differenz gegenüber den unterstehenden Formen vorhanden

Im übrigen ist bereits seitdem die Differenzierbarkeit der pflanzlichen Eiweiss-Arten durch die Sero-Diagnostik bekannt geworden ist, von allen Autoren betont worden, dass sich pflanzliches Eiweiss schwerer differenzieren lässt als tierisches (23). Diese Erfahrung ist der wesentliche Grund für die Erfolge, die wir bezüglich der Feststellung weiter Verwandtschaftskreise erzielen konnten. Denn dies "schwer differenzierbar" heisst nichts anderes, als dass in sehr weitem Umfang grosse Eiweiss-Gleichheit besteht; dass demnach die Reaktionen überaus weit reichen. Bedenkt man die recht kurze Differenzierungszeit unserer höheren Pflanzen (seit der Kreideperiode, also in den neuesten, zeitlich nur kurz zurückliegenden Epochen scheint die ganze Verzweigung des Phanerogamen-Stammbaums vor sich gegangen zu sein), so wird dies nicht als unverständlich erscheinen

Um nun die gewonnenen, tadellosen Ergebnisse definitiv auszuwerten, sei an einige von mir (24) bereits früher formulierte Sätze erinnert. Ich habe früher die Serum-Reaktionen mit der drahtlosen Telegraphie verglichen: von einem Zentralpunkt aus (dem mit einer beliebigen Spezies gewonnenen Immunserum) sprechen wenn alles in Ordnung ist und alle Fehlerquellen ausgeschaltet sind, sämtliche innerhalb der Reichweite liegende Spezies an. Wird nun von einer Spezies aus eine andere, fernliegende, durch die Reaktion erreicht, so muss gefordert werden, dass beim Ausgang von dieser letzteren (also wenn nun sie zum Immunisationszentrum gemacht wird) auch die erstere wieder erreichbar ist. Wir fordern die "Reciprocität" der Reaktionen. Nur solche Ergebnisse der Sero-Diagnostik sind als gesichert anzusehen, die reciprok von beiden Seiten her durch Präcipitation und durch Conglutination gewonnen sind.

Diese Reciprocität der Reaktionen würde bisher überall tadellos gefunden, wo mit gleichwertigen Seren von beiden Seiten her gearbeitet wurde. Ist aber das eine Serum hochwertig, während das andere einen niederen Titer zeigt, so wird, wie in der drahtlosen Telegraphie, die mächtigere Station weiter reichen als die schwächere. Das Serum von hohem Titer wird noch Antigen-Gleichheit nach-

weisen lassen, wo das schwache bei reciproker Anwendung nicht mehr zurückreicht. Beispiele für dies Verhalten wurden oben (p. 185) angeführt.

Es kann nicht entgehen, dass mit dieser Forderung der reciproken Reaktionen schon eine ganz erhebliche Kontrolle der Untersuchung und Bestätigung ihrer Ergebnisse gegeben wird. Aber damit ist die relativ sehr grosse Sicherheit, die den sero-diagnostischen Befunden innewohnt, noch nicht erschöpft. Nicht nur die entferntesten Formenkreise, sondern selbstverständlicher Weise noch viel intensiver die näher stehenden geben gegenseitige Reaktionen und jede reciproke Gegenreaktion bestätigt alle vorher gewonnenen positiven Ergebnisse. Um ein Beispiel anzuführen: Zwischen den Ranunculaceae und Magnoliaceae liegen, resp. wurden von beiden aus durch Reaktionen erreicht, die Familien der Berberidaceae, Lardizabalaceae, Menispermaceae, Calycanthaceae, Naonaceae, Nymphaeaceae. Ist diese ungefähre Positions-Bestimmung richtig, so muss jede dieser Familien wieder mit den Ranunculaceae und Magnoliaceae als den Endgliedern der Reihe reagieren. Dies ist tatsächlich der Fall und das Eintreten dieser Reaktionen von den Zwischengliedern aus bestätigt offenbar die Reaktionen der Endglieder untereinander. Man sieht, dass jede einwandfreie Reaktion nicht für sich allein steht, sondern eventuell hunderte von anderen, Positive wie negative, bestätigt. So trägt ein Glied der Untersuchung das andere und macht das Ergebnis derart zuverlässig, dass wir nach unserer vielfältigen Kenntnis der Untersuchungs-Methode diese jeder anderen zur Systembildung bisher verwendeten Methode für erheblich überlegen halten.

Aber noch weitere Schlüsse können aus den Amplitüden der jeweils von einer Familie aus erreichbaren Reaktionen gezogen werden. Geben, wie dies tatsächlich der Fall ist, die Magnoliaceae mit den Ranunculaceae reciproke Reaktionen; geben die Magnoliaceae gleichfalls mit den Pinaceae solche, reagieren dagegen, wie dies der Wirklichkeit entspricht (25) diese nicht mit den Ranunculaceae, so ist zu folgern, dass die Magnoliaceae phylogenetisch zwischen den Pinaceae und den Ranunculaceae stehen.

Je tiefere Stellung ein Formenkreis im natürlichen System einnimmt, umso weiter reichen seine Reaktionen nach unten, umso weniger weit nach oben. Kennen wir sämtliche Reaktionen aller Familien (und die vieler sind uns bereits bekannt), so ist uns damit unmittelbar das System ihrer Eiweiss-Verwandtschaft, welches wir (siehe oben) für das natürliche, phylogenetische System halten, bekannt. Die Selaginellaceae (Lycopodiales ligulatae) reichen in ihren Reaktionen bis zu den Pinaceae; diese bis zu den Magnoliaceae; diese bis zu den Ranunculaceae über die Berberidaceae hinweg; die Berberidaceae über die Ranunculaceae hinweg bis zu den Rosaceae; die Ranunculaceae bis zu den Leguminosae etc. Ein Stammbaum wird dadurch gegeben, der in Vielem dem bisher für richtig anerkannten gleicht, in anderen Punkten ihn ergänzt, in wenigen aber sehr wichtigen ihn abändert. Um nur ein Beispiel anzuführen: der durch die Sero-Diagnostik gefundene Stammbaum des Columniferen-Astes gleicht absolut dem von WETTSTEIN nach morphologischen Kriterien aufgestellten, wenn man letzteren umkehrt, d-h. WETTSTEIN's Ausgangspunkt als Endpunkt annimmt. Das ist eine durch die Serologie neu gefundene Anschauung, die selbstverständlicher Weise erhebliche Bedeutung besitzt; aber die Einzelheiten des aufgestellten systematischen Bildes, die Verwandtschaften als solche, bleiben bei beiden Systembildungen sich gleich. Der Vater ist dem Sohn ebenso nahe verwandt wie der Sohn dem Vater, nur in der Zeitfolge der Entstehung liegt der Unterschied.

Aus meinen Darlegungen über die sich bei weiter ausgedehnten Untersuchungen ganz von selbst hundertfältig ergebenden Bestätigungen und Ergänzungen der Einzel-Versuche wird verständlich, weswegen wir der scheinbar so wichtigen Frage der Beurteilung, ob beim Eintreten der Serum-Reaktionen eine scharfe Scheidung von naher oder fernerer Verwandtschaft anzeigender starker oder schwächerer Ausflockung stattzufinden habe, keine sehr grosse Bedeutung beimessen. Jede Reaktion ist, wenn sie nicht durch Mengen gleichlautender Gegen- und Parallel-Reaktionen bestätigt wird, für unsere systematischen Zwecke als suspekt auszuschalten. Liegen aber die vielen Bestätigungen von anderen Ausgangspunkten her vor, so ergibt

sich aus dem Vergleich ohne weiteres, dass, um das vorhin gebrauchte Beispiel beizubehalten, das Eiweiss der Ranunculaceae dem der Rosaceae näher steht als dem der Magnoliaceae; mit anderen Worten, dass die Ranunculaceae den ersteren näher verwandt sind als den letzteren. Die Ergebnisse der Vergleichung der Ausflockungs-Intensitäten können stets nur approximativ sein. Auch kann niemand beweisen, dass, wie die Taxation der Eiweiss-Mengen nach dem Ausfall der ESBACH'schen Reaktion, so auch die Ausflockungen bei den Immunitäts-Reaktionen wirklich eine irgend genauere Titerstellung der wirksamen Stoffe ist. Es ist im Gegenteil anzunehmen, dass in völlig unkontrollierbarer Weise bei diesen Reaktionen auch inaktive, mit der Immunität gar nichts zutun habende Eiweiss-Körper mitgefällt werden, welche ohne die Verwandtschafts-anzeigenden Niederschläge in der Lösung geblieben wären.

In diesen Anschauungen, dass bei den Fällungen der Serum-Reaktionen ausser den aktiven Eiweiss-Stoffen (Immunstoffen und Antigenen) auch noch inaktive Eiweisstoffe mit zu Boden gerissen werden, wurde ich neuerdings besonders durch das Verhalten des Cucurbitaceen-Serums in seinen Reaktionen zu den verwandten Familien und durch die reciproken Reaktionen von diesen zu den Cucurbitaceen bestärkt. Es hat sich hier gezeigt, dass die Reaktionen von den Cucurbitaceen zu den anderen Familien hin, auch abgesehen von den verschiedenen Titern, ja selbst (Gentianaceae) bei gleichem Titer erheblich viel stärker ausfielen, als die reciproken Reaktionen. Schon früher war uns aufgefallen, dass bei Eiweiss-reichen Antigen-Lösungen die Fällungen besonders stark waren. Wir haben dies früher auf grosse Massen aktiven Eiweisses in diesen Lösungen geschoben. Bei den Cucurbitaceae im Verhältnis zu den anderen Familien trifft aber nur ein allgemeiner Eiweiss-Reichtum zu: Das Cucurbitaceen-Extrakt (*Cucurbita maxima*) war eines der eiweissreichsten, das wie überhaupt erhalten haben. Aber im Vergleich mit den reciproken Reaktionen dürfte, wenn nur die aktiven Eiweiss-Stoffe fallen, der Unterschied in den Reaktionsstärken nicht entfernt so gross sein, wie wir ihn hier konstant beobachtet haben. Bei der Aufstellung des Stammbaums der Sympetalen, welcher auf die Cucurbitaceen als Ausgangspunkt zuläuft, und sich in der Anordnung der Lage der einzelnen Familien besonders auf die relative Entfernung derselben von den Cucurbitaceen begründen musste, hat sich die Annahme als notwendig herausgestellt, dass die Fällungs-Intensität der verwandtschaftlichen Beziehung der Familien, ihrer Entfernung voneinander, nicht immer genau proportional ist. Es kann dies nur so erklärt werden, dass eben bei den Fällungen auch serologisch inaktive Eiweisskörper zubo- den gerissen werden. Erwägt man die ungeheure Grösse der in Betracht kommenden Eiweiss-Micellen (die sich ja auch in der oben angedeuteten starken Adsorptionsfähigkeit ausspricht), so wird man solche kombinierten Fällungen nicht für unwahrscheinlich halten können. - Fehlt die Fällung, so ist die Verwandtschafts-Reaktion eben negativ; tritt sie ein, so wird die Nähe der dadurch bewiesenen Verwandtschaft mehr durch die Gegen- und Parallel-Reaktionen als durch die Intensität der einzelnen Fällungen bestimmt.

Würden nur die Antigene mit den Immunkörpern gefällt, so müsste klarer Weise der Intensitäts-Ausfall jeder Reaktion, wenn er nur genügend ablesbar ist, direkt das Mass des jeweiligen Verwandtschafts-Grades bei jedem Versuch abgeben. Wirklich ist es Regel, dass der Intensitäts-Unterschied in der angegebenen Weise statthat, nur innerhalb ziemlich weiter Grenzen. Wir achten deshalb, wie oben geschildert wurde, nach Möglichkeit auf die sich ergebenden Niederschlags-Mengen, legen denselben aber, weil wir bessere Möglichkeiten der Wertung haben, nicht so über-grosse Bedeutung bei, wie dies z-B NUTTALL bei seinen oben zitierten Untersuchungen über (in vielen Beziehungen günstigere) zoologische Objekte tut.

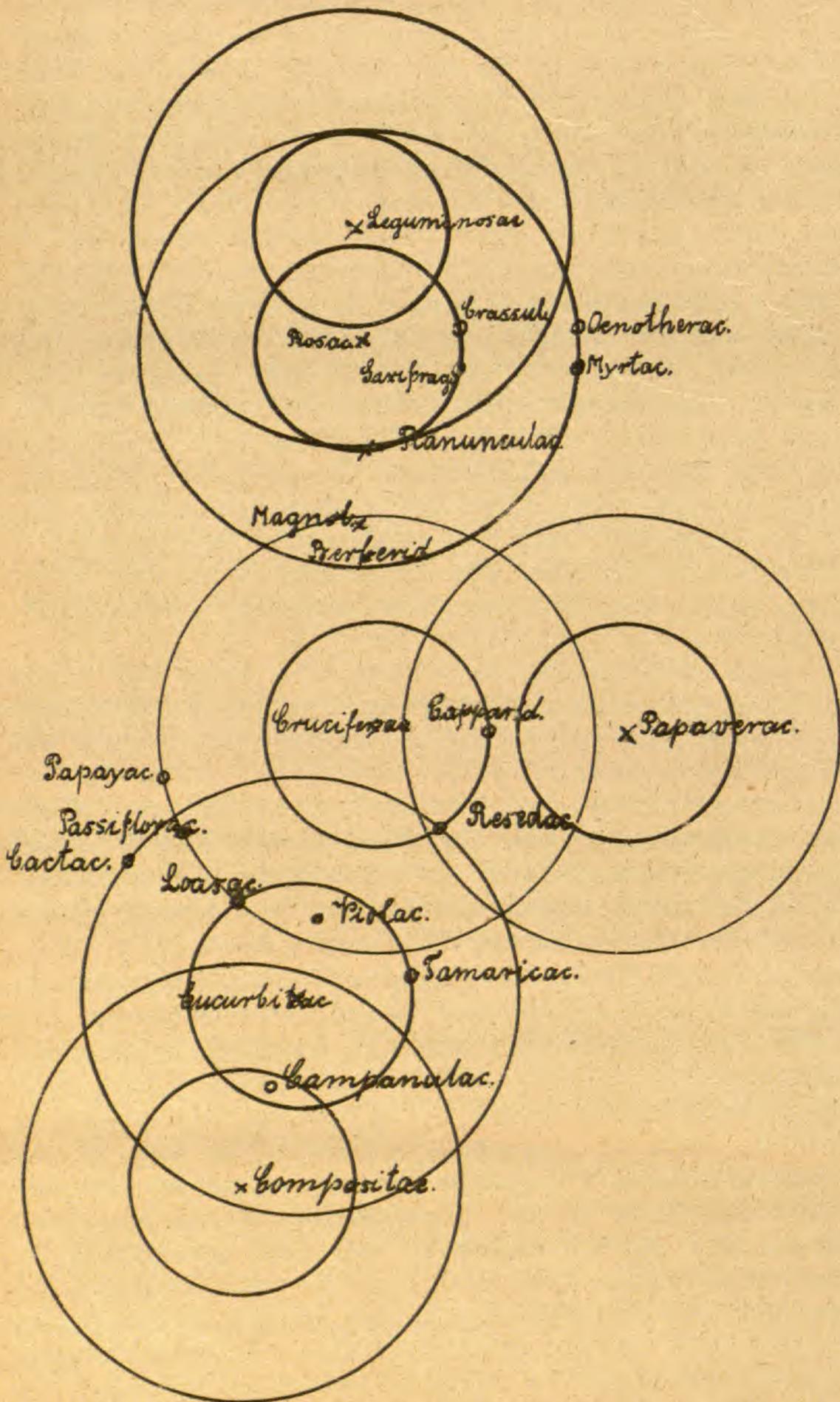
Liegen nun von zwei oder mehreren Familien die zweckmässiger Weise immerhin provisorisch in nähere und fernere eingeteilten Ausflockungs-Reaktionen vor, so sind diese zunächst leicht in der Weise in diagrammatische Form zu bringen, dass man auf einer dem Zentrum näher liegenden Kreislinie die starken, auf einer entfernter gelegenen die schwächeren Reaktionen einträgt. Eine oder mehrere je zwei Familien gemeinsame Reaktionen bestimmen dann die Lage der Einzeldiagramme zueinander und bilden die notwendige Verknüpfung. Die meiner früheren Abhandlung (26)

entnommene und nur wenig geänderte Figur, welche hier eingerückt ist, zeigt eine der für die Familien der Leguminosae, Rosaceae, Cruciferae, Papaveraceae, Cucurbitaceae und Compositae möglichen Lagen solcher Diagramme in gegenseitigem Anschluss.

Aus derartigen Kreis-Diagrammen sind nun ohne weiteres die Stammbaum-Aufrisse zu entnehmen, wobei der Ausführung der Zeichnung nur folgendes vorausgeschickt werden muss:

Klarer Weise sind die Reaktionen, ob nah oder fern anzeigend, nur ein Hinweis auf innerhalb gewisser Grenzen liegenden gemeinsamen Ursprung der verschiedenen Formen. Sie sind als Linien von geringerer oder grösserer Länge darstellbar, sagen aber nichts darüber aus, ob diese Linien als Gerade verlaufen oder ob sie ein- bis mehrfach gebrochen sind. Ob demnach der Antigen-Formenkreis, der als Ausgangspunkt der Reaktionen diene und das Immunserum geliefert hat, geradlinig oder durch gebrochene Linien mit demn Formenkreisen zu verbinden ist, die Reaktionen gegeben haben, geht aus den Reaktionen an sich nicht hervor. Nur durch Combination mehrerer von verschiedenen Ausgangspunkten aus erhaltener Reaktionen kann man erschliessen, wo die Abzweigungen sind und wie sie gegenseitig liegen.

So ist der auf Seite 199 dargestellte Stammbaum der Phanerogamen, soweit wir ihn bisher schon zeichnen können, zwar noch ein Provisorium insofern, als sich der Verlauf der Linien und die gegenseitigen Abstände der Familien voneinander noch etwas ändern können. Aber solche kleinere Korrekturen werden an dem grossen Bild, welches wir von den Verwandtschaften der höheren Pflanzen bereits zeichnen können, nicht mehr viel ändern. Unter allen Umständen ist unser Stammbaum viel praeciser und anschaulicher als alles, was sonst an Stammbaum-Figuren der gleichen Art besteht und hat insbesondere auch den Vorteil, dass er sich nun schon seit Jahren im Verlauf immer weiter vorschreitender Untersuchungen nicht fundamental geändert hat, sondern in Einzelheiten zwar ver-





bessert und ergänzt, aber doch mit dem zuerst Publizierten wohl übereinstimmend, einen immer besseren Ausbau gewonnen hat.

#### Literatur-Verweise.

(1) Krehl, Pathol. Physiol. 8. ed. (1914) p. 227 ff. - (2) Buchner, zitiert nach Krehl, l.c. p. 239. - (3) Krehl, l.c. p. 240. - (4) H. H. Meyer in Arch. Experiment. Pathologie & Pharmacolog. XLII (1899); Overton, Studien über Narkose (Jena 1901). - (5) Malligson in Mez, Archiv I (1922) p. 12. - (6) Hoeffgen in Mez, Archiv I (1922) p. 85. - (7) Hoeffgen, l.c. p. 82. - (8) Mez und Gohlke in Cohn's Beitr. XII, p. 164. - (9) Krehl, l.c. p. 242, 244. - (10) Höffgen, l.c. p. 89. - (11) Kirstein, Diss. Königsberg 1918, p. 13, 14 etc. - (12) Malligson, l.c. p. 15. - (13) Höffgen, l.c. p. 92. - (14) Alexnat in Mez, Archiv I (1922) p. 135. - (15) Alexnat, l.c. p. 132. - (16) Höffgen, l.c. p. 83. - (17) Gohlke, Diss. Königsberg 1912, p. 43. - (18) Nuttall in Proc. Roy. Soc. London 1901, nr. 69. - (19) Magnus und Friedenthal in Ber. Deutsch. bot. Gesellschaft XXIV (1906). - (20) Gohlke, l.c. p. 55. - (21) Preuss, Diss. Königsberg 1917, p. 472, 473. - (22) Malligson, l.c. p. 13. - (23) Mez und Gohlke, l.c. p. 165. - (24) Mez und Gohlke, l.c. p. 166 ff. - (25) Kirstein, l.c. - (26) Mez und Gohlke, l.c. p. 169.

#### Mitteilung des Herausgebers.

Wie die Nummern 3 und 4 des "Botanischen Archivs" zeigen, beginnt dies Unternehmen seine Kinderkrankheiten, die sich am meisten in verwisstem Druck und unscharfen Figuren äusserten, allmählig zu überwinden. Auch zur Korrektur der vielen Tippfehler wird ein Verfahren ausprobiert werden, sodass die Zeitschrift bald nicht mehr sich zu entschuldigen braucht, wenn sie in die Hände der Abonnenten gelangt. Deshalb können von jetzt ab Manuskripte mit Ruhe dem Archiv übergeben werden; dasselbe wird sie in guter Weise und zugleich rasch zur Veröffentlichung gelangen lassen. Auch werden die Figuren, wie die im 3. Heft reproduzierten, kaum mehr etwas zu wünschen übrig lassen. Vom 5. Heft ab hoffe ich, auch Reproduktionen von Photographien geben zu können, denn sowohl der Herausgeber wie der Drucker sparen keine Mühe, um die Zeitschrift immer besser auszugestalten.

Druckkosten-Zuschüsse werden für eingesandte Arbeiten vor der Hand nicht in Rechnung gestellt, bis eine weitere Verschlechterung unserer Geldverhältnisse vielleicht auch dazu zwingt. Wir hoffen aber, das noch längere Zeit vermeiden zu können. Nur für Dissertationen wird ein geringer Zuschuss gefordert, der erheblich niedriger ist als die maschinenschriftlichen Abzüge, welche als Pflichtexemplare eingeliefert werden müssen und vergessen in den Bibliotheken liegen. Jede im "Archiv" abgedruckte Dissertation dagegen gibt Arbeit und arbeitet selbst weiter. Es wäre eine unverantwortliche Verschwendung geleisteter Arbeit, wenn botanische Dissertationen noch weiter in den maschinenschriftlichen Exemplaren nutzlos vergraben würden!

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Botanisches Archiv. Zeitschrift für die gesamte Botanik](#)

Jahr/Year: 1922

Band/Volume: [1](#)

Autor(en)/Author(s): Mez Carl Christian

Artikel/Article: [Anleitung zu sero-diagnostischen Untersuchungen für Botaniker 177-200](#)