



Groei en differentiatie van *Opalina ranarum* (Ehrbg.)

<https://hdl.handle.net/1874/291779>

qu. 192, 1920.

GROEI EN DIFFERENTIATIE
VAN OPALINA RANARUM
(EHRBG)

G. A. W. VAN OVERBEEK DE MEIJER

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

s.
cht

8

GROEI EN DIFFERENTIATIE VAN OPALINA
RANARUM (Ehrbg.).

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK UTRECHT



3969 3977

Diss Utrecht 1928

GROEI EN DIFFERENTIATIE VAN OPALINA RANARUM (EHRBG)

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN
DE WIS- EN NATUURKUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSI-
TEIT TE UTRECHT, OP GEZAG VAN DEN RECTOR-
MAGNIFICUS Dr. B. J. H. OVINK, HOOGLEERAAR IN DE
FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJSBEGEERTE, VOL-
GENS BESLUIT VAN DEN SENAAAT DER UNIVERSITEIT
TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER
WIS- EN NATUURKUNDE TE VERDEDIGEN OP
WOENSDAG 4 JULI 1928, DES NAMIDDAGS VIER UUR

DOOR

GILLIS ALEXANDER WILLEM VAN OVERBEEK
DE MEIJER
GEBOREN TE UTRECHT.

KEMINK EN ZOON — OVER DEN DOM — UTRECHT — 1928

BIBLIOTHEEK DER
RIJKSUNIVERSITEIT
UTRECHT.

AAN MIJN OUDERS.
AAN MIJN AANSTAANDE VROUW.

Gaarne maak ik van de, mij door dit proefschrift geboden, gelegenheid gebruik, om woorden van oprechten dank te richten tot U, Hooggeleerden in de Wis- en Natuurkundige Faculteit der Utrechtsche Hoogeschool.

Ik beschouw het als een groot voorrecht, onder leiding van U, Hooggeleerden Pulle, Hooggeleerden Went en Hooggeleerden Jordan, te hebben mogen werken.

Wel zeer in het bijzonder ben ik U, Hooggeleerden Nierstrasz, Hooggeachten Promotor, erkentelijk voor de welwillendheid en hulp, die ik bij het voltooiën van dit proefschrift van U heb mogen ondervinden. Uw groote kennis en scherp-critische geest zijn mij een onmisbare steun geweest.

Steeds zal mij de tijd, dien ik onder de directe leiding van U, Zeergeleerden Entz, heb kunnen werken, in dankbare herinnering blijven. De vele gaven van hoofd en hart, in zoo rijke mate voor Uw leerlingen beschikbaar, maken dit werken wel tot iets zeer aangenaams.

Het zou mij onmogelijk geweest zijn, de platen van mijn proefschrift in dezen vorm te doen verschijnen, wanneer ik daarbij niet op Uw hulp, Hooggeachten Bretschneider, had kunnen rekenen. In de eerste plaats dank ik U echter voor de vriendschappelijke wijze, waarop gij steeds bereid waart mij bij mijn werk behulpzaam te zijn.

Ook U, Hooggeachte Mejuffrouw Hoek en Zeergeleerden Schuurmans Stekhoven betuig ik hiervoor mijn hartelijken dank.

Ik heb het bijzonder op prijs gesteld, dat gij, Zeergeleerde Schouten, zoovele van Uw kostbare uren hebt willen besteden om mij bij het werken met Uw ingenieus toestel te helpen.

Wanneer ik terugdenk aan den tijd, dien ik op het zoölogisch laboratorium heb doorgebracht, dan zal dat steeds zijn met een gevoel van waardeering voor de groote hulpvaardigheid, die gij, waarde Jan Kreugel mij steeds betoond hebt.

I. Inleiding.

Het is bekend, dat de Protisten zich, ten opzichte van het behouden van hun vorm, zeer verschillend gedragen.

Sommige soorten blijken, zelfs met de grofste methoden gefixeerd, hun vorm uitstekend behouden te hebben; andere daarentegen kunnen slechts met de grootste moeite eenigszins dragelijk gefixeerd worden.

Zoo kan de vorm van b.v. Stentor nauwelijks goed behouden blijven, terwijl de vorm van een soort als Opalina, na eenvoudige indroging, vrijwel dezelfde blijkt te zijn gebleven.

Algemeen wordt aangenomen, dat het cytoplasma, dus de grondsubstantie van het lichaam der Ciliaten, een meer of minder beweeglijke vloeistof is. Een vloeistof, die in een andere vrij gesuspenderd is, moet echter een bolvorm aannemen.

Dit zou dan ook het geval moeten zijn bij de Ciliaten. Wij weten echter, hoe de vorm bij deze groep kan verschillen. Dit is de reden, dat Koltzoff beweert, dat het afwijken van den bolvorm alleen mogelijk is door de aanwezigheid van formatieve elementen, van een „skelet”. Als zoodanig kunnen een meer of minder stijve membraan, de pellicula, of de in het plasma aanwezige fibrillen functioneren, die bij een groot aantal Protisten gevonden en, al naar de hun toegedachte functie, onder verschillende namen beschreven zijn.

Van andere zijde wordt daarentegen beweerd, dat die eigenschappen in het plasma zelf liggen. Zoo heeft Calkins experimenteel aangetoond, dat bij Ciliaten het plasma ook in den vorm van een „kaasachtige” substantie kan voorkomen.

Nog een andere mogelijkheid geeft het onderzoek van K. C. Schneider, die in zijn werk over plasma-structuur en -beweging bij Protozoën en plantencellen reeds een onderscheid maakte tusschen de eigenlijke steunfibrillen en wat hij „Elementarfäden” noemt. Deze „Elementarfäden” vormen volgens hem een echt skelet; zij

zouden evenwel niet steeds aanwezig zijn, doch kunnen verdwijnen en opnieuw optreden.

Wanneer niet alleen de pellicula, maar ook fibrillen, of alleen deze laatsten den vorm aan een bepaald dier geven, kan men zich dus nog de vraag stellen, welke soorten fibrillen te onderscheiden zijn en hoe de verhouding van deze tot het plasma is. Ook, of er een onderscheid te constateeren valt tusschen de substantie, waaruit die fibrillen bestaan, en die van het plasma, zooals dat bij de Metazoën het geval is tusschen de bindweefselfibrillen en het plasma.

Of is er met de gebruikelijke methoden geen verschil te constateeren?

Ik heb gepoogd deze vragen te beantwoorden voor *Opalina ranarum*, voor alle ontwikkelingsstadia van deze, in het rectum van *Rana temporaria* levende soort.

De jonge *Opalina*'s wijken in vorm zeer sterk af van de oude dieren, zoodat de mogelijkheid bestaat, dat ook in de structuur der verschillende deelen van het dier, al naarmate den leeftijd, een belangrijk onderscheid kan optreden en dat, bij verschillende stadia van ontwikkeling, ook niet steeds dezelfde deelen van *Opalina* een rol spelen in het behouden van den vorm.

Uitgaande van de bovengenoemde vraagstellingen, hebben de uitkomsten van het onderzoek mij echter aanleiding gegeven, den titel van mijn werk in meer algemeenen zin te formuleren.

In hoofdzaak werden de pellicula, het cytoplasma en de fibrillaire structuren onderzocht.

Daarnaast echter ook voortplantings- en groeiverschijnselen.

Bovendien verschaften de preparaten mij gegevens over de plasma-insluitels, die Zeller 't eerst beschreef; deze gegevens heb ik in een apart hoofdstuk verwerkt.

II. *Historisch Overzicht.*

Th. W. Engelmann (1875) is de eerste geweest, die een onderzoek instelde naar de ontwikkeling van *Opalina ranarum*. Waar in ontwikkelde kikvorschen geen jonge ontwikkelingsvormen worden aangetroffen en *Opalina* niet vrij in het water kan leven, lag volgens hem de gedachte voor de hand, dat de darm van de kikkerlarven die jonge vormen zou bevatten.

Hij vond daarin ook werkelijk talrijke cysten en alle mogelijke groeistadiën van *O. ranarum*. Deze cysten en ontwikkelingsstadiën heeft hij beschreven en afgebeeld, zonder verder op de morphologie van het dier in te gaan.

E. heeft niet kunnen ontdekken op welke wijze de cysten ontstaan. Hij schijnt gemeend te hebben, gezien de proeven, die hij met kikkers nam, dat deze ook onder, voor het dier abnormale, omstandigheden gevormd worden. Vóór of in den voortplantingstijd van den kikvorsch heeft hij den darminhoud van dat dier blijkbaar nooit onderzocht.

E. Zeller (1877) heeft getracht de resultaten van Engelmann te completeeren, door te onderzoeken, hoe de cysten gevormd worden. Hij meende echter, dat Engelmann niet met *O. ranarum*, maar met *O. dimidiata* gewerkt had, daar noch Stein, noch hijzelf de eerste soort ooit in *Rana esculenta* gevonden hadden, doch steeds in *Rana temporaria*.

In hoofdzaak loopt zijn onderzoek over de cystevorming en verdere ontwikkeling van *O. ranarum* en eenige andere *Opalina*-species. Ook Zeller heeft weinig morphologisch onderzoek gedaan; het uitvoerigst onderzocht hij nog de pellicula.

Toch is hij de eerste geweest, die de eigenaardige plasma-insluitsels als „Scheibenförmige Körperchen” beschreven heeft.

Zoodra de kikvorschen hun winterkwartieren verlaten hadden, bleek een groot deel der *Opalina*'s een snel deelingsproces door te maken, hetgeen hij uitvoerig beschreef. De zeer kleine vormen, die hierdoor ontstonden, bleken zich daarna te encysteeren, waarna zij met de faeces naar buiten kwamen.

Den groei, volgend op het uitkomen van de cysten, heeft Zeller eveneens nauwkeurig beschreven.

K. Tönniges (1898) heeft daarentegen juist een morphologisch onderzoek gedaan. Hij zegt: „Nach meiner Auffassung liegt ein gewisser Werth der vorliegenden Untersuchung in der Art und Weise der Verarbeitung, da ich möglichst bestrebt gewesen bin, die Veränderungen und Umwandlungen, welche ein Organismus im Lauf der Zeit erfahren kann, in Rechnung zu ziehen”; en verder: „In Wesentlichen verdanke ich die Erweiterung der Kenntnisse über den feineren Bau von *Opalina* ran. der Verwendung grösserer Materials Mengen zum vergleichenden Studium, geeigneter Conservierungs- und Färbungsmethoden.” Er wordt echter in het geheel niet gezegd, wat voor soort materiaal hij gebruikte; ook niet welke techniek hij toepaste. De bovenaangehaalde woorden doen dan ook meer verwachten dan de resultaten, die meegedeeld worden. Over het plasma slechts eenige algemeene opmerkingen; de textfiguur is zeer schematisch, geeft bovendien slechts een bepaalden physiologischen toestand van het inwendige van het dier weer.

Dezelfde structuren worden eerst contractiele fibrillen, even later protoplasmatische draden genoemd.

Het uitvoerigst zijn nog de plasma-insluitels, die Zeller het eerst beschreef, onderzocht, waarbij Tönniges tot de overtuiging kwam, dat het in geen geval excreetkorrels konden zijn; hij zag deze insluitels herhaaldelijk in deeling. Toch opperde hij nog de mogelijkheid, dat zij den, in deelen uiteengevallen, macronucleus zouden voorstellen, of misschien parasieten.

In het jaar daarop volgde een voorloopige mededeeling over de cel- en kerndeeling van *O. ranarum*. Daarbij werd ook knopvorming beschreven.

H. N. Maier (1903) onderzocht speciaal het ciliënapparaat der Infusoriën. Dit onderzoek bestaat uit twee gedeelten; in het eerste worden eenige soorten, o.a. *Opalina ranarum*, besproken; in het tweede deel heeft Maier meer algemeene beschouwingen ontwikkeld over de functie en het ontstaan der basaalkorrels, naar aanleiding van de hypothese van v. Lenhossék—Henneguy, volgens welke de basaalkorrels uit centrosomen zouden ontstaan.

Natuurlijk zijn het vooral de ciliën, de wijze van inplanting van deze en de pellicula geweest, die hij bij *Opalina* nauwkeurig onder-

zoekt. Ook echter het ecto- en endoplasma. Hij heeft nooit een grofvacuolairen bouw van het ectoplasma, zooals Tönniges dien in de reeds genoemde textfiguur afbeeldde, waargenomen, evenmin onder de pellicula verloopende fibrillen.

K. C. Schneider (1906) ontdekte bij *Opalina ranarum* een fibrillensysteem. Alleen Tönniges had tot dusver gemeend bij *Opalina* fibrillen gevonden te hebben, parallel en direct onder de pellicula verloopend; zooals reeds gezegd, is het niet zeker, wat hij er eigenlijk mee bedoelde.

Het door Schneider gevonden systeem, een echt skelet of linom, zooals hij het noemde, zou uit twee componenten bestaan: eigenlijke steunfibrillen, voortzettingen van de ciliënwortels, tot in het endoplasma zich voortzettend en een fijn netwerk van zg. „Elementarfäden”, welke met die steunfibrillen in verbinding staan. Hij zag dit netwerk als een vorming van voorbijgaanden aard; het zou kunnen verdwijnen en weer opnieuw optreden.

Het is niet mijn bedoeling de vitalistische theorie van Schneider hier te bespreken; ik wil slechts in 't kort meedeelen, dat hij zich dit linom opgebouwd dacht uit bestendig aanwezige, draadvormig gerichte tagmen, vitale deeltjes in het hyalo- of protoplasma, de oorspronkelijkste plastiden, welke de uitgangspunten zouden zijn van de microscopisch aantoonbare granula, waaruit dus het microscopisch aantoonbare linom zou bestaan. Bij mijn eigen onderzoek over de fibrillen zal dit trouwens uitvoerig ter sprake komen.

E. Neresheimer's onderzoek (1906—'07) bepaalde zich in hoofdzaak tot de voortplanting van *Opalina*. Wat de morphologie van het dier betreft, heeft hij de opvattingen van Maier gedeeld. Toch vond hij in zijn preparaten *Opalina*'s, waarvan de plasmabouw overeenkwam met het door Tönniges gegeven schema, „allerdings nur in gewissen mit der Fortpflanzung zusammenhängenden Stadien, die Maier wohl nicht vorgeliegen haben.” De door Schneider beschreven fibrillen bleek hij nooit te hebben waargenomen.

De processen, die zich in de kernen afspelen, zijn uitvoerig beschreven; hiervan wil ik alleen vermelden, dat hij de plasma-insluitels van Zeller beschouwd heeft als het achromatische gedeelte der generatieve kernen. Toch heeft hij deze insluitels nooit in deeling gezien.

Na de vorming der cysten, die beschreven en afgebeeld worden, zag N. de gametocyten, die eruit te voorschijn komen, in deeling gaan, tot éénkernige isogameten gevormd waren, die copuleerden, waarna de gevormde zygoten zich encysteerden. Hieruit kwamen de agamonten van de metagametische generatie te voorschijn, die uitgroeiden tot volwassen dieren, op de wijze, zooals reeds door Zeller beschreven was. *)

In een voorloopige mededeeling van M. M. Metcalf (1908) constateerde deze onderzoeker bij *Opalina* naast de endoplasma-insluitels („endosarc spherules”) ook de aanwezigheid van ronde lichaampjes in de vacuolen van het ectoplasma („ectosarc spherules”) en wel bij alle dieren in alle tijden van het jaar.

Verder beschreef hij anisogame copulatie bij *Opalina intestinalis*, *O. caudata* en *O. dimidiata*; van de micro- en macrogameten gaf hij afbeeldingen.

Het jaar daarop deed Metcalf het groote onderzoek over *Opalina* verschijnen; in hoofdzaak over *O. intestinalis*. In het morphologisch onderzoek heeft hij ook *O. ranarum* betrokken; dit was niet het geval bij het onderzoek over de voortplanting.

Metcalf heeft evenals Tönniges subpelliculaire fibrillen gevonden. Noch in het ecto-, noch in het endoplasma worden echter fibrillaire structuren beschreven.

Zeer uitvoerig heeft hij de ecto- en endoplasma-insluitels onderzocht, met alle mogelijke middelen erop gereageerd, zonder evenwel tot positieve resultaten te zijn gekomen. Wat de eersten betreft zegt Metcalf: „I know of nothing to indicate that they are excretory.” Door te reageeren op verschillende stoffen, vet, lecitine enz., kreeg hij voor de endoplasmainsluitsels slechts negatieve resultaten. Hij zegt dan ook: „The whole subject of the nutrient fluids and refractive bodies in the cytoplasm of the Protozoa needs more succesful study than it has yet received.”

E. Brumpt (1915) deed infectieproeven met de cysten van *Opalina*-species, waarbij hij nieuwe gegevens kreeg over de voortplanting van deze dieren. Dit onderzoek zal in een volgend hoofdstuk besproken worden.

*) B. Klaptoz (1907) heeft de resultaten van Neresheimer besproken.

In 1919 verschenen de resultaten van het onderzoek van C. Tönniges, een voortzetting van dat van 1898.

T. nam bij één en hetzelfde object vezelige structuren, granulair en bouw en hier en daar ook spongieusen bouw van het plasma waar. Hij beschouwde deze structuren echter als fasen van de elementaire plasmastructuur, veroorzaakt door de stofwisseling. In rusttoestand zou het plasma een homogenen bouw hebben, niet een schuimstructuur, zooals Bütschli meende. Even later spreekt hij echter weer over den „Wabenbau" van het plasma, hiermede de wijze, waarop dit over het inwendige van het dier verdeeld is, bedoelend. Het lijkt mij niet overbodig er hier nog eens op te wijzen, hoe verschillend en daardoor verwarrend dit begrip „Wabenbau" gebruikt wordt en is geworden.

T. heeft een fibrillensysteem beschreven, dwars door het dier heen, de ciliën van de tegenover elkaar liggende oppervlakken met elkaar vereenigend.

Verder wees hij op de wisselende structuur van het ectoplasma, waardoor de verschillende meeningen hierover verklaard worden. Een zeker kenmerk, ter onderscheiding van het endoplasma, zou het ontbreken der plasma-insluitsels zijn, welke hij uitvoerig onderzocht, daarbij tot de conclusie komend, dat deze insluitsels het equivalent van den macronucleus der Ciliaten zouden voorstellen.

St. Konsuloff (1922) heeft zoowel de morphologie als de voortplanting van *O. ranarum* onderzocht.

Om de verschillen, die in den bouw van het ectoplasma kunnen optreden, en het wezen van de insluitsels in de vacuolen van die plasmalaag te verklaren, voerde hij voedingsproeven uit. Dit was mogelijk, doordat het hem gelukt was de dieren langen tijd in een vloeistof van bepaalde samenstelling in het leven te houden. Die vacuolen met hun inhoud zouden in verband staan met de voeding en de cystevorming. De endoplasma-insluitsels vatte K. daarentegen op als echte macronuclei; hij zag deze ook in deeling.

K. bevestigde Schneider's onderzoek over het fibrillensysteem; dit zou dienen om den lichaamsvorm te behouden.

Ongetwijfeld komt aan Konsuloff de verdienste toe een nieuwen weg gekozen te hebben om tot de oplossing van verschillende problemen te komen.

J. Spek (1923) heeft den invloed bestudeerd, dien verschillende zoutoplossingen o.a. op de plasmastructuur van *Opalina* uitoefenen. Deze structuur bleek veranderlijk te zijn, zoodat de verschillende meeningen, tot dusver over den plasmabouw geuit, hem dan ook niet verwonderden.

In normale omstandigheden zag hij een fijn emulsoïde plasmastructuur. Onder inwerking van de zoutoplossingen werd deze structuur grover; zelfs kon onder de pellicula een Bütschliche „Alveolarschicht” ontstaan.

Dit onderzoek toont duidelijk, hoe voorzichtig men met conclusies over den fijnen bouw van gefixeerd materiaal zijn moet. De woorden: „Sobald wir das Wesen von Strukturen und Strukturänderungen physikalisch verstehen, gewinnen die Strukturen für uns eine ganz andere Bedeutung und dokumentieren uns dann vielleicht in gewissem Sinne den jeweiligen Zustand der lebenden Zelle selbst”, spreken duidelijk voor een veranderen van de tot dusver gevolgde methoden van onderzoek.

In Metcalf's groote monographie over de *Opalinide Infusoriën* (1923) worden over de morphologie en voortplanting van *O. ranarum* geen nieuwe gegevens megedeeld. Slechts dient vermeld te worden, dat het fibrillaire netwerk onder de pellicula, waardoor de basaalkorrels der ciliën verbonden zouden zijn, in navolging van de Amerikaansche school, als een rudimentair zenuwstelsel wordt opgevat.

Ten slotte heeft C. G. B. ten Kate (1926) een uitvoerige beschrijving gegeven van bij *O. ranarum* gevonden fibrillen.

Behalve het subpelliculaire netwerk en dorso-ventraal gerichte fibrillen, die de basaalkorrels der tegenoverelkaar liggende oppervlakken zouden vereenigen, heeft hij echter geen samenhangend fibrillensysteem beschreven.

Ten Kate vatte alle fibrillen op als steungevende elementen, als morphonemen; hij kante zich tegen de opvatting van Metcalf.

Van de talrijke onderzoekingen over *O. ranarum* heb ik van degenen, die op mijn eigen onderzoek betrekking hebben, alleen de voornaamste hierboven genoemd. De anderen zullen bij het eigenlijke onderzoek besproken worden.

III. *Materiaal.*

Alle dieren, die voor dit onderzoek gebruikt werden, dus zowel de ontwikkelde kikvorschen als de kikkerlarven, heb ik op dezelfde plaats, in de buurt van Utrecht, verzameld. Door verschillende omstandigheden was het wat laat in het voorjaar geworden, vóór ik met het verzamelen van materiaal kon beginnen. De larven van *Rana temporaria* bleken toen reeds vrij ver ontwikkeld te zijn; in den darm werden daardoor ook slechts verder ontwikkelde *Opalina ranarum*-stadiën gevonden.

Dezelfde sloot werd echter ook door *Rana esculenta* voor het afzetten van de eieren gebruikt. Deze soort doet dat later dan *Rana temporaria*, zoodat op dat tijdstip de larven nog zeer klein waren. Deze larven bleken alleen met *O. ranarum* geïnfecteerd te zijn; de kleine *Opalina*'s, in hun darm aanwezig, bleken allen uit te groeien tot den gewonen *O. ranarum*-vorm. Onnoodig te zeggen, dat ik alle dieren, gastheeren zoowel als gasten, zorgvuldig determineerde. Dit te meer, omdat indertijd verschillende onderzoekers als vaststaand hadden aangenomen, dat Engelmann (1875), die ook *O. ranarum* uit *Rana esculenta* verkregen had, zich in de soort vergist moest hebben. Metcalf (1923, pag. 222) noemt *O. ranarum* een zeldzamen, misschien zelfs alleen een tijdelijken gast van *Rana esculenta*.

Een toestand, zooals die op de vindplaats aangetroffen werd, is zeker merkwaardig genoeg om aandachtig beschouwd te worden in verband met de opvattingen, die over de voortplantingsverschijnselen van *Opalina* bestaan. Ik kan deze quaestie echter beter in het hoofdstuk over de voortplanting van *Opalina ranarum* bespreken.

Zooals reeds gezegd, verkreeg ik de kleine *Opalina*-stadiën uitsluitend uit *R. esculenta*-larven.

De gametenvorming en de anisogame copulatie heb ik niet gezien; wel zag ik nog cysten, waaruit *Opalina*'s te voorschijn kwamen; ook micro- en macrogameten. De eerste periode van gametenvorming en copulatie was echter in hoofdzaak afgelopen.

Vanaf dit oogenblik heb ik geregeld *Esculenta*-larven in verschillende graden van ontwikkeling verzameld om de *Opalina*'s te on-

derzoeken en te fixeeren. Tevens volwassen en onvolwassen *Rana temporaria*'s. Daarna ook dieren met en zonder staart, pas gemetamorphoseerde larven van die soort. Later die stadia ook van *Rana esculenta*. In September en begin October heb ik jonge — (d.w.z. nog niet éénjarige), onvolwassen en volwassen *R. temporaria*'s onderzocht.

Dit voorjaar werden eenige *R. temporaria*'s, die buiten gevangen waren, in een verwarmde omgeving geplaatst, in een bak, waarin het water 3 cm. hoog stond. Vrij spoedig viel een begin van cystevorming in den darm van de kikvorschen, ook van de nog niet geslachtsrijpe, te constateeren, waarbij dus alle mogelijke deelingsstadiën gevonden werden.

Alleen de gameten heb ik dus niet op coupe's kunnen onderzoeken, hetgeen echter van geen belang is voor de algemeene resultaten van dit onderzoek.

IV. *Techniek.*

In den winter is het soms moeilijk kikkers te krijgen, die voldoende met *Opalina*'s geïnfecteerd zijn. Om, voor bepaalde doeleinden, toch steeds materiaal ter beschikking te hebben, heb ik getracht van *Opalina ranarum* cultures aan te leggen. Ik gebruikte daarvoor 0.65 % NaCl-, Püttersche- en Ringersche physiologische oplossingen. Voor elke oplossing werd de techniek gevolgd, die door Konsuloff (1922) uitvoerig beschreven is. Het heeft dan ook geen zin hier verder op in te gaan. Püttersche vloeistof bleek het best aan het doel te beantwoorden; de *Opalina*'s bleven hierin, oogenschijnlijk in goeden toestand, langeren tijd in leven, al gelukte het mij niet Konsuloff's resultaten te verkrijgen. Mits de NaCl- en Ringersche oplossingen goed doorgekookt en door bijvullen op dezelfde concentratie gehouden werden, leefden de dieren hierin ook verscheidene dagen.

De aanwezigheid van een deel van den darminhoud van den kikker in de oplossing bleek voor de *Opalina*'s gunstig te zijn, hetgeen gemakkelijk te begrijpen is.

Een plotselinge sterfte kon door, daarin plaats hebbende, chemische omzettingen echter ook optreden. Soms bleven enkele exem-

plaren in leven, terwijl de rest gestorven was. Dezelfde ervaringen had Metcalf (1909, pag. 199) met 0.6 % NaCl- en Locke's oplossingen.

Deze pogingen heb ik evenwel spoedig gestaakt; het voorjaar brak aan en daarmee de mogelijkheid steeds versch materiaal te bemachtigen, hetgeen m.i. ook beter voor onderzoek geschikt is dan het, in een abnormaal milieu, gecultiveerde.

Abnormale vormen heb ik, evenals Konsuloff, dikwijls in slechte cultures gevonden. De dieren vertoonden daarbij allerlei uitgroeiingen en vreemde vormen.

Het verse materiaal werd in vivo bekeken, ook met gepolariseerd licht en met donkerveldbelichting.

Van de gebruikte vitaalkleurstoffen: nijlblauw, brilliant cresylblauw, methyleenblauw, neutraalrood en janusgroen, gaven alleen de laatste twee goede resultaten. De anderen kleurden of niet, of zeer weinig.

Voor het microdissectisch onderzoek heb ik den micromanipulator van S. L. Schouten gebruikt. De taatheid van de pellicula maakte het evenwel noodig eenige nieuwe naalden te construeeren.

Het gedooide materiaal werd in toto en in coupe's bestudeerd. Voor het onderzoek in toto, vooral van belang om de ontwikkeling der jonge Opalina's na te gaan, werden uitstrijkpreparaten gemaakt. Het onderste deel van den kikkerlarfdarm, ongeveer 15 mm. lang, werd afgesneden, opengeknipt op het objectglaasje en met een druppel Püttersche oplossing uitgestreken. Slechts, wanneer de kikkerlarven dood waren, bevonden zich ook Opalina's hoogerop in den darm.

Deze uitstrijkpreparaten droogde ik in den beginne snel boven de vlam, waarbij de vorm der dieren goed behouden blijft, maar zij moeilijk goed gekleurd kunnen worden. Beter lukt dit, als de preparaten langzaam aan de lucht gedroogd worden. Het is echter in beide gevallen noodig, vóór het kleuren, eerst in 96 % alcohol te fixeeren.

Natte uitstrijkpreparaten werden gefixeerd met Schaudinn's sublimaat-alcohol, osmium- en jodiumdampen, zonder bijzonder goede resultaten te geven.

Met de volgende methode kreeg ik van Opalina mooie, overzichtelijke preparaten. Hierbij werden de uitstrijkjes eerst langzaam aan de lucht gedroogd. Daarna bracht ik de volkomen droge preparaten 72 uur in een 1 % kaliumbichromaatoplossing, bij een temperatuur van 40°. Na voorzichtig afspoelen in aqua dest. werden zij door alcohol gevoerd en daarna met Heidenhainsche ijzerhaematoxyline gekleurd. Werden de uitstrijkjes echter eerst boven de vlam gedroogd, dan waren zij moeilijk na kleuring te differentiëren. Voor het onderzoeken van pellicula- en meer oppervlakkig gelegen skeletstructuren geeft deze bewerking zeer bruikbare preparaten; de basaalkorrels der ciliën zijn buitengewoon goed zichtbaar, terwijl de kernen en plama-insluitels duidelijk te zien zijn (fig. 13).

Het te snijden materiaal werd door schudden in de centrifugeerbuisjes en, na het bezinken van de zwaardere darmpartikels, vlug overgieten van de fixatie-vloeistof, zooveel mogelijk van verontreinigingen ontdaan. Van de jonge Opalinastadiën ging, gedurende de behandeling, veel materiaal verloren; daarom fixeerde ik de dieren in het stuk darm en bedde dit in zijn geheel in.

In Schaudinn's sublimaat-alcohol, in Altmann's-, Carnoy's-, sterke Flemming's-, en Champy's-oplossingen werd gefixeerd. Alleen de laatste twee fixatie-middelen gaven goede resultaten, Flemming's mengsel echter de beste (tijd van inwerken 2—3 uur).

Een klein gedeelte werd in toto gekleurd. Hoewel de coupe's daarna niet gedifferentieerd behoeven te worden, kreeg ik toch niet zulke duidelijke beelden als bij coupekleuring, wat ik daarom in het vervolg steeds toepaste. De met Delafield'sche haematoxyline gekleurde coupe's gaven slechts voor de kernen bevredigende resultaten.

Voor fibrillaire structuren bleek Heidenhain's ijzerhaematoxyline de aangewezen kleurstof, voor fibrillaire- en plasmatische structuren de driekleuring van Flemming (safranine, gentiana-violet en oranje G.). Bovendien heb ik, speciaal voor fibrillen, de Mallory'sche-, Weigertsche resorcine-fuchsine-, en Taenzer-Unnasche orceïne-kleuringen toegepast, zonder resultaat.

Proeven met de verzilveringsmethode van Klein (1926) misluk-

ten; *Opalina* is, met het aanklevende darmslijm, daarvoor ook een moeilijk object.

De beste beelden van het fibrillensysteem van *Opalina ranarum* kreeg ik door een aanwijzing van Stevens (1901). Deze macereerde enkele Ciliaten met 1—3 % kal. bichromaat; in een paar seconden werd het alveolaire endoplasma opgelost, terwijl de steunfibrillen overbleven. Deze methode gaf, op *Opalina* toegepast, verrassende resultaten. Reeds gedurende den winter had ik, bij gebrek aan *O. ranarum*, hierover proeven genomen met *O. dimidiata*, waarbij ik oplossingen van $\frac{1}{2}$ -, 1-, $1\frac{1}{2}$ % kal. bichromaat 12, 24, 36, 48 en 72 uren bij kamertemperatuur en bij 40° liet inwerken. Een hooger percentage van de oplossing bleek te fixeeren, niet te macereeren. Na het kal. bichromaat werd voorzichtig in aqua dest. gewasschen, door de alcoholreeks ingebed in paraffine, gesneden en daarna met ijzerhaematoxyline gekleurd. In de series preparaten was het langzaam oplossen van het plasma duidelijk te vervolgen; het fibrillensysteem kwam des te fraaier uit, naarmate dit proces verder voortgeschreden was. Een $\frac{1}{2}$ % kal. bichromaatoplossing gaf bij 40° en een inwerkingstijd van 72 uur de beste resultaten.

Het inbedden in paraffine geschiedde volgens de methode van Bretschneider (1927), wat veel tijd bespaarde.

Pepsine (mengsel van $\frac{1}{2}$ % pepsine en $\frac{1}{2}$ % HCl) heb ik op uitstrijkjes en coupe's laten inwerken, evenals pancreatine (1 mespunt pancreatin.-siccum op 40 ccm 1 % sodaoplossing) bij een temp. van 37°.

Voor het aantoonen van lipoïden (Golgisch apparaat) werd 1 uur in Champy's mengsel gefixeerd, daarna goed uitgewasschen en 7 dagen in 2 % osmiumzuur bij 37° gelaten. Daarna bleef het materiaal 2 dagen in herhaaldelijk ververscht water. Doet men dit laatste niet, dan is het te bros om gesneden te worden. Door alcohol en benzol werd ingebed; xylol verbleekt de preparaten. Daarom werden de coupe's ook door chloroform en benzol in cederolie ingesloten.

Alle coupe's voor dit onderzoek gebruikt, zijn 2 μ dik.

V. Voortplanting en groei.

Bij het verzamelen van materiaal uit de kikvorschlarven werden, vóór het fixeeren, telkens uitstrijkpreparaten gemaakt, om zoo-
doende te weten te komen, hoe de groei verloopt.

Dikwijls stuitte ik hierbij op verschijnselen, die alleen door een gecompliceerde voortplanting verklaard kunnen worden. Hoewel over die voortplanting reeds veel geschreven is, blijken er, bij een critische beschouwing van de verkregen gegevens, nog genoeg punten te zijn, waarover een onderzoek gedaan zou moeten worden.

Juist door dit verband met de groeiverschijnselen, leek het mij niet overbodig de voortplanting van *Opalina*, ook in verband met eigen waarnemingen, in dit onderzoek te betrekken.

Het eerste onderzoek over de voortplanting van *O. ranarum* heeft men, zooals reeds gezegd, aan Engelmann te danken. E. vond in den darm der kikvorschlarven kleurlooze, éénkernige- en levende cysten, want de trilharen van het zich daarin bevindend dier waren in golvende beweging.

Deze cysten werden alleen met azijnzuur behandeld, waardoor de kern duidelijker te zien kwam.

De kleinste ontwikkelingsvormen toonden, na het verlaten van de cysten, ook slechts één kern te hebben; deze kleinste vormen trof hij aan in reeds vrij groote larven (lichaam 7 mm, staart 17—19 mm).

Volgens E. zou de ontwikkeling daarin bestaan, dat uit de cysten een klein, éénkernig individu te voorschijn komt, dat geleidelijk in volumen toeneemt, terwijl in het algemeen ook het aantal en het totaalvolumen der kernen des te grooter wordt, naarmate de *Opalina* groeit. Hoe grooter het aantal kernen, des te kleiner zag hij deze worden.

Op plaat V, fig. 1—15 heeft hij cysten en jonge vormen afgebeeld. De geleidelijke groei van het dier, met de evenredige toename van kernaantal en -volumen zou uit fig. 8—15 blijken.

Echter blijkt ook, dat E. geen microgameten gezien heeft, al wordt dit wel beweerd.

Fig. 3 en 4 geven niet het voor deze microgameten karakteristieke beeld, iets, wat E. zeker opgevallen zou zijn. Bovendien zijn de opgegeven maten te groot.

Fig. 5 en 6 zouden macrogameten kunnen voorstellen; het verschil tusschen deze en vormen, die uit de copulatie zijn ontstaan, is te gering, om direct uit afbeeldingen te kunnen besluiten.

Na dit onderzoek bleef het ontstaan der cysten nog onverklaard. Een paar jaar later werd dit vraagstuk evenwel opgehelderd door Zeller, die zeer nauwkeurig een snel deelingsproces bij een deel der *Opalina's* in den kikvorschdarm beschreef.

Na dit proces, waarbij de diertjes steeds kleiner werden, zag Z. cysten ontstaan met 3—12 kernen.

Dit deel van Zeller's onderzoek is door al degenen, die de voortplanting van *Opalina* onderzochten, in hoofdzaak bevestigd.

Hoe was de 3—12-kernigheid van de cysten echter te rijmen met de ééne kern, die Engelmann in de cysten gezien had?

Eenmaal in den darm van een kikkerlarve gekomen, bleken de meesten dier cysten éénkernig te worden, hoe, dat wist Zeller niet. Uit deze éénkernige cysten kropen éénkernige jonge *Opalina's*. Een ander gedeelte was nog méérkernig, waaruit jonge *Opalina's* met meerdere kernen te voorschijn kwamen. Eerst na verloop van eenige dagen bleken deze dieren ook éénkernig te zijn geworden. Dit verschijnsel, dat door latere onderzoekers als het normale verloop van de ontwikkeling beschreven is, werd door Zeller opgevat, als alleen dan te gebeuren, wanneer de cysten zeer kort na de uitscheiding door een kikkerlarve opgenomen werden.

Den verderen groei zag hij, zooals Engelmann dien beschreven had.

Alleen bij *O. dimidiata* kwamen, vóór de dieren volkomen uitgroeid waren, snel opelkaar volgende deelingen, waaruit weer kleine individuen ontstonden, dikwijls voor.

Het lijkt mij, gezien de afbeeldingen, dat Z. geen microgameten gezien heeft.

Ook Tönniges zag gedurende de encysteering een éénkernig cystestadium ontstaan, door onderlinge versmelting van de ker-

nen. De zóó ontstane, éénkernige *Opalina*'s „conjugeerden” na het verlaten van de cysten. Op deze „conjugatie” volgde een sterke vermeerdering van de jonge dieren door dwarsdeeling, lengtedeeling en knopvorming.

Het is jammer, dat T. geen afbeeldingen van de „conjuganten” gegeven heeft. Daardoor is het onmogelijk te zeggen of hij de anisogame copulatie, of slechts een toevallig tegen elkaar aanliggen van de dieren gezien heeft.

Het is dus niet onmogelijk, dat Neresheimer toch de eerste geweest is, die gameten van een *Opalina*-soort (*O. dimidiata*) als zoodanig herkend en beschreven heeft (pl. 3, fig. 36).

Toch moet hierbij opgemerkt worden, dat Léger en Duboscq (1904) een uitstekende afbeelding gegeven hebben van een microgameet van *O. Saturnalis* (fig. 8, pl. 14). Daarbij hebben zij het vermoeden uitgesproken, dat deze vorm, waarvan zij het ontstaan niet kenden, in verband zou staan met de voortplanting.

N. vond geen macrogameten. Wel heeft hij een gameet van *O. ranarum* beschreven en afgebeeld (pl. 3, fig. 38), welke een macrogameet blijkt te zijn geweest.

De deelingen, volgend op het vrijkomen uit de cysten van meerkernige-, zeer zelden éénkernige individuen, zijn door N. als het normale proces herkend, waaruit de gameten ontstaan. Het zouden isogameten zijn. Na de copulatie zag N., dat de zygoten zich opnieuw encysteerden; er ontstonden cystozygoten, éénkernig. Dit zouden de éénkernige cysten zijn, die door Engelmann en Zeller gevonden waren. Hij heeft, bij gebrek aan materiaal, daaruit evenwel nooit een dier te voorschijn zien komen.

N. schijnt niet aan de mogelijkheid gedacht te hebben, dat deze cystozygoten natuurlijk voor een groot gedeelte weer met de faeces uit de kikkerlarve verwijderd zullen worden.

Metcalf is tenslotte degene geweest, die eerst (1907) voor *O. intestinalis* en *O. caudata*, daarna (1909) ook voor *O. dimidiata* het vraagstuk der gametenvorming en copulatie heeft opgelost. Hierbij moet opgemerkt worden, dat het woord copulatie met opzet door hem gebruikt werd om een onderscheid te maken met de conjugatie der typische Ciliaten.

Copulatie had plaatst tusschen twee ongelijksoortige gameten, micro- en macrogameten, na het reeds door Neresheimer beschreven deelingsproces. Slechts één keer, bij *O. caudata*, zag M. ook copulatie tusschen twee gelijkvormige gameten, als abnormaal geval (fig. 276, 1909).

Sommige *Opalina*-species schijnen vrijwel gelijkvormige gameten te hebben (Bhatia, 1927, pag. 96).

Wanneer de macrogameet 2 kernen had, bleek de kern van den microgameet met een van beiden te versmelten. Dit nam M. in vele gevallen waar.

Uit een figuur, die Neresheimer gaf om abnormale deeling bij de gametenvorming te demonstreeren (fig. B.), concludeerde M., dat deze onderzoeker dus wel degelijk copulatie had gezien, doch verkeerd geïnterpreteerd.

M. heeft in normale gevallen nooit, wel in abnormale gevallen, bij zygoten, die op het punt van doodgaan waren, na de copulatie encysteering waargenomen.

Na het onderzoek van Metcalf is er geen verschil van meening meer geweest over de processen, die zich afspelen tot en met de copulatie. Wat gebeurt echter na de vorming van de zygoten?

Hierover hebben Brumt en Konsuloff onderzoekingen gedaan.

Brumt zag de jonge *Opalina*'s na de copulatie, uitgroeien; onderwijl trad, door deelingen, een vermeerdering van het aantal op.

Na eenigen tijd ontstonden plotseling „des épidémies de division” eindigend in „des épidémies d'encystement”. Een deel der dieren bleef echter geïnfecteerd. Een herhaling dus van het cystevormingsproces in de volwassen kikvorschen; de cysten bleken morphologisch ook gelijk te zijn. Wanneer Br. met deze cysten infectieproeven deed, kreeg hij het merkwaardige resultaat, dat bij nog niet geïnfecteerde kikkerlarven gametenvorming plaats had; waren de larven echter reeds geïnfecteerd, dan bleef gametenvorming uit. Hij zegt hierover: „mais, ou ces individus disparaissent, ou ce qui est plus vraisemblable, ils évoluent en adultes sans donner de gamètes”, een waarschijnlijkheid, die hij even later tot een absolute zekerheid maakt.

Na de zygotenvorming heeft Br. evenals Metcalf nooit cystozygotenvorming waargenomen.

Konsuloff beschreef de gametenvorming en copulatie voor *O. ranarum*, welke soort daarin volkomen met de tot dusver onderzochte *Opalina*-species bleek overeen te komen. Na de zygotenvorming trad steeds cystozygotenvorming op, zooals Neresheimer voor *O. dimidiata* reeds eerder beschreef. Deze cystozygoten kwamen met de faeces naar buiten, werden opnieuw opgenomen door larven, waarin de jonge *Opalina*'s uit de cystozygoten direct uitgroeiden. Deze jonge agamonten bleken reeds spoedig in deeling te gaan.

K. zag de cysten, die uit de volwassen kikvorschen stamden, zich op verschillende manier gedragen. Uit een deel kwamen jonge *Opalina*'s te voorschijn, die, zonder gametenvorming, direct uitgroeiden. Uit het andere deel werden gameten gevormd.

Het is niet gemakkelijk, zoo niet onmogelijk, de uitkomsten der bovengenoemde onderzoekingen met elkaar in overeenstemming te brengen. Dit zou alleen dan mogelijk zijn, wanneer men de wijze, waarop die onderzoekingen waren uitgevoerd, in alle finessen kende.

Engelmann liet eieren in glazen bakken uitkomen; waarmee werden de jonge kikkerlarven echter gevoed? Hij ontmoette de vroegste ontwikkelingsstadiën van *Opalina* in larven, die reeds vrij groot waren, terwijl in de natuur veel kleinere kikkerlarven al geïnfecteerd zijn. Dit heb ik tenminste steeds waargenomen.

De éénkernigheid van de door E. gevonden cysten heeft een groote rol gespeeld in de onderzoekingen, die daarna gedaan werden. Zoowel Zeller's als Neresheimer's werk zijn er sterk door beïnvloed. Metcalf heeft er echter zeer terecht op gewezen (1923, pag. 459), dat cysten met 1 en 2 kernen in het rectum van den volwassen kikker veelvuldig („very common”) kunnen voorkomen.

Zelf vond ik in uitstrijkpreparaten talrijke éénkernige-, maar nog meer 2 kernige cysten. Het viel mij op, dat het deelingsproces bij den eenen kikvorsch verder voortgeschreden was dan bij den

anderen; daardoor werden bij dien eenen dan ook meer éénkernige cysten gevonden. Zeller zag naast éénkernige ook méérkernige. Dat hij meer éénkernige zag is dus niets buitengewoons.

Het is echter niet uitgesloten, dat nog een tweede soorst cysten voorkomt. Neresheimer was de eerste, die cystozygoten beschreef. Hij heeft de echte copulatiestadiën echter niet gezien, zoodat de waarneming van cystozygoten ook met voorbehoud moet worden aangenomen.

Noch Metcalf, Brumt of Bhatia en Gulati (1927) vonden cystozygoten; Brumt sprak zelfs van artefacten.

Wel beschreef Brumt het ontstaan van cysten in den darm van de kikkerlarve.

Hierin begrijp ik hem niet goed. Volgens Br. zouden die cysten morphologisch gelijk zijn aan de cysten uit den volwasen kikvorsch. In een aanmerking onderaan de bladzijde zegt hij: „Les kystes ont été vus chez des têtards, infestés par *O. ranarum*, par Engelmann et par Zeller chez divers têtards”. Dit waren uitsluitend éénkernige cysten. Dan zouden de cysten, die na de „épidémies de division” ontstaan, ook uitsluitend éénkernig zijn, wat met de morphologische gelijkheid niet klopt.

Er is nog iets, dat niet duidelijk is.

Na de beschrijving van deze „épidémies d' enkystement”, noemt Brumt gevallen, waarbij hij deze gezien heeft. „Les têtards de *Rana temporaria* et de *Bufo vulgaris*, âgés de deux mois environ et sur le point de se métamorphoser, présentent presque toujours un certain nombre de kystes d' *Opalina ranarum*”. Dit „certain nombre” klinkt heel anders, veel vager dan encysteringsepidemie, waarbij men een duidelijk verschijnsel verwacht.

In de meeste preparaten trof ik in den beginne meer, later steeds minder, maar nog na weken weleens cysten aan. Al deze cysten waren echter méérkernig, toevallig. Een encysteringsepidemie vond ik nooit. Ook is de mogelijkheid niet uitgesloten, dat de cysten dood waren. Neresheimer wees er reeds op, dat na betrekkelijk korten tijd in water gelegen te hebben, vele cysten afsterven. De vraag, hoelang de cysten infectieus kunnen blijven, dient nader onderzocht te worden. In ieder geval vond ik bij

volwassen- en bijna volwassen kikvorschen de voornaamste periode van cystevorming onmiddellijk na het eierleggen. Zeer jonge kikkers bleken die periode een dag of tien later te hebben. Konsuloff's opvatting, dat de *Opalina's* onafhankelijk zijn van den physiologischen toestand van hun gastheer, zou ik dus niet zoo dadelijk willen onderschrijven.

Konsuloff beschreef daarentegen de cystozygotevorming als een normaal verschijnsel, onmiddellijk na de copulatie. Zooals reeds gezegd, heb ik, om hierover te oordeelen, te laat materiaal verzameld. Wel vond ik nog micro- en macrogameten, maar geen éénkernige cysten.

De door Engelmann waargenomen cysten kunnen misschien tot een van beide categorieën behoord hebben.

Tönniges, Brumpt en Consuloff hebben na de copulatie, sterke vermeerdering door deeling waargenomen. Al is de opgave van Tönniges misschien niet juist, omdat het de vraag is, of hij wel copulatie waarnam, Brumpt's en Consuloff's beschrijvingen laten aan duidelijkheid niets te wenschen over.

Zelf trof ik in al het kikkerlarvenmateriaal, maar nooit bij de allerjongste *Opalina's* slechts een 15-tal deelingsstadiën, bij 9—39-kernige dieren. Een dwarsdeeling, waarbij de ongelijkheid der componenten goed uitkomt, geeft fig. 1.



Fig. 1.

Gezien deze feiten zou ik nog het meest geneigd zijn bij *Opalina* een voortplanting aan te nemen, waarbij na de copulatie de zygoten direct tot volwassen dieren uitgroeien. In dit geval zouden de verschillende stadiën, in den darm van de kikkerlarve, regelmatige groeiverschillen moeten toonen. Immers zullen de larven gedurende eenigen tijd (hoe lang?) steeds nieuwe cysten opnemen, waaruit via gameten en zygoten, de jonge agamonten te voorschijn komen. Men zou dus een regelmatig overgang moeten zien van kleine tot groote dieren.

Tenzij men met Brumpt aanneemt, dat cysten, die in een reeds geïnfecteerde larve terechtkomen, geen gametenvorming meer doormaken, doch direct uitgroeien. Brumpt heeft dit niet kunnen bewijzen. Ik heb meermalen in uitstrijkpreparaten micro- en macrogameten gevonden naast talrijke 10—25-kernige *Opalina*'s. Daarom lijkt mij Brumpt's veronderstelling onhoudbaar.

Bovendien zou men ook een zekere regelmatigheid in de verhouding tusschen de ontwikkeling van den kikker en de groeistadiën van de *Opalina*'s verwachten. Het tegendeel is waar. In 't algemeen kan gezegd worden, dat in zeer jonge larven alleen zeer zeer kleine *Opalina*-stadiën aangetroffen worden; in zeer jonge kikvorschen *Opalina*'s die bijna of reeds heelemaal den vorm der volwassen dieren hebben. Hoe dichter de larven hun metamorphose naderen, des te meer platte, elliptische *Opalina*-vormen zal men aantreffen.

Daarmee is echter ook alles gezegd! Het bleek mij, dat kikkerlarven van gelijke lengte en ontwikkeling, op denzelfden datum onderzocht, zeer sterk in de ontwikkeling der *Opalina*'s konden verschillen. Bij de eene larve waren dikwijls in hoofdzaak zeer kleine stadiën aanwezig, terwijl in de andere veel verder ontwikkelde stadiën waren. In kleinere kikkerlarven werden dikwijls verder ontwikkelde *Opalina*'s gevonden dan in grootere. In één en hetzelfde preparaat bleek het eene deel eerst meer in de breedte te groeien; het andere deel eerst meer in de lengte. Of, in het eene preparaat werden alleen rondachtige vormen, hoe klein ook, aangetroffen; in een ander alleen langgerekte.

Ongetwijfeld zal de physiologische toestand van den gastheer

ook grooten invloed hebben. Dat blijkt al dadelijk, wanneer men dieren onderzoekt, die langeren tijd in aquaria gehouden zijn. Die kikkerlarven blijven in ontwikkeling ten achteren bij de in vrijheid levende (hoewel hun metamorphose erdoor versneld wordt); de Opalina's bleken ook in ontwikkeling achtergebleven te zijn. Daarom moet het materiaal voor onderzoek onmiddellijk na de vangst onderzocht worden.

Een merkwaardig verschijnsel is verder, dat in bijna alle preparaten van jonge kikkerlarven, een kleiner of grooter aantal stadiën voorkomt, dat al ver ontwikkeld is en reeds een breeden vorm en een groot aantal kernen heeft.

De hier genoemde verschijnselen kunnen alleen verklaard worden door een gecompliceerde voortplanting aan te nemen.

Deelingen na de zygotevorming, bij de eene larve eerder of intenser optredend dan bij een andere, zouden eenige verschijnselen kunnen verklaren. Zulke deelingen heb ik echter nooit waargenomen.

Het onderzoek van Brumpt, zoowel als dat van Konsuloff, verklaren het geregeld voorkomen van veel verder ontwikkelde stadiën. Volgens Brumpt zouden deze verschillen in de grootte der stadiën echter pas na verloop van tijd, na een encysteerings-epidemie, kunnen optreden. Volgens Konsuloff daarentegen reeds vrij spoedig door de waargenomen directe ontwikkeling, zonder gametenvorming, van een deel der cysten uit den kikvorsch. Konsuloff's waarnemingen zijn dan ook meer in overeenstemming, met wat ik in de preparaten van jonge kikkerlarven zag.

Hoe het komt, dat alle *Rana esculenta*-larven, die ik verzamelde, alleen geïnfecteerd waren met *O. ranarum*, moet voor mij nog een open vraag blijven. Het opperen van mogelijkheden zou slechts een werken met onbekende factoren zijn. Zelfs is, in een dichtbevolkte streek als rondom Utrecht, een louter toeval of kunstmatig ingrijpen niet uitgesloten.

Brumpt en Konsuloff nemen beiden aan, dat directe ontwikkeling uit de cyste mogelijk is. Wanneer Metcalf's interpretatie van de reductieverschijnselen in het aantal der chromosomen bij *O.*

intestinalis juist is en hetzelfde bij *O. ranarum* plaats vindt, zoodat dus vóór de encysteering in den kikkerdarm reeds een reductie op de helft van het aantal chromosomen bij de dieren, die zich gaan encysteeren, heeft plaats gehad, zullen volgen beide onderzoekers dus 2 rassen van *O. ranarum* in één kikkerlarve kunnen voorkomen, met het halve- en met het heele aantal chromosomen. Het is gemakkelijk te zien, hoezeer verschillende larven in de verhouding tusschen deze 2 groepen zouden kunnen variëren.

Dit vraagstuk moet nauwkeurig onderzocht worden! Een dergelijk verschil zal immers ook tot uiting kunnen komen in de wijze van ontwikkeling van het individu. Waarom encysteert in 't voorjaar een gedeelte van de *Opalina*'s zich, het andere deel niet?

Kan het genoemde verschil zich ook openbaren in de zeer groote verschillen, die men in de ontwikkeling van dieren in hetzelfde preparaat aantreft?

Hegner en Hsiang-Fong Wu (1921) constateerden bij *O. larvarum* verband tusschen de grootte van het dier en het aantal der nuclei. Toenamen van dat aantal gingen gepaard met afname in volumen en oppervlakte van iedere kern. Engelmann en Metcalf namen dit laatste ook waar bij *O. ranarum*.

Hiermede kan ik het niet heelemaal eens zijn. Fig. 2 en 3 geven

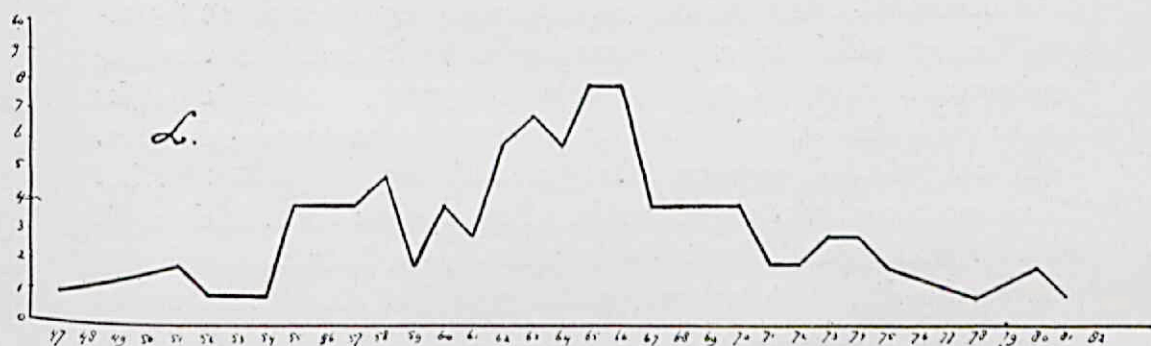


Fig. 2.

de uitkomsten van een meting van 100 zeskernige stadiën uit 20, natuurlijk op gelijke wijze behandelde, uitstrijkpreparaten.

Voor de lengte vormen 16 exemplaren den top; voor de breedte 22. In de lengte blijkt ook minder regelmaat te zijn.

Hierbij is geen rekening gehouden met de grootte der kernen.

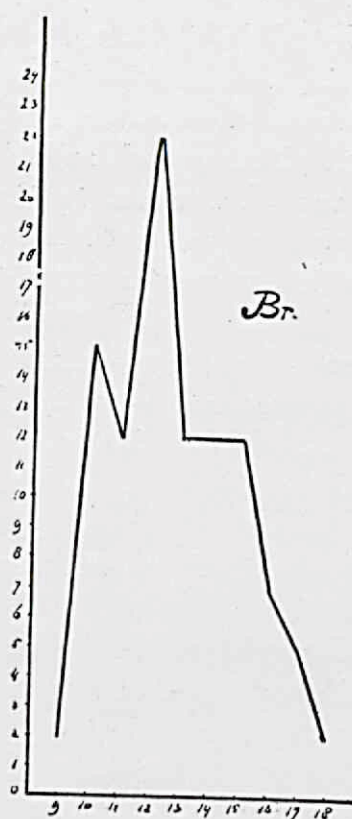


Fig. 3.

Hoezeer deze kan verschillen, toonen de fig. 4 en 5, uit 2 verschillende, willekeurige, op dezelfde wijze behandelde, uitstrijkpreparaten. (Contrasten, als hier weergegeven, werden in gelijke mate gevonden bij verschillende fixatiemethoden: osmiumdampen, sublimaat-alcohol, gewoon indrogen e.a.) Natuurlijk bestaat het heele preparaat niet uit dergelijke vormen, maar zocht ik deze uit om de groote verschillen te doen uitkomen, die kunnen optreden in de verhoudingen tusschen grootte van het dier, vorm, aantal kernen en grootte der kernen. Fig. 4 b en 4 i toonen 2 dieren, waarvan het grootste toch een kleiner aantal kernen heeft. Dit is ook bij fig. b. en h. het geval. In fig. i, j, k. en l, hebben de dieren ongeveer dezelfde grootte; aantal en grootte der kernen geven echter opvallende verschillen. Bij een gelijk aantal kernen kunnen en de vorm en grootte van het dier en die der kernen zeer verschillen; fig. k, f en j; fig. b en e; fig. m en n, en fig. h, a en c.

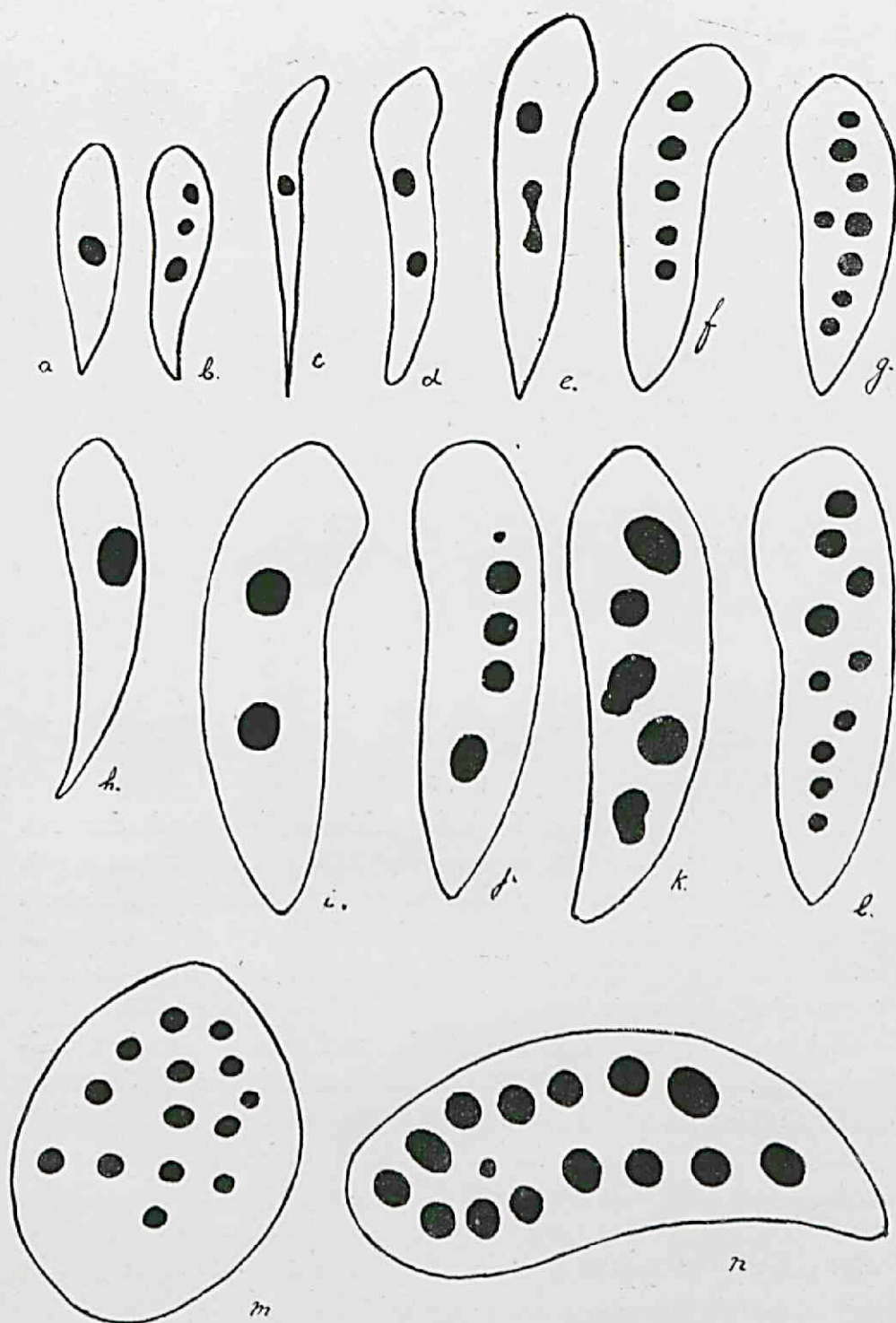


Fig. 4.
Gewoon ingedroogd; kal. bichromaat; alcoholreeks; Heidenhain.

Er blijkt een onregelmatigheid te zijn in het moment, waarop het kerndeelingsproces begint. Soms gaat een sterke kerndeeling aan het uitgroeien vooraf (fig. g); in andere gevallen blijft zij bij dien

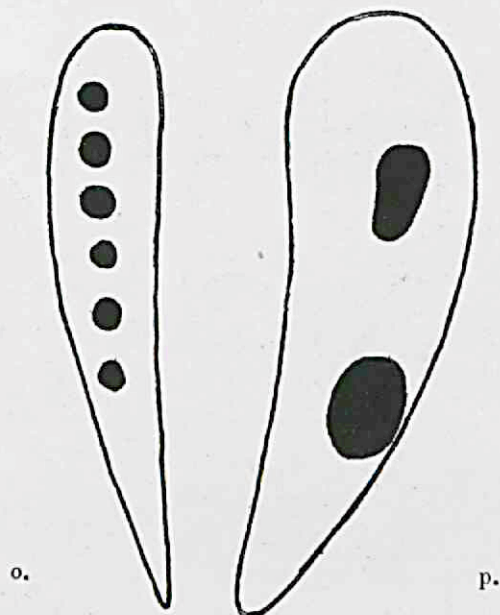


Fig. 5.

groeit ten achter (fig. i en 5 p). In vele gevallen treedt dan een kernvergrooting op (fig. i en 5 p). Deze kernvergrooting is echter ook bij veelkernige stadiën te zien (fig. n). Alleen Metcalf (1909, pag. 293) heeft „peculiar nuclei, oh huge size” beschreven en afgebeeld (fig. 222—227), uitsluitend in éénkernige stadiën, vermoedelijk syncaria.

Reichardt (1927) onderzocht de verhouding tusschen celvolumen en kernvolumen bij *Kentrosphaera*. Hij zegt daarover: „Wo die Kernvermehrung hinter den Zellwachstum zurückbleibt, zeichnen sich die Kerne im allgemeinen durch ihre besondere Grösze aus. Wir dürfen also wohl auf ein ziemlich konstantes Verhältnis des Zellvolumens zum gesamtkernvolumen schliessen.” Fig. 4 b en e, i en k toonen duidelijk, dat dit bij *O. ranarum* niet altijd het geval behoeft te zijn; ik kan mij deze kernvergrootingen dan ook niet verklaren.

In fig. 4 j en n bevinden zich kleine ronde lichaampjes. In de

coupe's door jonge stadiën vond ik het bewijs (fig. 6), dat zij door degeneratie van de kernen ontstaan. Metcalf (1923) geeft in fig. 98 f een dergelijk geval van kerndegeneratie bij *Zelleriella*.

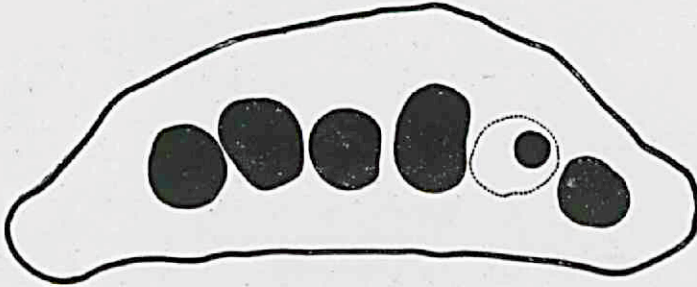


Fig. 6.
Flemming; Heidenbain.

Bij oudere *Opalina*'s zag ik dikwijls kernen op een eigenaardige manier uiteenvallen. In fig. 7 ziet men 2 kernen, waarbij in de eene de kernmembraam nog aanwezig is; bij de andere daarentegen reeds verdwenen. Vermoedelijk is dit het werk van kernparasieten.

Wanneer *O. ranarum* een even gelijkmatigen groei had, als voor *Paramaecium caudatum* door Mizuno (1927) beschreven is zou het mogelijk zijn het verband tusschen groei en ontwikkeling (differentiatie) geleidelijk na te gaan. Nu is dat slechts in grovere trekken mogelijk.

Op plaat I heb ik de verschillende opvattingen over de voortplanting van *O. ranarum* naast elkaar afgebeeld. De m.i. onzekere punten zijn daarin donker aangegeven, of door een vraagteken. Achter iedere kikkerlarve is het proces afgebeeld, hetwelk zich, volgens een bepaalde meening, in haar darm voltrekt. Deze darm is als een buisje geteekend. Het eindstadium ligt in den pas gemetamorphoseerden jongen kikvorsch. Het snelle deelingsproces, waardoor uit grotere *Opalina*-vormen cysten of uit cystengameten ontstaan, heb ik door een sterk gegolfden pijl aangegeven; uitgroeien alleen door een rechten pijl; uitgroeien met toch daarbij plaatshebbende, veelvuldige deelingen, door een combinatie van deze twee.

Het beeld van de voortplanting, zooals Konsuloff zich deze voorstelt, heb ik met mijn eigen waarnemingen gecombineerd.

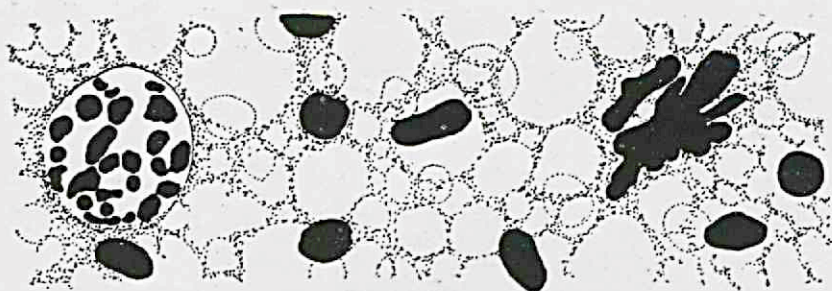


Fig. 7.
Flemming; Heidenhain.

Zooals reeds gezegd, stamde mijn materiaal uit een periode, waarin de gametenvorming en copulatie in hoofdzaak afgeloopen waren. Het kan dus zijn, dat ik de cystozygotevorming gemist heb. De beginstadiën zijn daarom gearceerd aangegeven.

Een toestand, zooals bij a' wordt aangegeven heb ik dikwijls aangetroffen bij jongere-, evenals dien bij a'' bij oudere larven. Daarbij heeft een deel der *Opalina*'s dus reeds eenigszins den vorm van de oude dieren. Dit heeft Konsuloff nooit gezien. De grootste stadiën, die hij in den larvedarm aantrof, waren niet grooter dan het grootste van a', van de direct uitgroeide vormen. Deze bereikten die grootte reeds den 4en dag na de infectie. Nog afgezien van het feit, dat ik veel grootere, platte, elliptische stadiën reeds in kikkerlarven aantrof, lijkt mij Konsuloff's voorstelling, dat de dieren dus na dien 4en dag niet meer zouden groeien, onwaarschijnlijk.

Een toestand als bij a, door hernieuwde encysteering, volgens Brumpt dus optredend bij veel oudere larven, heb ik nooit gevonden.

Summa summarum lijkt mij de voorstelling, die Konsuloff van de voortplanting van *O. ranarum* geeft, in enkele ondergeschikte punten gewijzigd (het voorkomen van grootere vormen en geen hernieuwde deelingen), degene, waarbij ik mij, volgens mijn eigen waarnemingen, meen te moeten aansluiten.

Ik stel mij de voortplanting en ontwikkeling van *O. ranarum* dus als volgt voor:

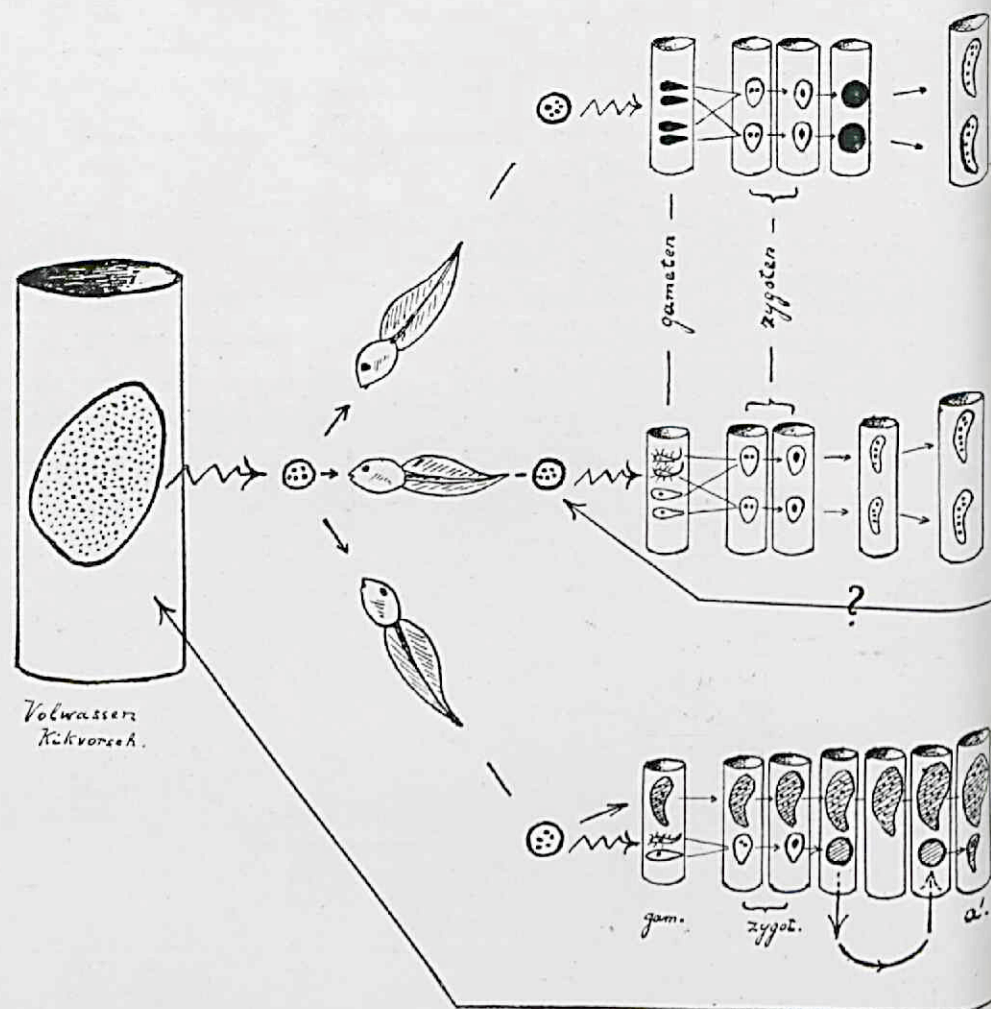
Een deel der cysten, door de kikkerlarve opgenomen, zal, zonder gametenvorming, direct uitgroeien; het andere deel vormt

gameten, die copuleeren, waarna de zygoten zich encysteeren. De zoo gevormde cystozygoten worden uitgestooten, maar ook dadelijk weer door dezelfde- of andere kikkerlarven met het voedsel opgenomen, waarna éénkernige Opalina's in den darm van die larven uit de cystozygoten kruipen.

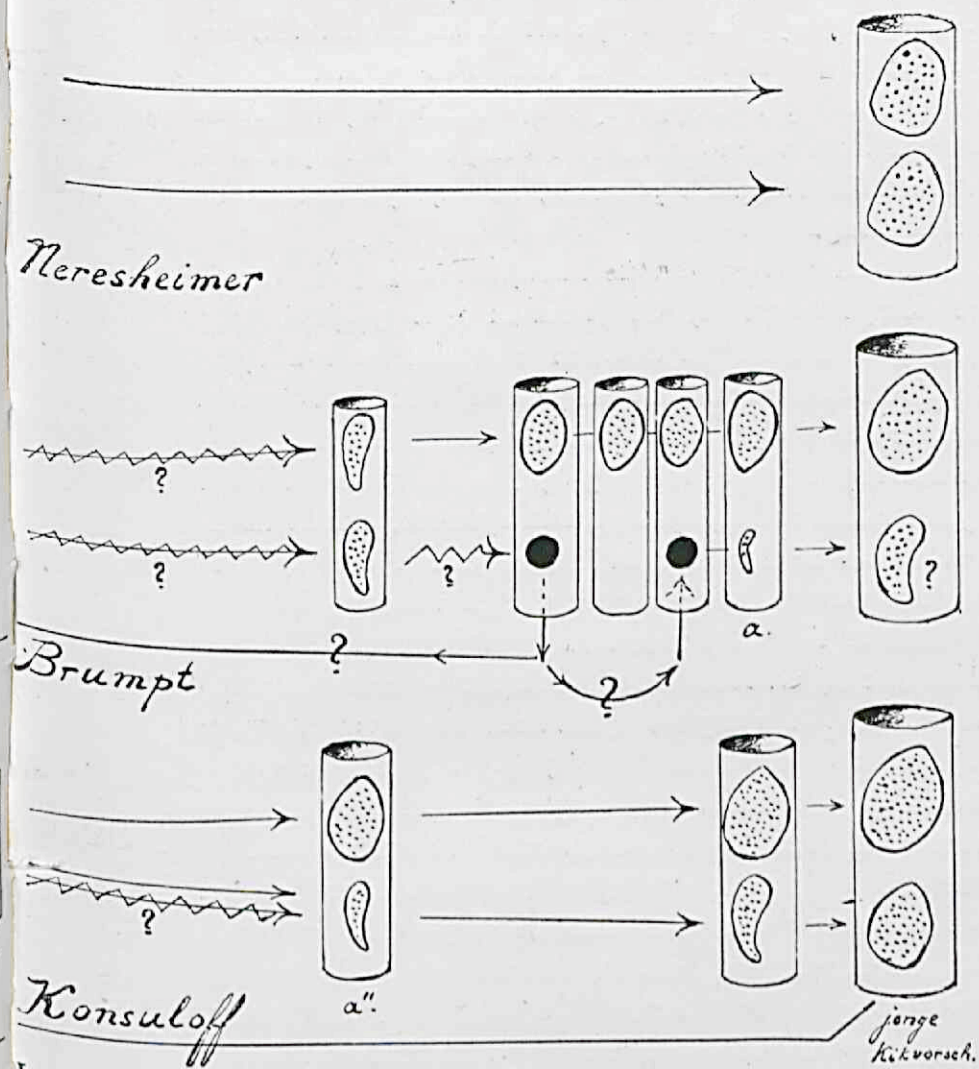
Bij jonge larven, die pas kort geïnfecteerd zijn, zal men dus ver uit elkaar liggende ontwikkelingsstadiën aantreffen. Een dergelijk verschil, na zoo'n korten tijd, is alleen mogelijk door verschil in de ontwikkeling der cysten.

Alleen de jonge kikkerlarven kunnen hierin echter uitsluitel geven; oudere larven niet meer.

De Opalina's groeien na het uitkomen uit de cysten in het eene-, na het komen uit de cystozygoten in het andere geval langzamerhand uit tot de gewone platte, elliptische vormen. Deze zijn in den pas gemetamorphoseerden kikvorsch nog veel kleiner dan in de oudere dieren. Bij dat uitgroeien komen deelingen niet veel voor.



PLAAT I.



VI. *Welke deelen van O. Ranarum hebben een vormbehoudende functie?*

Het antwoord op de vraag, hoe *O. ranarum* zijn vorm behouden kan, moet noodwendig opgebouwd zijn uit de resultaten van het morphologisch onderzoek. Dit dient dus vooraf te gaan.

Zooals in de inleiding reeds gezegd is, kunnen bij Protisten verschillende deelen als vormbehoudende componenten optreden; bij *Opalina* komen daarvoor de pellicula, het cytoplasma en de fibrillen in aanmerking.

Het onderzoek van dieren, die in leeftijd verschilden, leerde mij, dat deze componenten bij *O. ranarum* niet gelijkwaardig zijn; zoowel de pellicula als de fibrillen ontstaan uit het cytoplasma, met dit verschil echter, dat de pellicula een permanente, de fibrillen slechts een temporeaire vorming zijn.

Verder zou het onjuist en onvolledig zijn, in de quaestie, waar het hier om gaat, alleen van de pellicula te spreken, omdat daarmee bij *O. ranarum* slechts een onderdeel, alleen de buitenste laag, genoemd zou worden van een der deelen van het dier, die een vormbehoudende functie zouden kunnen hebben. Dit deel, dat alles omvat, wat bij *O. ranarum* als ectoplasmatisch kan worden aangemerkt, heb ik ectoplast genoemd, in navolging van Bretschneider (Ihle en Nierstrasz, 1928, pag. 48), die daaronder het ectoplasma met al zijn differentieeringen en erin voorkomende organoïden samenvat. Den naam „ectoplasma” tegenover de rest van het dier als „endoplasma”, een indeeling, reeds door Haeckel (1873) in het algemeen voor de Ciliaten uitgewerkt en door Bütschli (1887) overgenomen, heb ik daarom speciaal niet gebruikt om verwarring te voorkomen. De meeste onderzoekers, die over *Opalina* gewerkt hebben, beschreven immers ook dieper liggende lagen, tot het endoplasma behoorend (zooals blijken zal), als ectoplasma.

Haeckel beschreef het ectoplasma („Rindensubstanz” of „exoplasma”) als een oorspronkelijk homogene, structuurlooze laag, waaruit door secundaire differentiatie een cuticulaire, ciliën-, myophaan- en trichocystenlaag konden ontstaan. Alleen de ciliën-

laag werd daarvan bij alle Ciliaten steeds aanwezig geacht. Deze „exoplasma“-laag is later onder verschillende namen beschreven, waarvan ik alleen wil vermelden, dat Calkins (1926, pag. 144) haar „cortex“ noemde, waarbij niet alleen de naam, maar ook de omschrijving in hoofdzaak overeenkomt met Haeckel's „Rindensubstanz“ of „exoplasma“. De naam „cortex“ lijkt mij echter minder gelukkig gekozen; in ieder geval minder zeggend dan exoplasma, ectoplasma of ectoplast.

Bij *O. ranarum* zal het onderzoek dus moeten lopen over den ectoplast en over het endoplasma of endoplast en de fibrillen.

A. De ectoplast.

De interpretatie, die Haeckel aan de verschillende lagen gegeven heeft, maar vooral de mogelijkheid van secundaire differentiatie, zijn later scherp becritiseerd (Maupas, 1883). Al moge de interpretatie niet goed zijn, de waarnemingen van Haeckel, wat betreft de ectoplasmatische lagen, zijn althans voor *O. ranarum* juist. Een trichocystenlaag is bij deze soort echter niet aanwezig. De omschrijvingen van zijn cuticulaire-, ciliën- en myophaan-lagen (pag. 533—535), zou ik dadelijk kunnen overnemen voor de 3 lagen, waaruit de ectoplast van *O. ranarum* opgebouwd is: de pellicula, de daaronder gelegen dunne ectoplasmalaag, waaruit de ciliën hun oorsprong nemen, en de dunne dwarsgestreepte laag, die aan het endoplasma grenst. Alleen de pellicula is duidelijk afgescheiden van de er onder liggende laag; de beide volgende lagen gaan onmerkbaar in elkaar over; de dwarsgestreepte ook in den endoplast.

Het is natuurlijk de vraag, of bij *O. ranarum* een pellicula, „im Sinne Bütschli's," voorkomt. Een alveolaire laag is niet aanwezig en waar de plaats, die *Opalina* in het systeem der Protozoën inneemt, nog onzeker is, is het dus moeilijk te zeggen, of die alveolaire laag wel bij *Opalina* weggevallen en alleen de buitenste lamel, waaraan Bütschli den naam „pellicula“ gaf, gebleven is. Maier (pag. 80) heeft geen alveolaire laag kunnen constateeren; slechts een vergelijking met andere Ciliaten bracht

hem ertoe de buitenste ectoplasmalaag als pellicula- en alveolairlaag samen op te vatten. Kölsch (1902) heeft zich pertinent voor het aanwezig zijn van een alveolairlaag uitgesproken en wel op grond van verschijnselen, die hij bij het vervloeien van *Opalina*, onder abnormale omstandigheden, zag optreden. De uit het dier tredende, steeds grooter wordende en eindelijk loslatende druppels, zouden ieder den gezwollen inhoud van een alveole van de alveolairlaag voorstellen, omgeven door de vervloeiende pellicula; van het meer binnenwaarts gelegen plasma afgesloten door de binnenlamel van de alveolairlaag, welke eerst later verdween, waarna ook het plasma naar buiten kwam. Deze vervloeingsverschijnselen heb ik dikwijls waargenomen; dergelijke druppels treden echter ook uit, wanneer men de pellicula met den micromanipulator doorsnijdt. Zij vormen het vloeibare gedeelte van het plasma, het enchylema. Voor het bestaan van een alveolairlaag kunnen zij niet als bewijs gelden. Ook Schneider (pag. 50) ontkenste het voorkomen van een dergelijke laag bij *Opalina*; Tönniges (1919, pag. 34) spreekt daarentegen weer over een „unter der Pellicula liegende Alveolarschicht”.

De pellicula verliest hier dus zijn morphologische waarde en wordt een topographisch begrip. Waar de buitenste laag bij *Opalina* echter door de meeste onderzoekers pellicula genoemd is, is het beter deze benaming onder de noodige restrictie te handhaven. De beteekenis van het pelliculabegrip is trouwens reeds geheel veranderd. Tegenwoordig beschouwt men de, zich in geltoestand bevindende, oppervlakte van het ectoplasma als zoodanig; Hartmann (1925, pag. 87) zegt: „Die Gelatinierung der Oberfläche, die Pelliculabildung, ist bei den verschiedenen Formen verschieden stark”.

Reeds Engelmann constateerde bij *O. ranarum* een betrekkelijk dikke „cuticula”; ongetwijfeld bedoelde hij daarmee de pellicula.

Zeller vond geen cuticula, maar een membraan, bestaande uit „muskulösen Fasern”, door verdund azijnzuur van elkaar te isoleren. Deze banden zijn ongetwijfeld de tusschen de ciliëngroeven gelegen, deelen van de pellicula, waar Bütschli ook reeds op wees (pag. 1263); misschien ook wel van den geheelen ectoplast.

Maier ontdekte de, longitudinaal verloopende, pelliculalijsten, waaraan hij echter een oppervlakkige dwarsstreping meende te zien.

Metcalf (1909, pag. 211) zag deze lijsten in tangentiale, zeer flauw slechts in dwarscoupe's van *O. intestinalis*. De, door Maier waargenomen, dwarsstreping interpreteerde M. als een dieper gelegen fibrillennet, de basaalkorrels der verschillende ciliënrijen onderling verbindend.

Door Konsuloff zijn deze lijsten als myonemen opgevat (pag. 295), die dus volgens hem in de pellicula zouden liggen. Reeds ten Kate (pag. 4), heeft er op gewezen, dat myonemen nooit in de pellicula liggen.

Kölsch liet een galvanischen stroom op *Opalina* inwerken. Op pag. 409 zegt hij: „Nie zeigt *Opalina* Spuren von Contraction". Dit pleit zeker tegen het aanwezig zijn van myonemen.

Ook zou ik Konsuloff's opvatting, dat de pellicula, gezien de bewegingen van het dier, myonemen bevatten móet, direct willen tegenspreken. Alles wijst er op, dat de dieren omgeven zijn door een zeer elastische membraan, die slechts passief kan reageeren. Buigingen van het lichaam kunnen door de beweging der ciliën alléén ook heel goed verklaard worden.

Beelden, als in fig. 3 en 4, Taf. 12, door K. weergegeven, zijn mij, bij de vele honderden onderzochte dieren, nooit onder de oogen gekomen. Ook K. heeft slechts een dieper gelegen dwarsstreping gezien, een „quergestreifte Membran".

Ten Kate (pag. 6) hield de longitudinale lijsten voor pellicularichels, evenals Maier dus. Hij zag de ciliën echter uit zulke lijsten, niet uit groeven te voorschijn komen (fig. 4). Hierin heeft hij zich vergist, zooals blijken zal. Uit zijn figuur 1 blijkt, dat hij de dwarsstreping ook opgevat heeft als een, de basaalkorrels verbindend, fibrillennet.

Opmerkelijk is het geringe aantal longitudinale lijsten, die zowel ten Kate als de andere onderzoekers, tusschen de ciliënrijen, afgebeeld hebben, terwijl de dieren, zelfs in jongen toestand, er toch meerdere hebben. Dit is duidelijk in fig. 8 te zien, waarmede ik tevens op de resultaten van mijn eigen onderzoek gekomen ben.

De pellicula van *O. ranarum* bestaat uit een dunne, oppervlakkig gelegen, niet dubbelbrekende laag van vast ectoplasma, alleen doorboord door de ciliën, die op meer of minder regelmatige afstanden, al naar den leeftijd van het individu, uit ondiepe groeven te voorschijn komen (fig. 37). Maier heeft in fig. 1c die groeven te weinig diep aangegeven. Dat zij werkelijk een weinig dieper liggen, blijkt uit fig. 8, een oppervlakkige, tangentielle coupe, waarbij slechts de

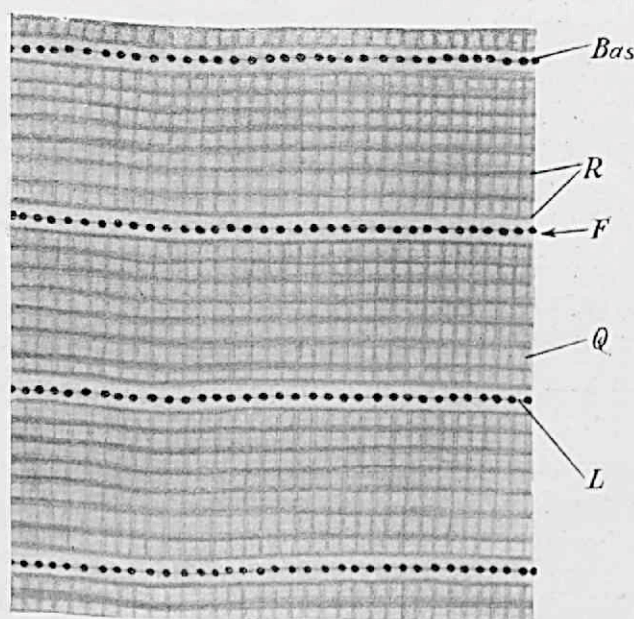


Fig. 8.

Tangentiale-oppervlakte coupe. Flemming; Heidenhain.

Bas, basaalkorrel, F, ciliëngroef, L, lijst, Q, dwarsband, R, richel.

ectoplast getroffen is. Men ziet de groeven (F) duidelijk als lichte strepen door het preparaat loopen. De pelliculabanen tusschen de ciliënrijen zijn versterkt met longitudinale, evenwijdig aan elkaar verloopende richels (R), waarvan het aantal niet constant is. Dit aantal blijkt afhankelijk te zijn van den leeftijd van het dier, van het groeiproces en van het deelingsproces vóór de cystevorming.

Over dien groei van de pellicula, een noodzakelijkheid voor het grooter worden van het dier, heb ik geen opgaven in de literatuur kunnen vinden. Hoe verloopt die groei?

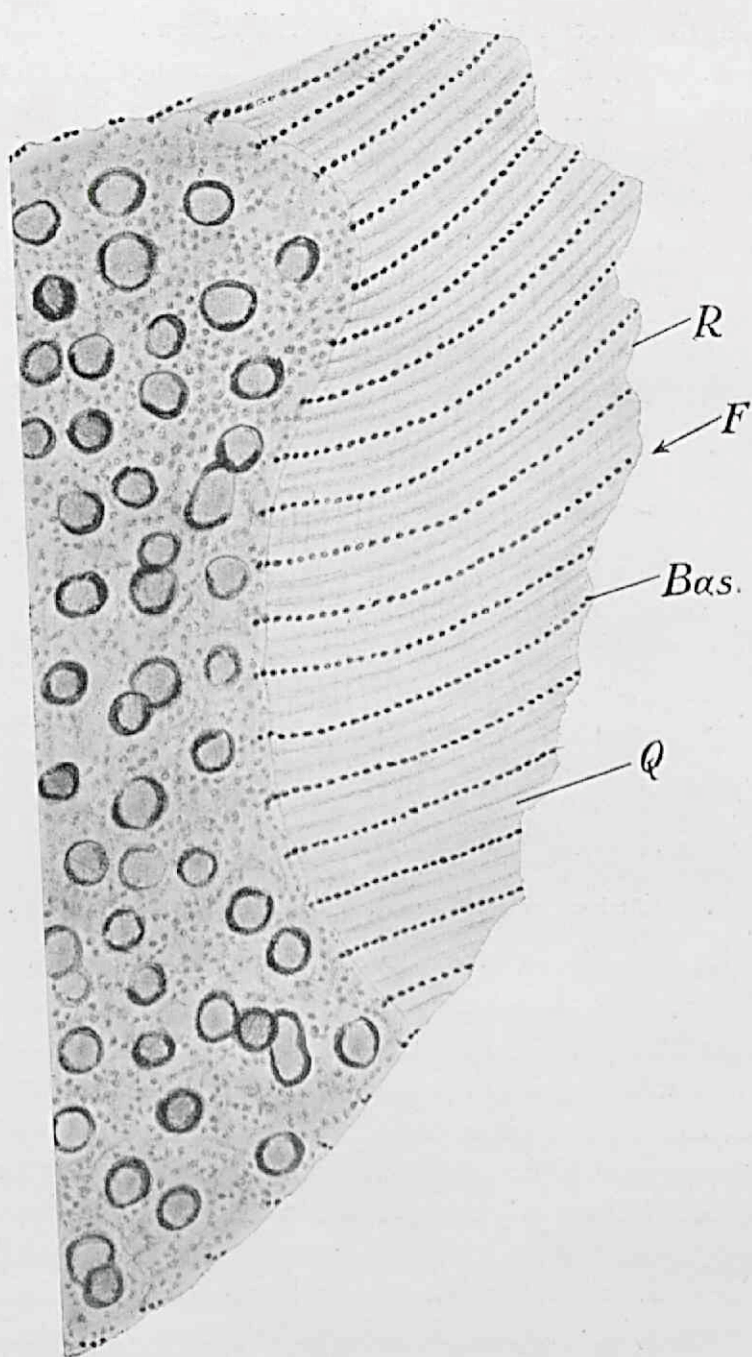


Fig. 9.
 Dwarscoupe. Flemming; Heidenhain.
 Bas. basaalkorrel, F. ciliëngroeve, Q. dwarsband, R. richel.

Hiervoor moet men dieren van verschillenden leeftijd en grootte onderzoeken. In fig. 9, een schuine dwarscoupe van een jong stadium, loopen 2 richels op het midden van de pelliculabaan. Dit is het kleinste aantal, dat ik vond. De ciliëngroeven zijn hier nog niet door richels geflankeerd, zooals bij oude stadiën het geval is (fig. 8). Ook fig. 10 stelt een jong stadium voor; de groeven zijn hier door een krimpen van het preparaat, minder duidelijk.

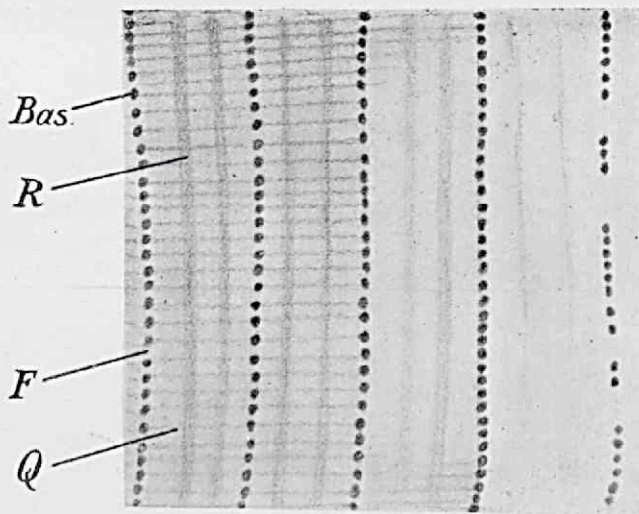


Fig. 10.
Tangentiale-oppervlakte coupe. Kal. bichromaat; alcoholreeks.
Heidenhain.
Bas. basaalkorrel, F. ciliëngroef, Q. dwarsband, R. richel.

Hoe ontstaat uit deze jonge stadiën een toestand als bij het oude dier, waar zich 6—8 richels tusschen de ciliëngroeven bevinden?

In fig. 11 zijn verschillende groeistadiën, in dezelfde verhouding vergroot, naast elkaar voorgesteld. 1—4 stellen groeistadiën voor, van jong tot oud; 5 een stadium bij het begin der cystevorming. Bij den groei blijken de zone's tusschen de richels zich te vergrooten; tegelijk worden in die zone's nieuwe richels gevormd, waardoor deze dichter bij elkaar komen te liggen (2). Het uitgroeiingsproces gaat echter voort; de afstand tusschen de richels wordt weer grooter, zoodat tenslotte de volwassen toestand bereikt wordt (4). Ondertusschen ontstaan echter 1, soms zelfs 2 nieuwe ciliënrijen tusschen de reeds aanwezige. De pellicula-banen tus-

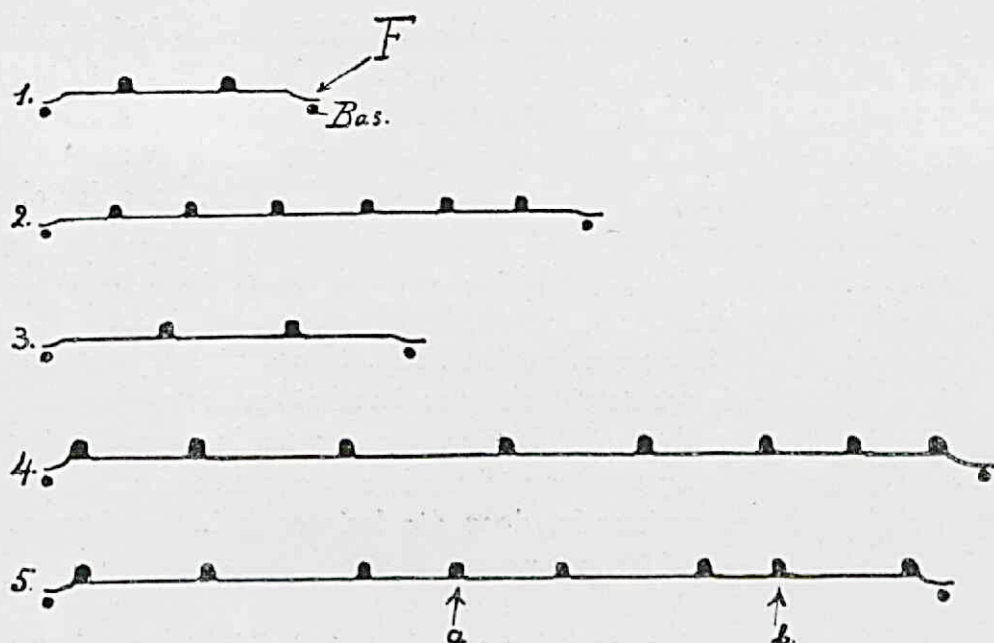


Fig. 11.

schen 2 ciliënrijen worden dan natuurlijk smaller (3). Op dezelfde wijze, door groei der zone's met nieuwe richelvorming, worden daarna zulke banen weer breeder. Het is een continu proces, totdat de volwassen toestand bereikt is.

Bij het cystevormingsproces, waarbij de dieren, door snel op elkaar volgende deelingen, steeds kleiner worden, ontstaan nieuwe richels (5, a en b), waardoor de afstanden tusschen deze kleiner worden. Door het ontstaan van nieuwe ciliënrijen worden de pellicula-banen steeds smaller. Het uitgroeiingsproces der zone's blijft achter bij deze richel- en ciliënrij-vorming, waardoor stadiën ontstaan, die met de jonge vormen overeenkomen.

Bij de levende *Opalina* kan men de pellicularichels, alleen met donkerveldbelichting, buitengewoon mooi zien.

Onder de pellicula bevindt zich de homogene plasmalaag, waarin, op de grens met de 3e laag, de basaalkorrels der ciliën liggen. Deze „Wimperschicht” van Haeckel, door Bütschli en Maier tot het corticaalplasma gerekend, is door latere onderzoekers van *Opalina* vrijwel genegeerd. Metcalf (1909, pag. 211) heeft over

„a thin layer of finely alveolar protoplasma”, „immediately beneath the pellicula”, gesproken. In het buitenste deel van deze laag zag hij de basaalkorrels liggen. Daaruit blijkt, dat M. met die laag niet de Bütschli'sche alveolairlaag bedoeld kan hebben, maar de buitenste laag van het endoplasma volgens Haeckel en ook volgens mijn eigen onderzoek, welke M. en met hem Maier, Konsuloff en ten Kate nog tot het ectoplasma rekenen. Zeller vond onder de pellicula „völlig homogenen, glashellen Protoplasma”; daar hij de gestreepte laag echter niet gezien heeft, is het niet te verwonderen, dat hij geen aparte ciliënlaag onderscheiden heeft.

De streping, die deze ciliënlaag vertoont, waardoor verwarring met een alveolairlaag ontstaan is, vindt zijn oorzaak in de ciliën, die vanuit de basaalkorrels, door die laag naar buiten lopen. Reeds meermalen is hierop gewezen.

Dat de binnenste laag van den ectoplast werkelijk dieper gelegen is dan de pellicula en de basaalkorrels, kan uit fig. 10, een tangentiale, de pellicula onder een zeer scherp hoek snijdende, coupe blijken.

Over deze laag bestaan 2 verschillende meeningen, die enorm van elkaar afwijken. Terwijl een deel der onderzoekers, waarvan Haeckel de eerste was, deze laag contractiel noemden, hebben anderen de streping als een fibrillennet beschouwd. Konsuloff sprak over een gestreepte membraan zonder meer. Haeckel heeft deze laag „Myophanschicht” genoemd, waarbij hij het begrip „Myophan” invoerde voor „differenzirte contractile Sarcodenzüge”. H. beschouwde deze laag dus als contractiel. Ook Calkins (pag. 144) noemt als een van de lagen van den cortex: „a contractile zone containing the basal bodies of cilia, myonemes and coördinating fibers”.

Tönniges, Metcalf en ten Kate hebben zich zeer positief voor een fibrillennet uitgesproken; Tönniges (1898, pag. 130) voor een contractiel fibrillennet, waardoor de ciliënbeweging tot stand zou komen; Metcalf (1923, pag. 8) voor een netwerk van neurofibrillen en ten Kate (pag. 12) voor een steunfibrillensysteem.

Wie van deze onderzoekers heeft gelijk?

Het is mij niet mogelijk geweest een contractiliteit voor deze laag te bewijzen. Zooals ik reeds eerder gezegd heb, zag ik een *Opalina* nooit anders dan passief reageeren, de bewegingen der ciliën uitgezonderd.

Wel gaf het onderzoek mij aanleiding om het bestaan van een steun- of neurofibrillensysteem te ontkennen. Ongetwijfeld maakt het sterk den indruk, dat de tegenover elkaar liggende basaalkorrels van parallel verloopende ciliënrijen onderling verbonden zijn. Bij het levende dier is de dwarsstreping goed te zien; bijzonder mooi met donkerveldbelichting, waarbij ook de basaalkorrels duidelijk zichtbaar zijn. Daarbij ziet men echter de basaalkorrels en dwarsstrepingen of dwarsbanden, zooals ik deze noemen zal, als afzonderlijke componenten. Uit fig. 8 blijkt, dat er geen verbinding tusschen de tegenover elkaar liggende basaalkorrels bestaat. In deze figuur zijn de onderste, rechte, dicht bij de basaalkorrels afgesneden deelen der ciliën echter niet geteekend, ter wille van de duidelijkheid. Wanneer deze ciliënstukken in het verlengde van de dwarsbanden liggen, lijkt het, of verbindingen bestaan. Hierdoor kan men zich gemakkelijk vergissen.

Wel zijn de basaalkorrels van iedere rij onderling door een nauwelijks zichtbare lijst of fibril verbonden (L). Ten Kate heeft deze reeds als fibril beschreven en afgebeeld (fig. 3, pag. 8). Ook Klein (1926) kon met een nieuwe verzilveringsmethode bij *O. ranarum* een dergelijke verbinding tusschen de basaalkorrels aantoonen, reden, waarom hij zich voor een prikkelgeleidende functie uitsprak.

Schuberg (1905) vond bij *Paramaecium* en *Frontonia* een verbinding tuschen de, op rijen liggende, basaalkorrels; hij heeft daarbij zeer terecht opgemerkt, dat zich slechts vermoedens over de functie van dergelijke verbindingen laten uitspreken en dat het geen zin heeft namen te geven, waarvan men de beteekenis niet kan toetsen. Ook Bělár (1921, pag. 442) heeft zich in dien zin uitgesproken.

Zeer duidelijk is de verbinding bij jonge *Opalina*-stadiën te zien, waar de basaalkorrels nog op grooteren afstand van elkaar liggen (fig. 12 en 13). Als een overtuigend bewijs, dat de dwars-

banden geen fibrillair netwerk voorstellen, beschouw ik het zeer jonge stadium, waarvan het posterieure deel in fig. 12 afgebeeld is. Daaruit moet men wel den indruk krijgen — het beeld spreekt voor zichzelf — dat de dwarsbanden, welke beteekenis zij ook mogen hebben, geen fibrillen tusschen de basaalkorrels zijn. Zij blijken in bepaalde velden gerangschikt te zijn, door ongestreepte banen van elkaar gescheiden, waarin ciliënrijen vanuit de anterieure pool van het dier gevormd worden. Hoe zou men zich de „nervous function of coördination of the movements of the cilia” (Metcalf, 1923, pag. 8) moeten voorstellen bij een zoodanig verspreiden ciliënstand? Tevens blijken de basaalkorrels, die in die banen ontstaan, alleen verbonden te zijn met de basaalkorrels van dezelfde rij, niét door dwarsverbindingen. De genoemde banen zijn natuurlijk identiek met de ciliëngroeven.

Niet alle ciliënrijen ontstaan echter op deze wijze. In fig. 12 is duidelijk te zien, dat zij ook midden in de dwarsgestreepte velden gevormd worden, waarbij de basaalkorrels zich in of boven een dwarsband vormen. De ciliëngroeven ontstaan pas daarna, dus secundair.

Hierbij ben ik gekomen op het vraagstuk der basaalkorrelvorming. Het valt buiten de bedoeling van dit onderzoek de verschillende theorieën, die daarover bestaan, hier te bespreken. In hoofdzaak zijn 3 meeningen te onderscheiden: een vorming in verband met een kernlichaam of kernsubstantie; een vorming uit mitochondriën of chondrioconten en een ontstaan uit het plasma op de plaats zelve.

Tönniges (1919, pag. 45, fig. 11-13) is de eenige, die de vorming der basaalkorrels bij *O. ranarum* onderzocht heeft. Uit zijn beschrijving en figuren blijken deze basaalkorrels te ontstaan uit „junge Chromidialsubstanz”, welke bij de jonge *Opalina* uit den micronucleus in het plasma gestooten wordt. Na verloop van eenigen tijd zag hij deze chromidiaal massa zich van de kern afsnoeren, waarbij die z.g. macrochromidiën dus los in het plasma kwamen te liggen, evenwel blijvend met de basaalkorrel verbonden door een fibril.

Dit onderzoek van Tönniges moet ik in alle opzichten tegen-

spreken; mijn eigen preparaten laten daarover aan duidelijkheid niets te wenschen over. Ik kan de preparaten van Tönniges dan ook niet anders dan als artefacten beschouwen. Zoowel fig. 12 als fig. 13 doen zien, dat de basaalkorrels gevormd worden

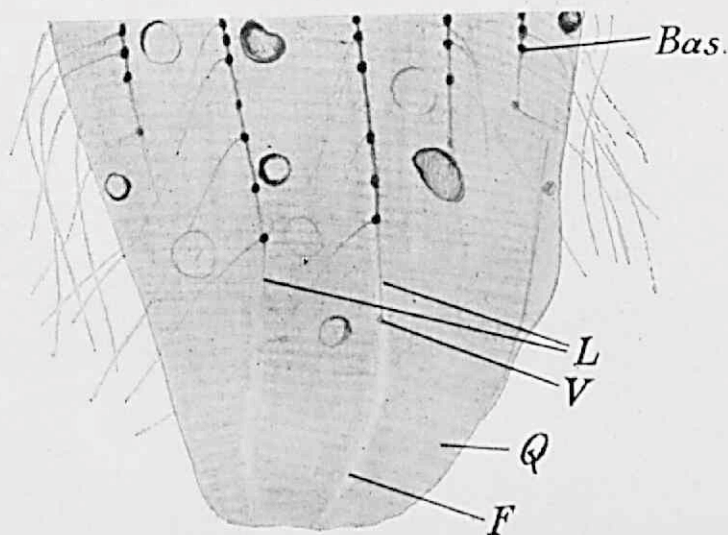


Fig. 12.

Gew. ingedroogd; Kal. bichromaat; alcoholreeks; Heidenhain.

Bas. basaalkorrel, F. ciliëngroeve, L. lijst, Q. dwarsband, V. nieuwgevormde bas.korrel.

als verdikkingen (V) op een lijst of fibril (L), die vanaf de anterieure pool, vanuit een bepaalde groeizone, geleidelijk naar de posterieure pool voortgroeit. In fig. 12 hebben deze lijsten die pool nog niet bereikt; in fig. 13, een ouder stadium, ziet men eenige lijsten reeds samenkomen, waarbij de ectoplast op die plaats verdikt blijkt te worden (*). Léger en Duboscq (1904, pag. 347, fig. 3) hebben bij *O. saturnalis* aan de anterieure pool een dergelijke verdikte plaats, waarop langere ciliën ingeplant waren, waargenomen. Bij *O. ranarum* bevinden zich juist op de verdikte plaats van de posterieure pool langere ciliën. Doordat verschillende partikeltjes uit het milieu, mede als gevolg van de ciliënbeweging, een tijd lang aan deze ciliën blijven hangen, wordt de indruk gevestigd, dat zich op die plaats een anaalopening bevindt, wat natuurlijk niet het geval is.

De plaatsen, waarop de basaalkorrels gevormd worden, blijken

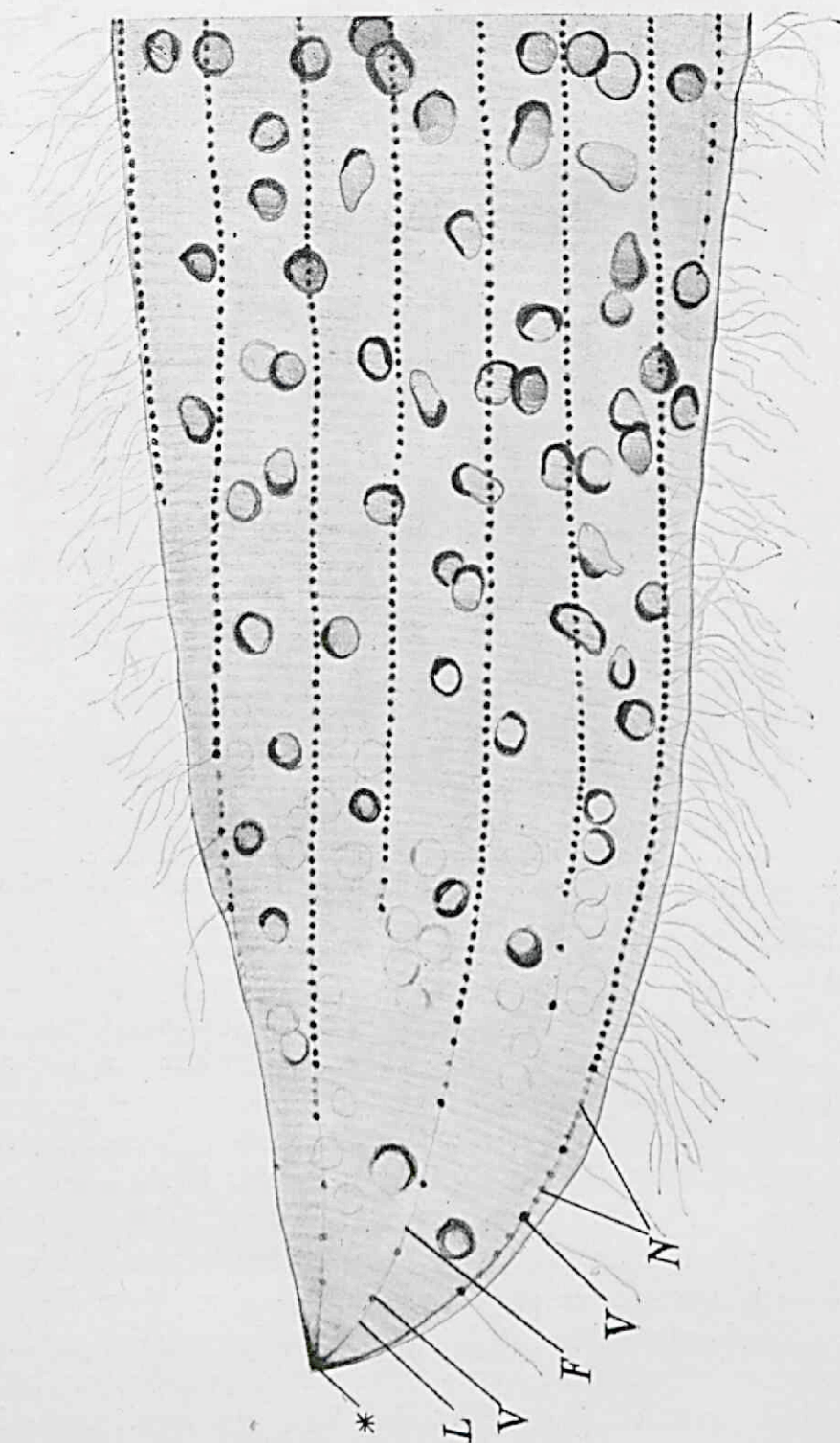


Fig. 13.

Gew. ingedroogd; kal. bichromaat; alcoholreeks; Heidenhain.
F. ciliengroove, L. lijst, V en N. nieuwgevormde basaalkorrels, *. verdikte ectoplast.

in het algemeen verder van elkaar te liggen, naarmate de afstand tot de anterieure pool grooter is (V). Pas later ontstaan nieuwe basaalkorrels tusschen deze voorloopers in (N.). De nieuwvormingen zijn al dadelijk door het gemis aan ciliën te herkennen; bovendien zijn zij flauwer gekleurd.

Eerst ontstaat dus de lijst of fibril, daarna de basaalkorrel en dan pas de cilie. Aangenomen mag worden, dat dit proces reeds in de cyste begint.

Al zegt Saguchi (1917, pag. 265): „there is no indication of the formation of cilia from pre-existing basal corpuscles”; bij *Opalina* is dit wél het geval, zooals trouwens ook de regel schijnt te zijn. Hartmann (1925, pag. 151) zegt hierover: „Nur so viel steht fest, dasz die Basalkörperchen vor der Bildung der Wimpern vorhanden sind”. Wanneer men de basaalkorrel als de verankerende, steungevende component van de cilie beschouwt, móét deze volgorde in het ontstaan ook plaats hebben.

Het is mij niet mogen gelukken het ontstaan der ciliën waar te nemen. Of een basaalkorrel droeg een cilie, die, na vergelijking met reeds veel eerder gevormde, volgroeid bleek te zijn, of er was nog geen spoor van een cilie te bekennen. Groeistadiën heb ik nooit gezien. De ciliën schijnen in zéér korten tijd volkomen uit te groeien.

Opalina wijkt in de wijze, waarop de ciliënrijen gevormd worden, niet af van de Ciliaten, zooals het onderzoek van Klein (1926) over de „Silberliniensysteme der Ciliaten” doet zien. Reeds eerder heb ik de verzilveringsmethode genoemd, waarmee Klein de verbindingslijst, die de basaalkorrels van *Opalina* verbindt, kon aantonen. Dergelijke lijsten of fibrillen noemde hij „Silberlinien”. Bij alle door hem onderzochte Ciliaten constateerde hij het ontstaan van deze „Linien” uit het ectoplasma, met het vermogen uit te groeien en basaalkorrels te vormen.

Ongetwijfeld ontstaan de ciliënrijen bij *O. ranarum* ook uit ectoplasma, uit een bepaald deel van den ectoplast en wel, volgens mijn overtuiging, uit de dwarsgestreepte laag. Zooals reeds gezegd, liggen de basaalkorrels op de grens, misschien zelfs wel met een klein gedeelte in deze laag. Al zou het uit fig. 10 lijken, alsof de

basaalkorrels hoger liggen, de verschillen zijn zóó minimaal, dat in ieder geval contact met deze laag moet worden aangenomen.

Na fixatie met Champy's vloeistof, gevolgd door behandeling met 2 % osmiumzuur, bleek deze laag buitengewoon rijk te zijn aan lipoiden; de dwarsbanden bleken een aaneengesloten rij donkere lipoid„korrels” te bevatten (fig. 14), terwijl de basaalkorrels

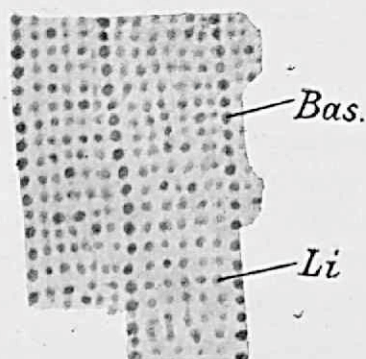


Fig. 14.

Champy; osmiumzuur. Bas. basaalkorrel, Li. lipoidkorrel.

geheel donker gekleurd waren, wat dus op een groot gehalte aan lipoiden wijst *). Nu ontstaan nieuwe basaalkorrels altijd op de plaats van de dwarsbanden, nooit er tusschen in. Ik heb den indruk gekregen, dat de basaalkorrels eenvoudig door vergrooting van die lipoid„korrels” der dwarsbanden ontstaan. In het jonge materiaal waren de basaalkorrels in aanleg zelfs niet van de „korrels” der dwarsbanden te onderscheiden.

Ligt het dus niet voor de hand hier een verband te leggen en de dwarsgestreepte laag te beschouwen als den moederbodem, waaruit het ciliënapparaat gevormd wordt?

In deze opvatting wordt ik gesterkt door de onderzoeken van von Gelei (1926). Dank zij een nieuwe methode heeft v. G. in de ciliën van Proto- en Metazoën lipoidkorrels kunnen aantoonen, die hij als trophische elementen van de ciliën beschouwt. Op pag. 550 heeft v. G. een geschematiseerd beeld van een ciliënrij van

*) Bezenberger (1904, fig. 22, pag. 170) heeft bij *O. longa* deze korrels vermoedelijk ook gezien. Hij zag deze echter „aus der Oberfläche hervorragen”.

Paramecium gegeven, waarbij hij opmerkt: „In der Abb. 24 habe ich eine tatsächlich beobachtete Reihe von Cilien von Paramecium zusammengestellt, die uns die Möglichkeit vergegenwärtigt, wie die Wimpern von ihrem basalen Teil ausgehend allmählich mit Lipoidkörnern beschickt werden und wie sie allmählich ihren Lipoidvorrat verbrauchen“. Op pag. 551 zegt hij dan: „Ich stelle mir den Lipoidstoffwechsel der Cilien folgendermassen vor: Die erschöpften Wimpern saugen oder erhalten in anderer Weise ihren Lipoidbedarf stossweise in sol-kolloidalem Zustand aus der Zelle“. Dat zullen zij bij *O. ranarum* door middel van de basaalkorrels doen, waarmede tevens het rijke gehalte aan lipoïden van deze en van de laag, waaruit zij ontstaan, verklaard kan worden. v. Gelei (pag. 542) noemt de basaalkorrels: „in genetischer und regenerativer Beziehung wichtige Gebilde für die Cilien“.

Na een vergelijking met deze onderzoeken van von Gelei voel ik mij verantwoord de dwarsgestreepte laag te beschouwen als een moederbodem voor de vorming der basaalkorrels, vermoedelijk ook van de ciliën en tevens als den voedingsbodem van deze.

Zeër duidelijk zag ik lipoïden in de ciliën, zooals door v. Gelei reeds voor Paramecium beschreven is.

Is dit echter de eenige functie van deze laag? Hiertegen spreekt de structuur, die zij heeft (fig. 15), een structuur, die vooral bij donkerveldbelichting duidelijk de dwarsstreping toont als een opeenvolging van dwarsbanden, van bepaalde ectoplasmadiffe-

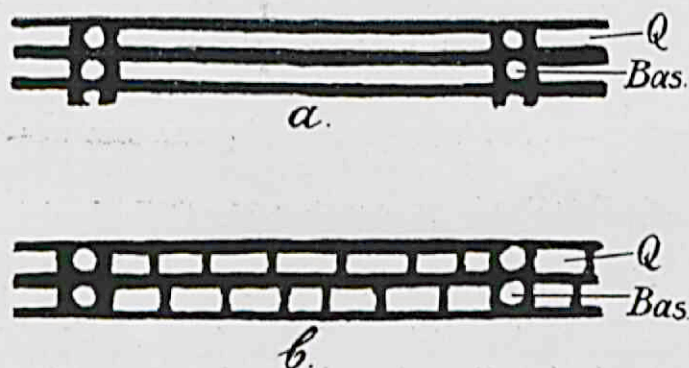


Fig. 15, a en b.
Bas. basaalkorrel, Q. dwarsband.

rentieeringen, die, evenals de richels van de pellicula, als versterkingen van den ectoplast moeten worden opgevat, als structuur-antagonisten van die pellicularichels, zooals bij de Metazoën de ringspieren de antagonisten van de lengtespieren zijn. In fig. 15a heb ik het beeld weergegeven, dat men met donkerveldbelichting ziet. De dwarsbanden (Q) liggen op één rij met de basaalkorrels, zijn er niet mee verbonden en blijken dus identiek te zijn met de donkere lijnen, die men in het gekleurde preparaat ziet. Deze dwarsbanden ziet men als één geheel bij dieren, die pas kort onder het dekglas liggen. Tot mijn groote verwondering bleken de banden na langer bekijken, wanneer de dieren niet meer zoo levendig waren als in den beginne, uiteen te vallen in een grooter of kleiner aantal componenten (fig. 15b), die dan nog op één rij lagen. Bij stervende dieren werd ook deze regelmaat verbroken; alle sporen van dwarsbanden bleken verdwenen te zijn.

De figuur is natuurlijk geschematiseerd; ik heb de weergegeven beelden duidelijk gezien, maar slechts kort. Door de steeds wisselende bewegingen van de dieren en de constante ciliënslag is het onmogelijk het beeld langeren tijd vast te houden. Bij rustige, dus stervende of reeds doode dieren, was de structuur, zooals gezegd, geheel veranderd. Ik ben niet in staat van deze feiten een verklaring te geven. Degenereerende ciliën en flagellen vertoonen echter dezelfde verschijnselen.

Er is nog een belangrijke factor, die een netvormige configuratie van deze 2 groepen van versterkingen noodzakelijk maakt. *Opalina* bezit geen mondopening, voedt zich dus langs osmotischen weg. Zonder een netvormige plaatsing van de versterkingslijsten, zou de osmose ongetwijfeld sterk belemmerd worden; alleen de ciliëngroeven zouden, als dunnere plaatsen van den ectoplast, overblijven.

Uit dit alles blijkt, dat de ectoplast als één geheel beschouwd moet worden, opgebouwd uit, door de ciliëngroeven van elkaar gescheiden, banen, ieder bestaande uit een versterkte binnen- en buitenlaag, waartusschen zich de dunne, hyaliene plasmalaag bevindt, waarin de basalkorrels geheel of gedeeltelijk verankerd liggen.

Het is niet te verwonderen, dat een dergelijke sterke „huid”, bij het werken met den micromanipulator moeilijkheden veroorzaakte.

Bij het onderzoek over het ontstaan der ciliënrijen heb ik over een groeizone gesproken, aan de anterieure pool van het dier gelegen, vanwaar steeds nieuwe ciliënrijen uitgroeien. In fig. 16

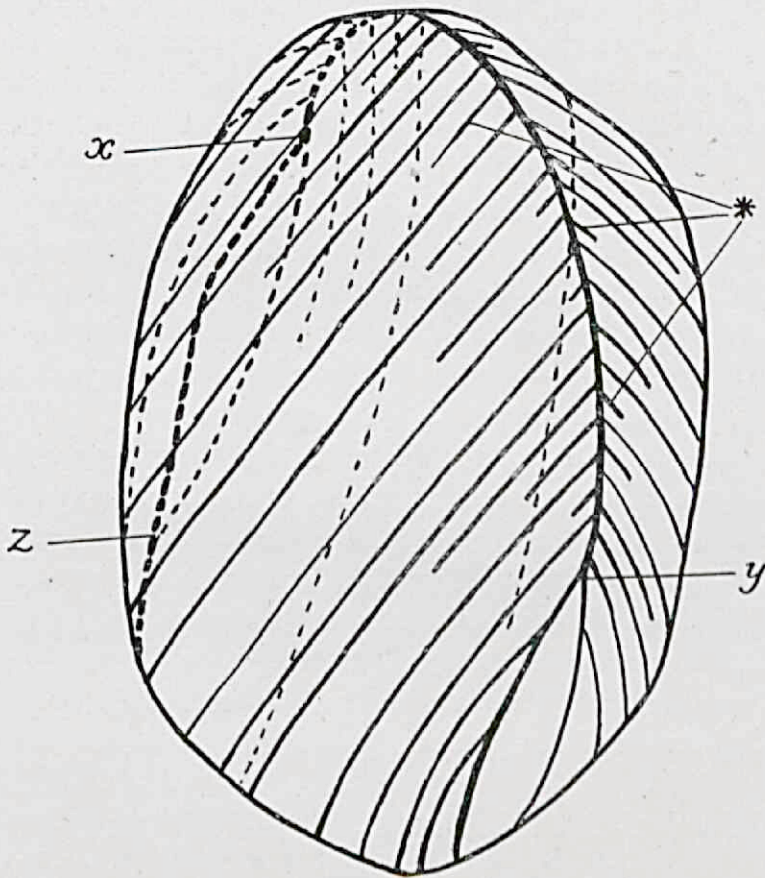


Fig. 16.

Onvolwassen Opalina.

X—IJ, groeizone, Z, einde der posterieure verbindingslijn.

* ontstaan van nieuwe ciliënrijen.

heb ik het verloop der ciliënrijen van een nog niet volgroeide Opalina, uit den darm van een pas gemetamorphoseerden kikvorsch, weergegeven. Om geen onduidelijk beeld te krijgen, zijn de ciliënrijen van de tegen het objectglas rustende zijde van het dier slechts gedeeltelijk geteekend. Ook heb ik de groeizone x-ij

met opzet dikker aangegeven. Deze groeizone ligt in een ondiepe groeve. Duidelijk is te zien, dat van hieruit nieuwe ciliënrijen ontstaan (*). Metcalf (1923, pag. 7) heeft over: „anteriorly, accessory rows are interpolated between the main rows” gesproken; ook over het feit, dat bij sommige species in het anterieure gedeelte veel meer ciliënrijen zijn dan in het posterieure deel, bij andere species daarentegen een meer gelijke verdeeling. Het lijkt mij waarschijnlijk, dat Metcalf hierbij dieren van verschillende leeftijden met elkaar vergeleken heeft. In ieder geval bleek mij, dat minder onvolkomen ciliënrijen voorkwamen, naarmate de dieren ouder waren.

De, in tegenovergestelde richting groeiende, ciliënrijen ontstaan niet op dezelfde plaats in de groeizone. Hoewel Zeller en Metcalf aannemen, dat de ciliënrijen van de beide vlakken van het dier aan de posterieure zijde in elkaar overgaan, is dat niet juist. Gefixeerd materiaal is hiervoor niet te gebruiken, alleen het levende dier en wel bij donkerveldbelichting.

Zooals aan de anterieure zijde een ciliënrij aanwezig is, die, om zoo te zeggen ciliënrijen naar weerskanten „uitzendt”, zoo is aan de posterieure zijde een ciliënrij, die de „uitgezondenen” „opvangt”, even onregelmatig. Eigenlijk bestaat deze posterieure verbindingslijn uit 2 gedeelten, waarvan de deelen beginnen in het bekende puntvormige einde van Opalina. In fig. 16 is z het einde van het eene gedeelte; het einde van het andere deel ligt in het verlengde van de lijn x-ij, maar is hier niet te zien.

B. De endoplast en de fibrillen.

Dezelfde motieven, die mij het begrip ectoplast deden verkiezen boven ectoplasma, zijn natuurlijk ook de richtsnoeren, waardoor niet over endoplasma, maar over endoplast gesproken wordt. In vergelijking met de, tot dusver over Opalina gedane, onderzoeken, bevat deze endoplast dus het endoplasma met de binnenste ectoplasmalaag. Het zal blijken, dat geen redenen van morphologischen aard een scheiding tusschen deze 2 deelen noodzakelijk maken; daarentegen moeten zij op physiologische gronden als één

geheel beschouwd worden. Dit laatste zal echter in een volgend hoofdstuk uitvoerig besproken worden.

Engelmann (pag. 102) heeft de jonge Opalina's in vivo bekeken; hij zag structuurloos-, tamelijk korrelvrij plasma.

Hetzelfde nam Zeller (pag. 355) bij oude Opalina's waar. De binnenste plasmamassa bleek een enorme hoeveelheid kleine glanzende korrels te bevatten; in de buitenste laag kwamen deze niet voor.

Tönniges (1898) onderzocht daarentegen het plasma van gefixeerd materiaal; hij vond een „Wabenbau im Sinne Bütschli's". T. stelde zich het ectoplasma als een opeenvolging van groote vacuolen voor, wat in zijn schematische figuur tot uiting komt. Hierin heeft volgens hem het onderscheid met het veel compactere endoplasma bestaan, niet in het ontbreken van de plasma-insluitsels, die „hin und wieder in vereinzelter Form auch im Ectoplasma angetroffen werden können, wie ich es häufiger zur beobachten Gelegenheit hatte" (pag. 131).

Tegen deze voorstelling van het ectoplasma heeft Maier (pag. 81) geopponneerd. Hij heeft deze laag corticaalplasma genoemd en als „feinwabig" beschreven, zonder een verschil in bouw met het endoplasma te zien en zonder insluitsels.

Neresheimer (pag. 1) zag het door Tönniges afgebeelde plasma-schema bij vele Opalina's: „allerdings nur in gewissen mit der Fortpflanzung zusammenhängenden Stadien, die Maier wohl nicht vorgelegen haben".

Metcalf (1909, pag. 212) trof bij *O. intestinalis* in het ectoplasma altijd grootere-, meestal zelfs veel grootere vacuolen dan in het endoplasma. Dat Maier deze niet waargenomen had, zou alleen het gevolg zijn van het gebruiken van ijzerhaematoxyline als kleurmiddel. Dit is niet juist; uit mijn fig. 18 kan blijken, dat ook met ijzerhaematoxyline de vacuolen zeer goed aangetoond kunnen worden. Maier schijnt toevallig stadiën zonder-, Metcalf alleen stadiën met vacuolen gezien te hebben. Bovendien is het niet onmogelijk, dat *O. intestinalis* in dit opzicht van *O. ranarum* verschilt. Voor deze veronderstelling pleit zeker het feit, dat alle afbeeldingen, die Léger en Duboscq (1904, pl. XIV) van *O. satur-*

nalis gegeven hebben, groote vacuolen in de bewuste ectoplasma-laag vertoonen. Tevens toonen deze afbeeldingen het voorkomen van insluitsels in die laag. Dezelfde grofvacuolaire ectoplasma-structuur heeft Kunstler (1904, pag. 76, fig. 7) echter ook voor *O. dimidiata* beschreven.

Tönniges is in 1919 teruggekomen van de overtuiging, dat het plasma van *Opalina* een „wabige” grondstructuur zou hebben. Fibrillaire, granulaire, soms zelfs spongieuze bouw werden door hem waargenomen en op de juiste wijze geïnterpreteerd. Dit blijkt, waar hij zegt: „Ich bin zu der Ueberzeugung gekommen, dass der wabige Bau des Plasmas, der zweifellos unter den Protozoen vorherrschend verbreitet ist, nicht die „Grundstruktur” desselben darstellen kann. Ebenso verfehlt scheinen aber auch die Theorien von Flemming, Altmann, Leydig usw. zu sein.

Es können tatsächlich alle von diesen Autoren angegebenen Strukturen im Plasma vorkommen und lassen sich auch oftmals an ein- und demselben Objekt in entsprechenden Zeiten seiner Entwicklung nachweisen; nur kann es sich aus diesem Grunde unmöglich um eine „Grund- oder Elementarstruktur” des Plasmas handeln, sondern nur um Zustandsphasen ein und derselben Substanz. Die verschiedenen Strukturen bilden sich dann auf Grund der durch den Stoffwechsel bedingten Schwankungen der physikalischen und chemischen Verhältnisse des Plasmas.

Meinen Beobachtungen nach ist die Elementarsubstanz des ruhenden Plasmas homogen und die Reize, die von aussen kommen, bewirken die Struktur”.

Dit onderzoek maakte de verschillende meeningen over den plasmabouw tevens begrijpelijk. Wanneer T. echter opmerkt: „Ein sicheres Unterscheidungsmittel vom Endoplasma ist darin gegeben, dass weder Kerne noch scheibenförmige Körperchen in ihm gefunden werden”, dan spreekt hij zijn vroegere waarnemingen over de ectoplasmalaag (1898, pag. 131) daarmee tegen.

Tenslotte loste Konsuloff de quaestie van het al of niet aanwezig zijn der groote vacuolen in de ectoplasmalaag door voedingsproeven op; hij heeft op overtuigende wijze aangetoond, dat de grofvacuolaire bouw afhankelijk is van het voedingsproces.

In alle tijden van het jaar trof ik deze stadiën met groote vacuolen, niet alleen in het najaar, zooals ten Kate (pag. 7) veronderstelde. Fig. 17 toont een stadium uit Julimateriaal, waarin

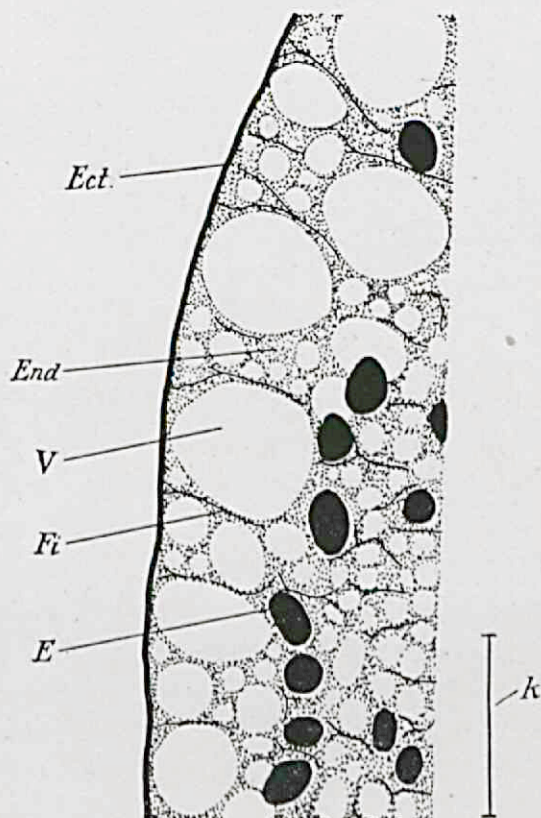


Fig. 17.

Onvolwassen stadium, dwarscoupe. Flemming; driekleuring v. Flemm.
Ect. ectoplast, End. endoplast, E. plasma-insluitel, K. kerngrootte. Fi. fibril, V. vacuole.

het talrijk voorkwam; fig. 18 een stadium uit materiaal, dat in September verzameld werd. Om de grootte der vacuolen te kunnen bepalen, is de grootte der kernen (K) naast de teekening aangegeven. Dit Septemberstadium bleek wel buitengewoon groote vacuolen (V) te bezitten; meestal waren zij kleiner, zooals in het Julistadium. Het stadium, in fig. 40 weergegeven, komt volkomen overeen met de fig. 1b van Maier. Dat ook tusschenstadiën kunnen voorkomen, blijkt uit fig. 39 en fig. 38. In het eerste dier zijn er talrijke, maar kleinere vacuolen in de buitenste laag van

den endoplast, in het andere dier daarentegen minder vacuolen,

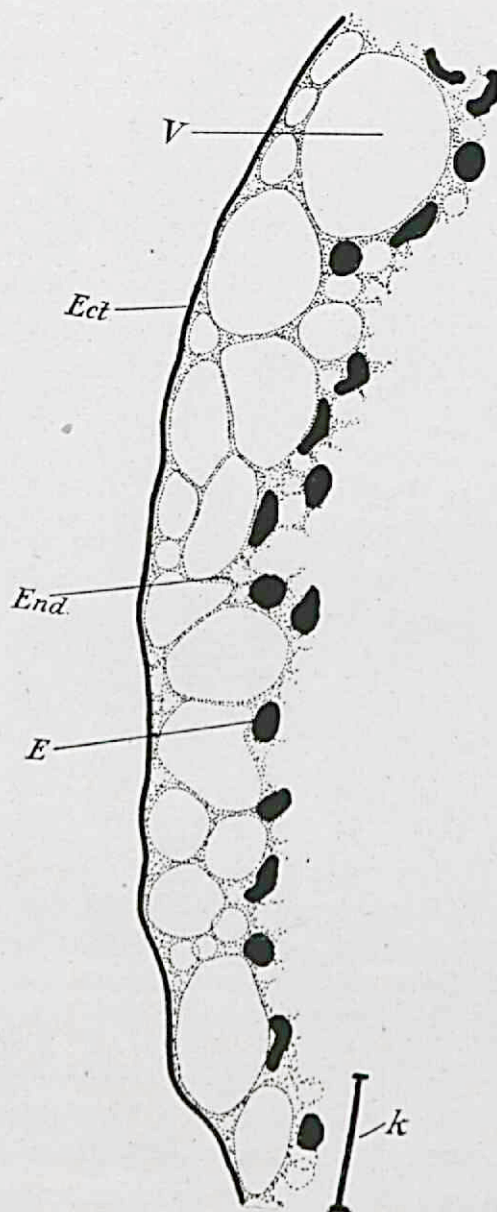


Fig. 18.

Volwassen stadium, dwarscoupe. Flemming; Heidenhain.

Ect. ectoplast, End. endoplast, E. plasma-insluitel, K. kerngrootte, V. vacuole.
maar in verhouding grootere. Deze verschillen lijken mij onafhankelijk te zijn van den leeftijd van het dier.

Uit bijna al mijn preparaten blijkt, dat de plasma-insluitels ook in de buitenste endoplastlaag voorkomen. Fig. 39 b.v. laat hierover niet den minsten twijfel. Daarmede vervalt het kenmerk, waarop de ectoplasmatische natuur van deze laag gegrondvest was. Ook volgens Doflein (1927, pag. 13), die ectoplasma „verfestigtes, einschlussfreies Hyaloplasma” noemt, is deze laag dus als endoplasma te beschouwen.

J. Spek (1923) heeft een uitgebreid onderzoek over het plasma van de levende *O. ranarum* gedaan. Hij zegt daarover op pag. 189: „So ohne weiteres kann man am Opalinenplasma Waben oder Tröpfchen nicht erkennen. Bei genauester Prüfung fand ich aber immerhin immer wieder Stellen, an denen ich lauter feine, kugelrunde Bläschen mit dunklem Inhalt, die von höherer Grössenordnung waren als in anderen Partien der Zelle, mit Sicherheit gesehen habe”. Hij heeft dit plasma „Plasma mit Emulsionsnatur” genoemd. Naast deze blaasjes zag hij bovendien talrijke granula, die bij behandeling met verschillende zouten niet opzwellen. Ik kan mij volkomen bij Spek's waarnemingen aansluiten. Zijn fig. 15 geeft hetzelfde beeld, dat ik kreeg, wanneer de ectoplast met den micromanipulator doorgesneden en het plasma uitgedrukt werd.

Het ligt buiten mijn bevoegdheid het verband te bepalen, dat tusschen het plasmabeeld van het levende en dat van het gefixeerde dier bestaat. Wanneer ik dus het plasma van opeenvolgende leeftijdsstadiën met elkaar vergelijk, alle op dezelfde wijze behandeld, dan ben ik mij ervan bewust waarschijnlijk relatieve beelden te beschouwen, niet relatief echter ten opzichte van elkaar. Met het plasmabeeld bedoel ik hier niet de structuur van het gefixeerde plasma zelf (deze zag ik steeds fijnalveolair, met een meer of minder groot aantal granula), maar de wijze van verdeeling over het inwendige van het dier, de configuratie van het plasma. De, in de figuren weergegeven, beelden spreken voor zichzelf; ik kan dus volstaan met een korte beschrijving.

Zeer jonge Opalina-stadiën toonen een vrij compact plasma, met slechts weinig, grootere holten (fig. 24 en 25). Worden de dieren ouder, dan blijkt het aantal holten sterk toe te nemen, waarbij de plasmaverbindingen tusschen die holten zeer dun worden (fig. 26).

In deze stadiën is het plasma rijk aan granula. Geleidelijk komen er meer holten bij, daardoor ook dunnere plasmastrengen, zoodat het inwendige van dieren, die pas den platten vorm gekregen hebben, er uitziet als een netwerk (fig. 27). In dit stadium is het plasma minder rijk aan granula. Bij den verderen groei worden de holten geleidelijk grooter, de plasmastrengen echter ook dikker (fig. 39 en 30). Het aantal granula blijkt sterk af te nemen.

Het beeld van dit proces: het grooter worden van de holten, het dikker worden van de plasma-strengen en het afnemen van het aantal granula, wijzigt zich pas bij bijna volwassen *Opalina*'s. Inplaats van een kleiner aantal groote holten, bestaat het plasma bij deze dieren uit een grooter aantal holten, die echter kleiner zijn dan in het vorig stadium (fig. 31). Tenslotte is ook dit aantal bij het volwassen dier sterk verminderd, de dikte der plasmastrengen echter zoodanig toegenomen, dat men beter over een „plasma met holten erin” zou kunnen spreken (fig. 32).

De beelden, die men zodoende van het plasma, gedurende de ontwikkeling van het dier, krijgt, vertoonen een groote overeenkomst met de ontwikkelingsstadiën van het bindweefsel der Metazoën.

Bij de cystevorming gaat dit proces in omgekeerde volgorde, alleen veel sneller. Fig. 33 toont een stadium als in fig. 27; in hetzelfde dier blijkt echter ook reeds compacter plasma aanwezig te zijn (fig. 34), zooals in zeer jonge stadiën (fig. 24) gevonden wordt.

Ik moet hierbij nog opmerken, dat de figuren in gelijke mate vergroot zijn.

Het plasmabeeld wordt gecompliceerder door het tijdelijk optreden van een fibrillensysteem. Wel waren reeds door verscheidene onderzoekers fibrillen bij *Opalina* beschreven; het feit, dat deze slechts tijdelijk aanwezig zijn, was nog niet bekend. Daardoor is het tevens te begrijpen, waarom sommige onderzoekers geen, andere daarentegen weer wel fibrillen waargenomen hebben. Schneider (pag. 49—51, fig. 14a,b,c.) was de eerste, die bij *O. ranarum* een fibrillensysteem ontdekte, uit 2 componenten bestaande: dikkere steunfibrillen en een fijn netwerk van „Elementarfäden”, zeer

dunne fibrillen, beide componenten door onderlinge verbindingen een echt skelet of linom vormend. Schn. zag een verbinding tussen de basaalkorrels der ciliën en de steunfibrillen, waarvan bij het verloop tot in het endoplasma heeft kunnen volgen, niet verder. De dunne fibrillen zouden uitgaan van de knooppunten der longitudinale pelliculalijsten met de dwarsverbindingen, die Schn. dus ook in de pellicula meende te zien liggen. Overigens heeft hij dit niet met zekerheid kunnen waarnemen. Uit het feit, dat Schn. slechts 4—5 longitudinale richels tussen de ciliënrijen zag, blijkt, dat hij onvolwassen *Opalina*'s onderzocht heeft.

Tönniges (1919, pag. 33) heeft alleen een netwerk van steunfibrillen gezien, de basaalkorrels der tegenover elkaar liggende vlakken met elkaar vereenigd.

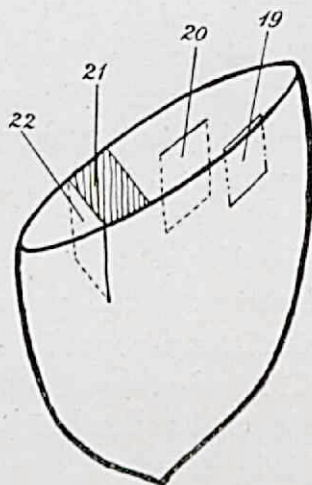
Het fibrillennetwerk, door Schneider het eerst beschreven, is later ook door Konsuloff waargenomen. K. zag geen verbindingen met de basaalkorrels. De beelden, in fig. 5 en 6, pl. 12, weergegeven, hebben hem aanleiding gegeven deze fibrillen geen steun-, maar een vormbehoudende functie toe te schrijven. De in fig. 6 weergegeven toestand van het fibrillennet zou door spanning, als gevolg van de contractie der myonemen in de pellicula, ontstaan zijn. Ik ben overtuigd, dat Konsuloff 2 verschillende beelden van het fibrillennet gezien heeft: een beeld op dwars, en een beeld op tangentiale doorsnede, niet 2 fasen van hetzelfde beeld. Mijn eigen preparaten (fig. 20 en 21) maken dat m.i. zeer waarschijnlijk. Uit Konsuloff's fig. 1, waarin hij 4 pellicularichels tussen de ciliënrijen geteekend heeft, blijkt, dat ook hij met onvolwassen materiaal gewerkt heeft.

Ook ten Kate heeft er reeds op gewezen, dat bij *Opalina* in een bepaalde richting georiënteerde fibrillen voorkomen, welke hij dorso-ventrale fibrillen noemde. Hij heeft geen fibrillennetwerk, wel verbindingen tussen de fibrillen gezien, waarvan hij verschillende categorieën beschreef. Het materiaal, dat ten Kate gebruikte, stamde uit jonge kikvorschen, in September gevangen; hoewel onbewust heeft dus ook ten Kate onvolwassen *Opalina*'s onderzocht.

Vergelijkt men de onderzoekingen over *O. ranarum* met elkaar,

dan blijken alle onderzoekers, die een fibrillensysteem beschreven, met onvolwassen *Opalina*-materiaal gewerkt te hebben. Daaruit verklaren zich hun resultaten.

Met kaliumbichromaat heb ik het fibrillennetwerk van de onvolwassen *Opalina*'s duidelijk kunnen aantoonen. Fig. 19—22 kunnen hiervoor als bewijs dienen. Ter vergelijking moge fig. 23 dienen, een dwarscoupe van een met Flemming gefixeerd dier van denzelfden leeftijd, uit hetzelfde materiaal afkomstig. Natuurlijk is dit beeld onduidelijker dan het met kal. bichromaat behandelde; een vergelijking met fig. 21 toont eenzelfde configuratie van het fibrillensysteem. Vergelijkt men de figuren 21, een dwars, 22, een longitudinale, 20, een tangentiaal-mediane, en 19, een tangentiale oppervlakte-coupe met elkaar, dan krijgt men een overzicht van het fibrillensysteem van *O. ranarum*. De nevensgaande tekening



van een gehalveerde *Opalina* dient ter verduidelijking. De getallen corresponderen met de nummers van de figuren der verschillende coupes. Er zijn geen afzonderlijke groepen van fibrillen te onderscheiden; het is één netwerk, dorso-ventraal georiënteerd, in sommige deelen van het dier engmaziger dan in andere. Onder den ectoplast bevindt zich een engmazig netwerk van fibrillen (fig. 19), waarmee de basaalkorrels der ciliën door enkelvoudige of samengestelde fibrillenuitloopers verbonden zijn. Men kan ook zeggen, dat de ciliënwortels direct, of pas na onderlinge vereeniging, in het engmazig netwerk van de buitenste endoplastlaag overgaan.

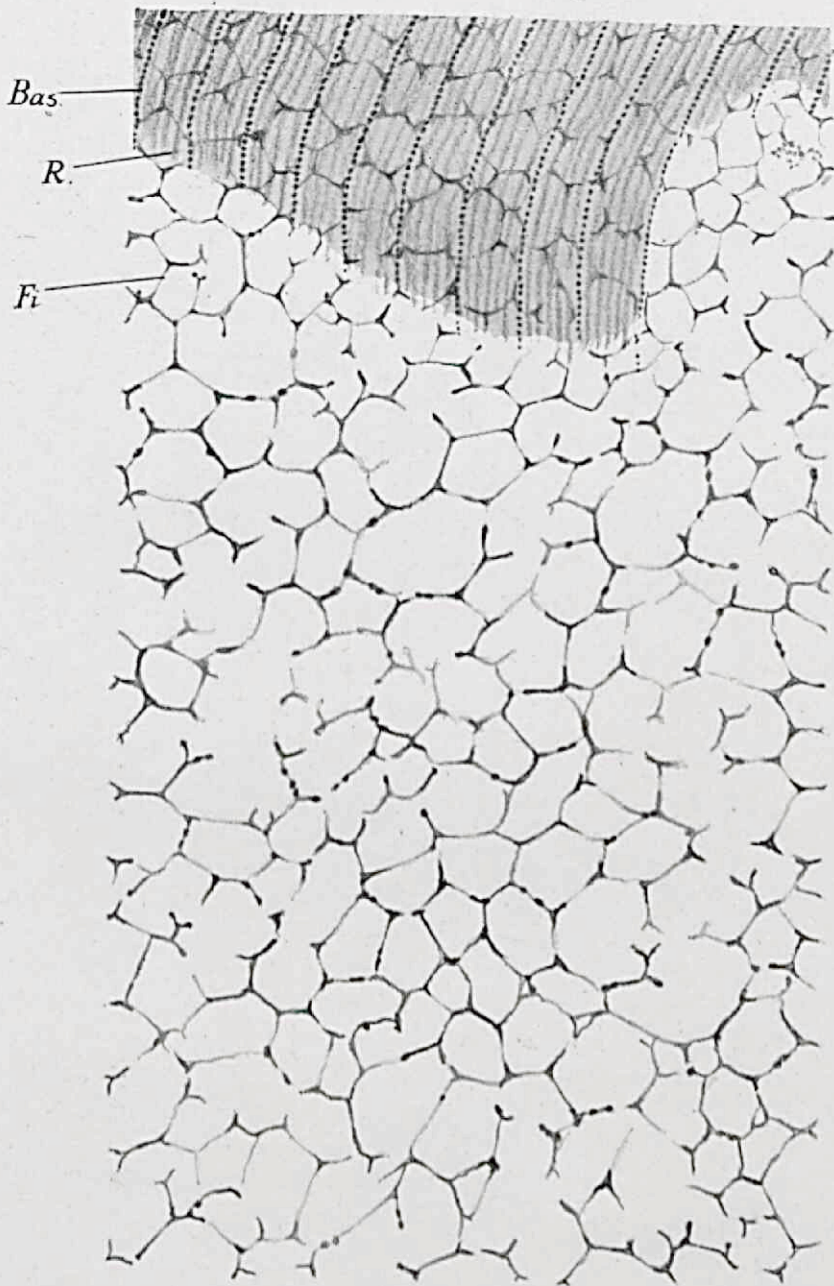


Fig. 19.

Tangentiale-oppervlakte coupe, Kal. bichromaat; Heidenhain.
 Bas. basaalkorrel, Fi. fibril, R. pellicularichel.

Fig. 22 geeft een goed beeld van dit netwerk ($\dagger$). De verbinding met de basaalkorrels is duidelijk te zien in fig. 41. Men ziet in deze

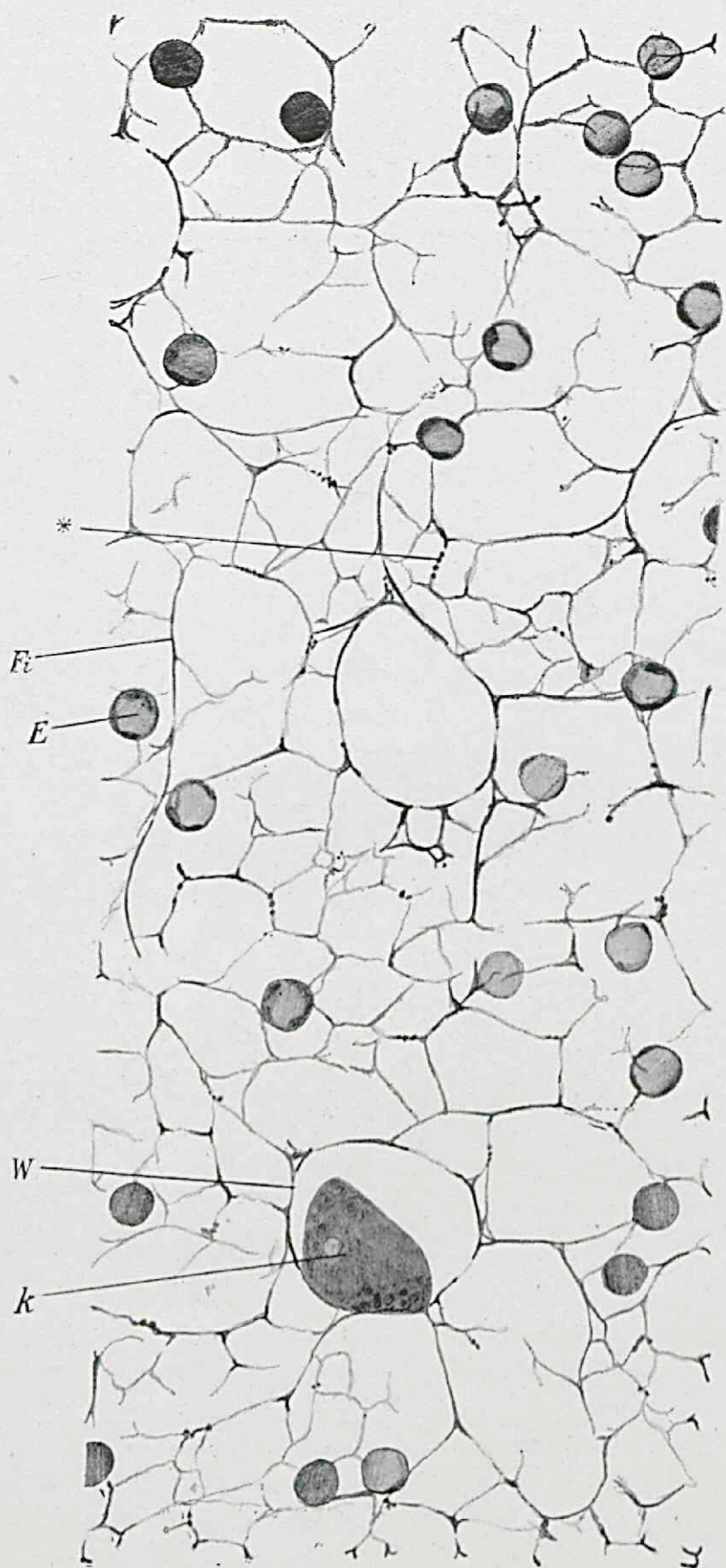


Fig. 20.
Tangential-mediane coupe. Kal. bichromaat; Heidenhain.
E. plasma-insluitel, Fi. fibril, K. kern, W. wand, *. granula.



Fig. 21.
 Dwarscoupe. Kal. bichromaat; Heidenhain.
 E. plasma-insluitel, Fi. fibril, K. kern, R. pellicularichel.

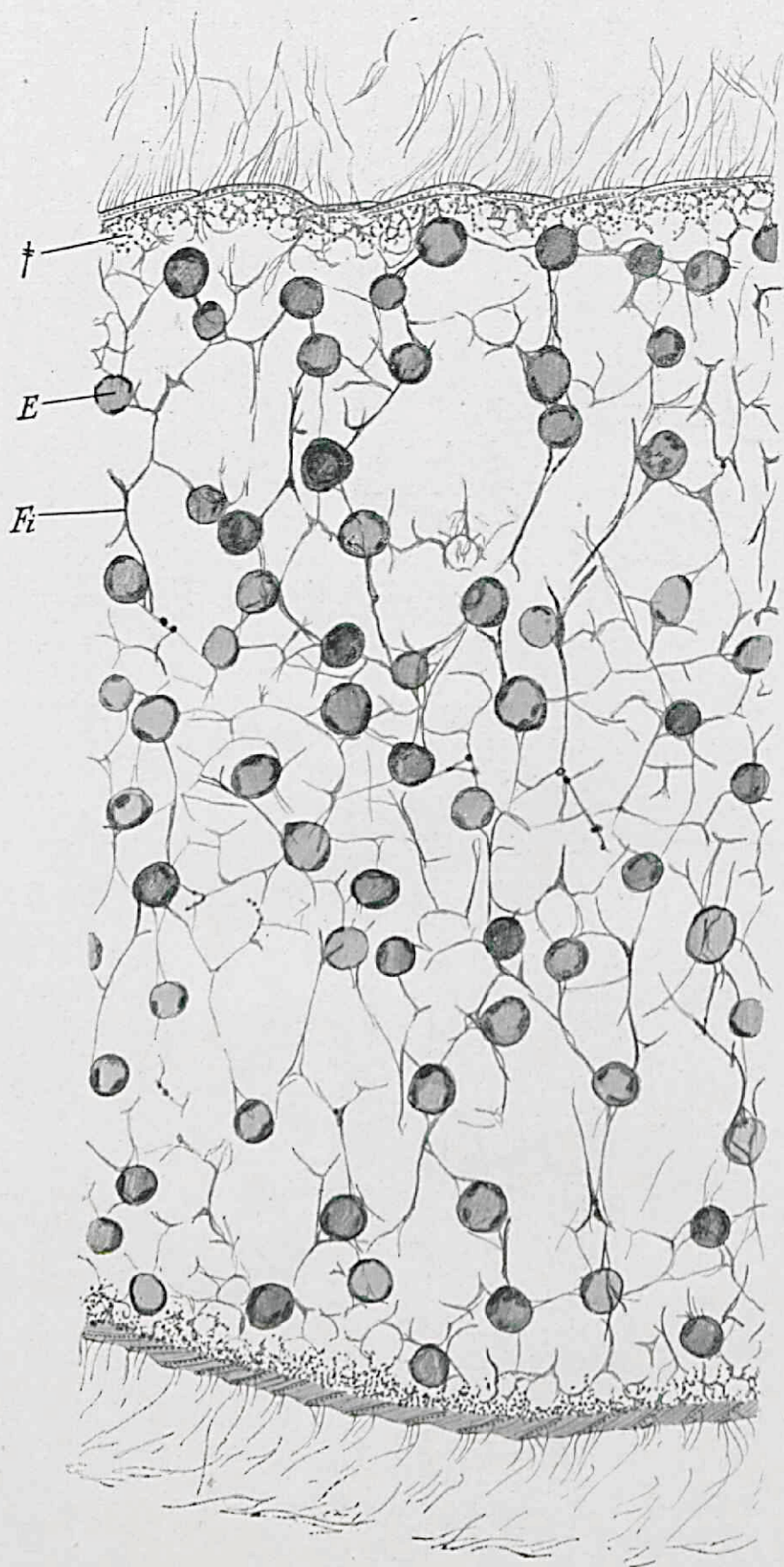


Fig. 22.
Longitudinale coupe. Kal. bichromaat; Heidenhain.
†. engmazig fibrillennet. E. plasma-insluitel, Fi. fibril.

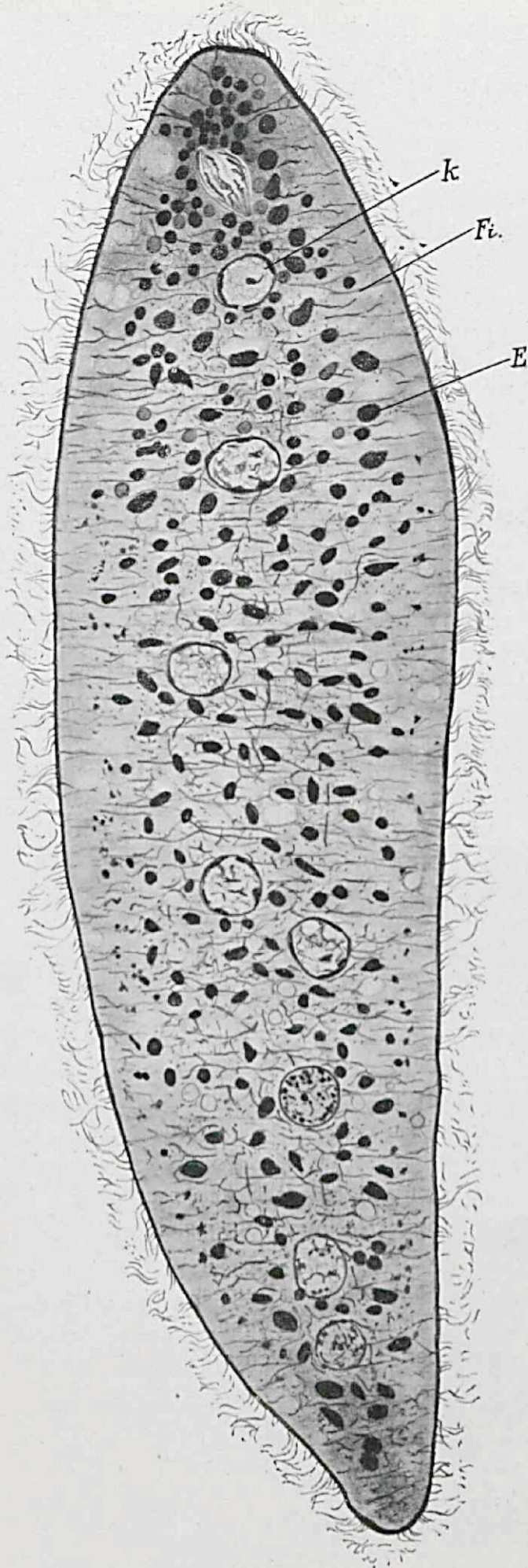


Fig. 23.
Dwarcoupe.
Flemming; Heidenhain.
E. plasma-insluitel,
Fi. fibril, K. kern.

figuur, hoe 3 ciliënwortels zich eerst vereenigen tot één enkele fibril, alvorens in het netwerk over te gaan (*); op een andere plaats is een directe verbinding (**). Deze laag is echter vrij dun. In het midden van het dier bevindt zich een veel wijdmaziger netwerk, waarin de kernen liggen (fig. 20). ten Kate beschreef alleen om de kernen een fibrillair netwerk, waardoor deze op hun plaats gehouden zouden worden. Zijn fig. 4 geeft daarvan een voorstelling. Ongetwijfeld is het juist, dat de kernen in een netwerk van fibrillen liggen, niet ermee verbonden, zooals Schneider (pag. 49) en Tönniges (1919, pag. 33) beweerd hebben, wat trouwens reeds door Konsuloff tegengesproken is (pag. 300). Toch geeft ten Kate geen juiste voorstelling hiervan, daar men den indruk zou kunnen krijgen, dat alleen om die kernen een fibrillennet aanwezig is. Zooals gezegd, beslaat het wijdmazige net het geheele middenstuk van het dier; de kernen worden in grotere ruimten op hun plaats gehouden. In fig. 20 is zoo'n ruimte te zien, waarin nog de ineengekrompen kern (K) ligt. Duidelijk ziet men, dat de wand (W) van die ruimte een netwerk zijn moet. Tusschen de engmazige lagen onder den ectoplast en het wijdmazige middenstuk liggen aan weerskanten van dit middenstuk 2 zone's, waarin het fibrillennet dorso-ventraal georiënteerd is, wat op dwarscoupe's blijkt (fig. 21).

Deze dorso-ventrale fibrillen verbinden de engmazige lagen met het wijdmazige middenstuk. Bekijkt men deze fibrillen echter van terzijde, op een longitudinale coupe (fig. 22), dan blijkt, dat zij niet in één rechte lijn tusschen de buitenste lagen en het midden-gedeelte uitgespannen zijn. Ik kan de voorstelling, die ten Kate van deze fibrillen geeft, dan ook niet overnemen; in geen geval loopen zij linea recta van de dorsale naar de ventrale zijde of omgekeerd. Hoogstens kan dat dicht bij de beide polen het geval zijn, waar de afstand tusschen de beide vlakken zeer gering is, zooals in fig. 28, bij een jonger stadium voorgesteld is.

Waar het dorso-ventrale verloop der fibrillen uit fig. 22 ook veel minder duidelijk blijkt dan op dwarscoupes, moet men zich het fibrillennet in die zone's dan ook voorstellen, als in hoofdzaak in parallel aan elkaar verloopende, dorso-ventraal gerichte, vlakken gerangschikt. De dwarsdoorsnede door zoo'n vlak zal dus een

onderbroken rechte lijn zijn, waarvan sommige deelen duidelijker dan andere zichtbaar zijn. In fig. 21 is geen enkele dorso-ventrale fibril te zien, die, zonder onderbreking, over een grooteren afstand verloopt. Men krijgt hetzelfde effect, wanneer men met den vinger langs de mazen van een, verticaal geplaatst, ijzeren netwerk van de eene zijde naar de andere gaat. Van boven gezien schijnt men een rechte lijn te beschrijven.

Dit fibrillensysteem is ook op een andere wijze aan te toonen, wel minder fraai dan met de kal. bichromaatmethode, maar toch duidelijk. Bij het inwerken van pancreatine op gedroogde uitstrijkpreparaten blijkt in de eerste plaats de pellicula op te lossen, daarna het plasma, zoodat het fibrillaire netwerk overblijft, wat dus ook reeds op een verschil met het plasma duidt. De fibrillen moeten daarom opgevat worden, als niet uit elastine bestaande structuren, daar zij anders, tenminste wanneer zij dezelfde reacties zouden vertoonen als de elastische fibrillen der Metazoën, door trypsine opgelost, en bovendien met Weigertsche resorcine-fuchsine en Unna'sche orceïne gekleurd zouden moeten worden, wat niet het geval is. Andere reacties heb ik niet uitgevoerd.

De fibrillen blijken niet dubbelbrekend te zijn.

Zooals ik reeds gezegd heb, is het fibrillaire netwerk één geheel; de 2 deelen, die Schneider onderscheiden heeft, heb ik niet kunnen waarnemen. Wel geloof ik, dat hij gelijk heeft, waar hij zegt (pag. 51): „Ich fasse überhaupt die Netzbildung als eine vorübergehende Erscheinung auf, glaube also, dass die Verbindungen sich beliebig bilden und lösen können". Waar de fibrillen slechts in gefixeerd materiaal, op coupe's te zien zijn, is het natuurlijk onmogelijk het verdwijnen te aanschouwen. Vergelijkt men echter het dichte netwerk, in fig. 19—22 aanwezig, met den regelmatig voorkomenden grofvacuolairen toestand (fig. 17 en 18), dan dringt zich noodwendig de gedachte naar voren, dat in een dergelijke phase de fibrillen misschien niet alleen verplaatst, maar ook op de plaatsen, waar de vacuolen zijn ontstaan, tijdelijk verdwenen moeten zijn. Dit lijkt mij geenszins onmogelijk, waar toch bij het normale levende dier deze vormingen uit het cytoplasma ontstaan, om na verloop van tijd te verdwijnen. Iets geheel anders dus, als het

verdwijnen van de fibrillen in dieren, die in slechten toestand ver-
keeren, zooals Entz (1909, pag. 155) bij Tintinniden waarnam.

De eerste sporen van fibrillen treft men reeds bij zeer jonge
stadiën uit de kikkerlarve, in den vorm van draadvormig gerang-
schikte granula (fig. 24). Deze granularijen (G.) zijn uitgesproken
dorso- ventraad gericht, van een netwerk is nog geen sprake. Ook

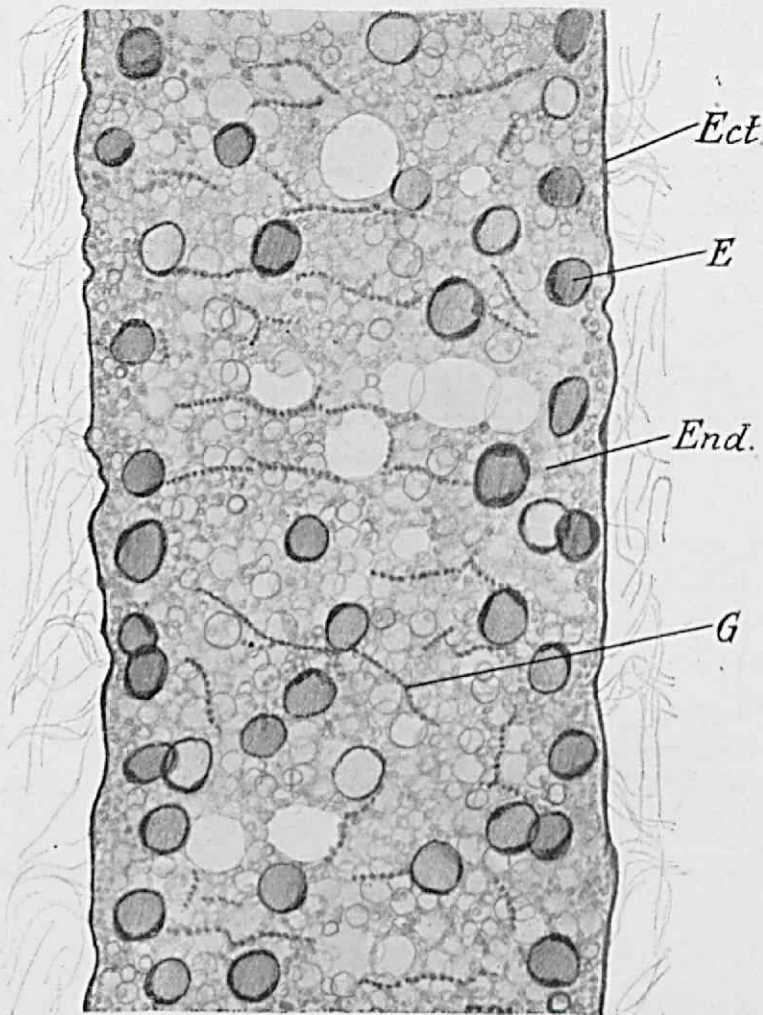


Fig. 24.
Longitudinale coupe. Flemming; Heidenhain.
Ect. ectoplast, End. endoplast, E. plasma-insluitel, G. granularij

bij oudere stadiën, die nog niet den platten vorm bereikt hebben,

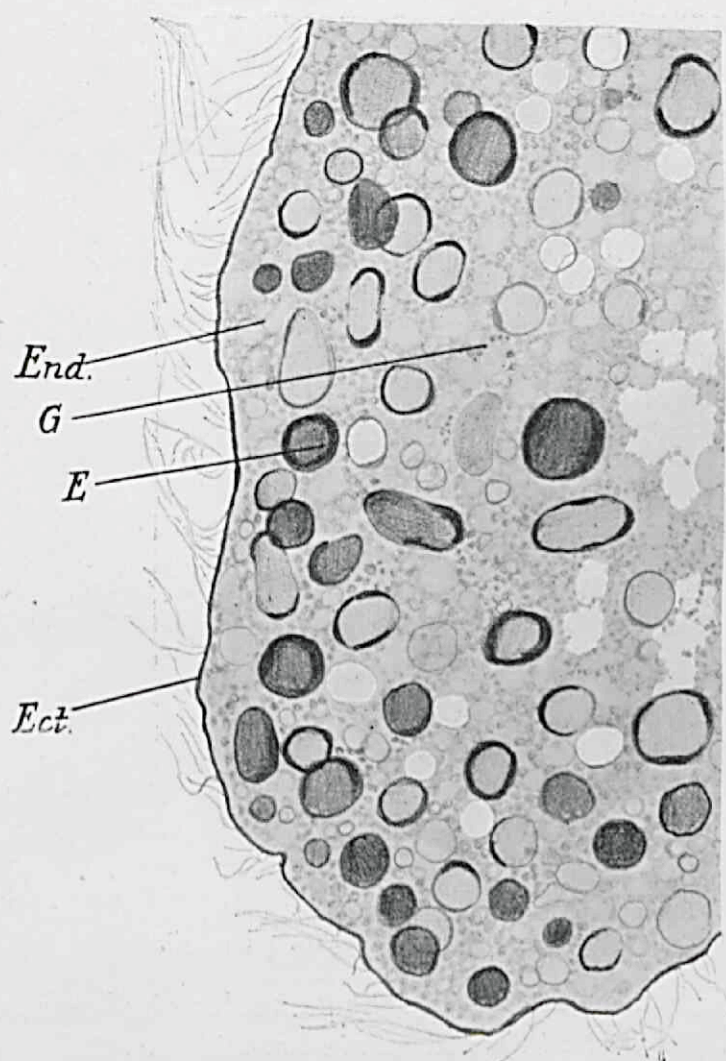


Fig. 25.

Tangentielle coupe. Flemming; Heidenhain.

Ect. ectoplast, End. endoplast, E. plasma-insluitel, G. granularij.

treft men deze granularijen echter reeds meer netvormig gerangschikt (fig. 26). Wanneer de *Opalina*'s dien platten vorm gekre-

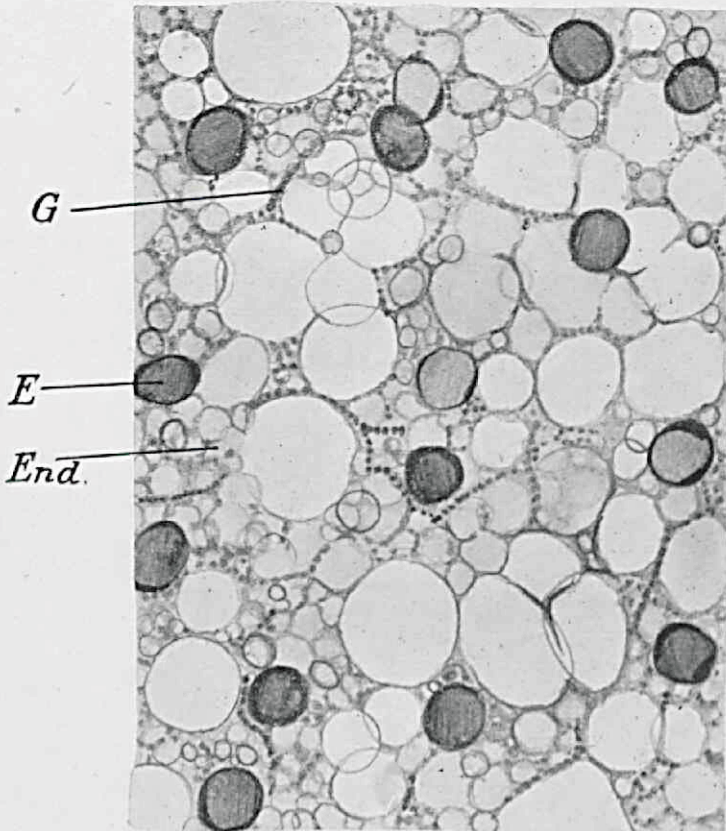


Fig. 26.
Tangentiale coupe. Flemming; Heidenhain.
End. endoplast, E. plasma-insluitel, G. granularij.

gen hebben, blijken echter fibrillen op te treden, in hoofdzaak dorso-ventraad gericht en in hoofdzaak in het middengedeelte van den endoplast gelegen. Zooals ook de granularijen het eerst in de meer binnenin gelegen deelen van den endoplast optreden, zoo ontstaan ook de eigenlijke fibrillen daar het eerst. In dit stadium, waarbij men nog goed de componenten kan onderscheiden, waaruit de fibrillen blijken opgebouwd te zijn, treden ook in de buitenste lagen van den endoplast granularijen op (fig. 27). Fig. 28 toont een nog ouder stadium, een dwarscoupe door een, dicht bij een

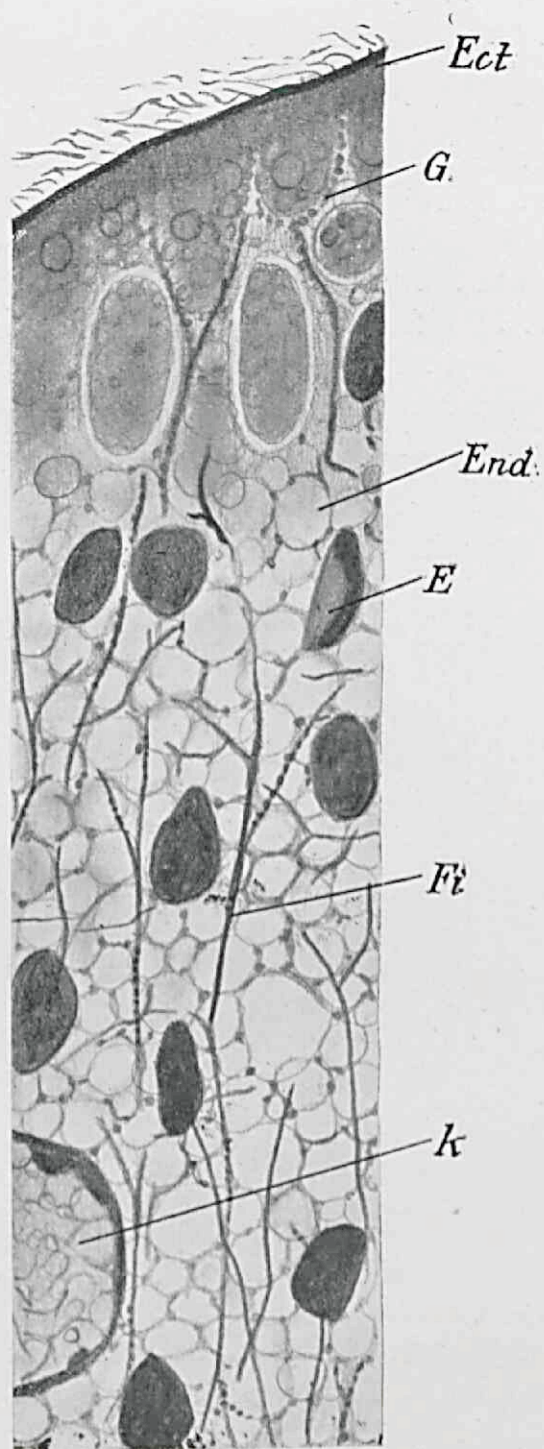


Fig. 27.

Dwarsche, tangentiale coupe. Flemming; Heidenhain.

Ect. ectoplast, End. endoplast, E. plasma-insluitel, G. granularij, Fi. fibril, K. kern,

der polen gelegen, deel van het dier, waarbij geen afzonderlijke granula meer in de fibrillen te zien zijn. Dit, zoowel als het vorig stadium, bevinden zich in den pas gemetamorphoseerden jongen kikvorsch. In begin September vindt men in de, pas enkele maanden oude, jonge kikvorschen de onvolwassen *Opalina*-stadiën, waarvan het fibrillensysteem in fig. 19—22 afgebeeld is. Einde September en begin October verdwijnen de fibrillen, eerst de netvormig gerangschikte; men treft dan nog stadiën aan, waarin alleen de dorso-ventrale fibrillen aanwezig zijn, de rest is reeds ver-

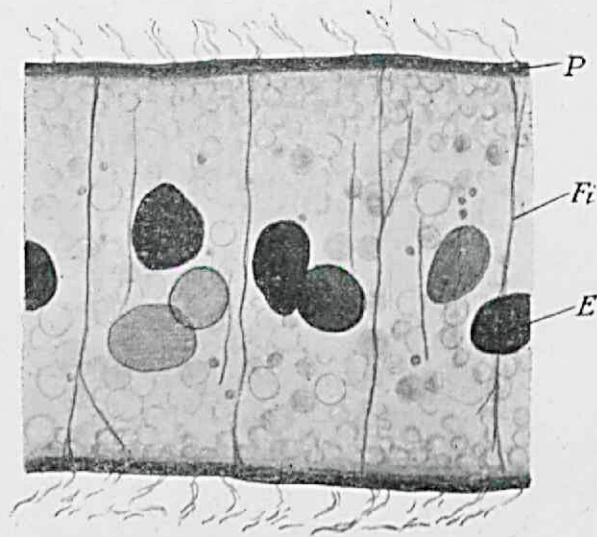


Fig. 28.

Dwarscoupe. Flemming; Heidenhain.

E. plasma-insluitel, Fi. fibril, P. pellicula, schuin oplopend, vandaar de breedte.

dwenen (fig. 29). Deze dorso-ventrale fibrillen blijken dus het langst stand te houden. Het verdwijnen van de fibrillen heeft plaats in den tijd, dat de plasmastrengen zich beginnen te verdikken! Bij nog oudere, — bijna volwassen — en volwassen dieren is geen spoor van fibrillen te bekennen (fig. 30—32). Uit fig. 32 zou men den indruk kunnen krijgen een fibrillaire structuur te zien (*), het is echter een dwarsdoorsnede van een loodrecht op het vlak van teekening staanden plasmaband, die zich daardoor scherper tegen het daaronderliggende plasma afteekent.

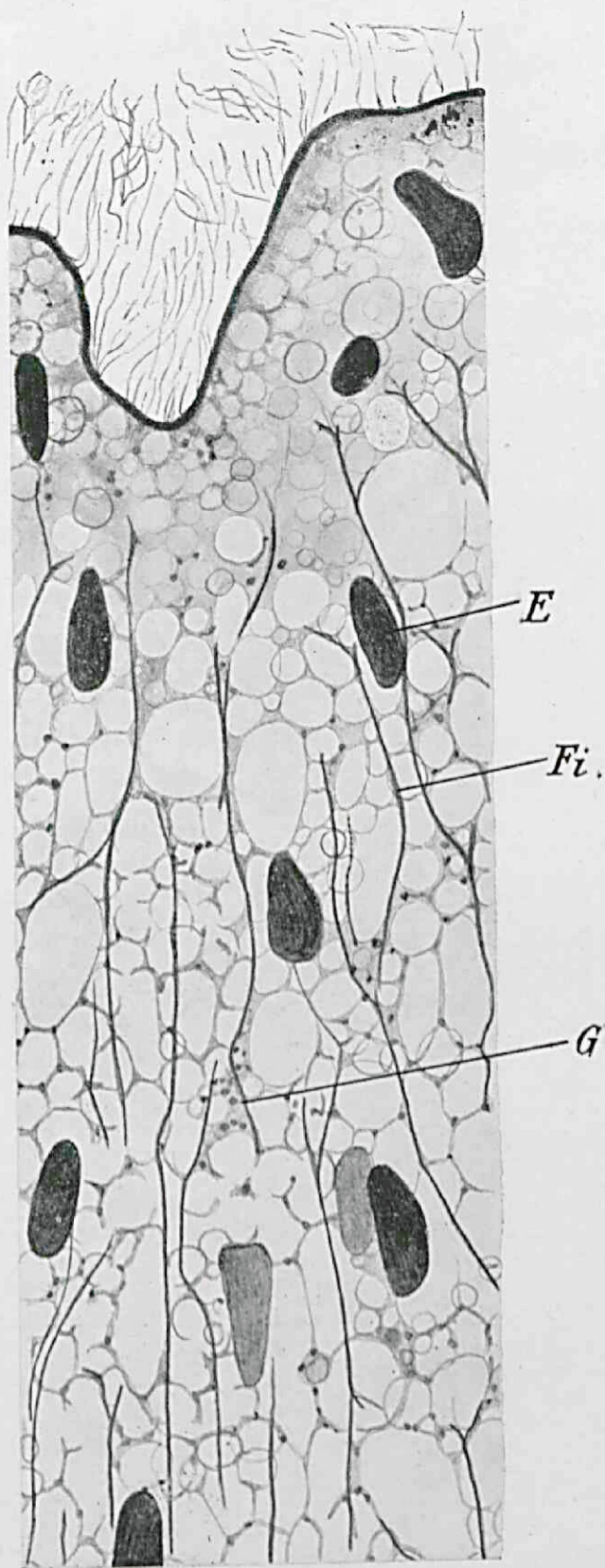


Fig. 29.
Dwarscoupe. Flemming; Heidenhain.
E, plasma-insluitel, Fi, fibril, G, granula.

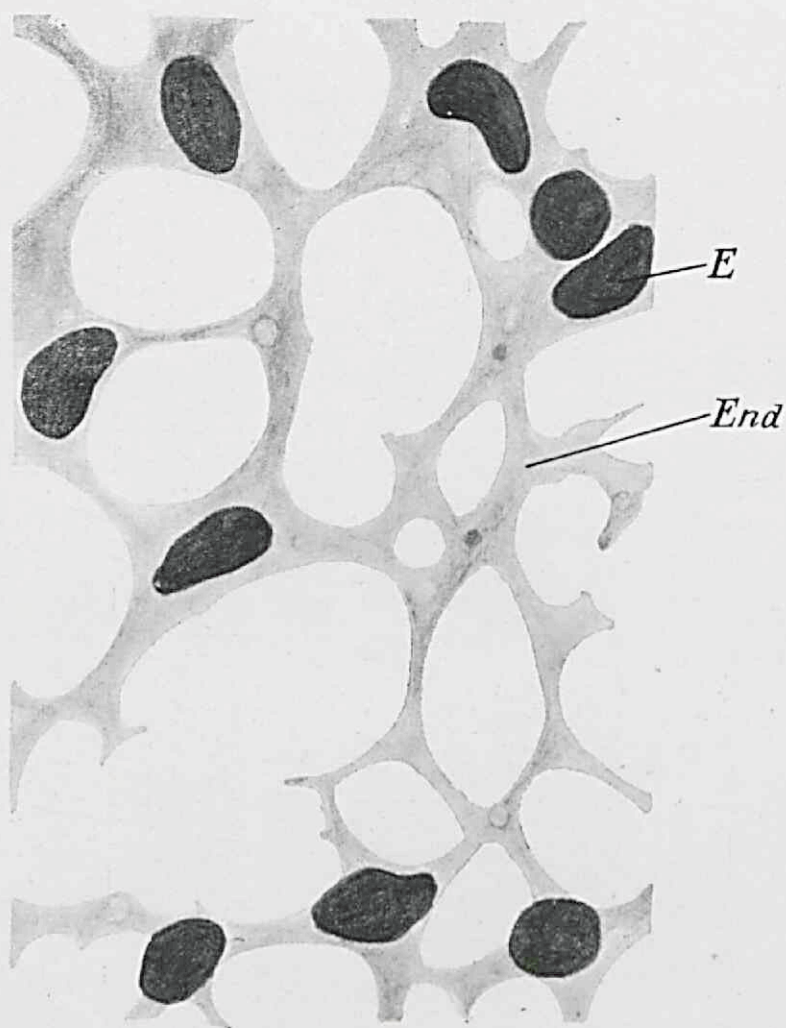


Fig. 30.
Tangentiale coupe. Flemming; Flemm. drickleuring.
End. endoplast, E. plasma-insluitel.

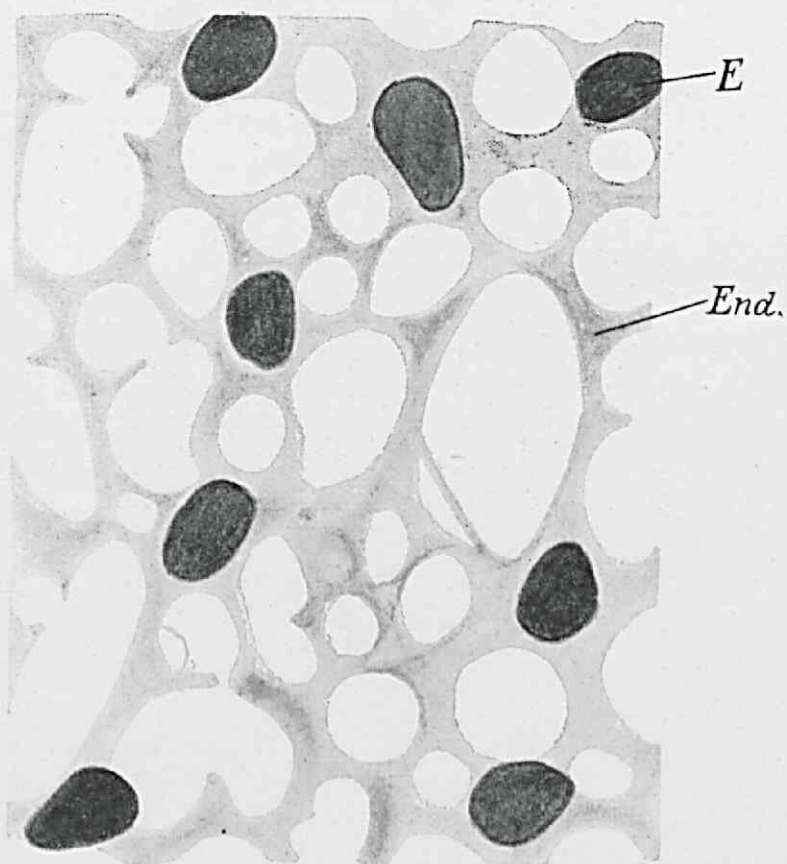


Fig. 31.
Dwarscoupe. Flemming; Flemm. driekleurig.
End. endoplast, E. plasma-insluitel.

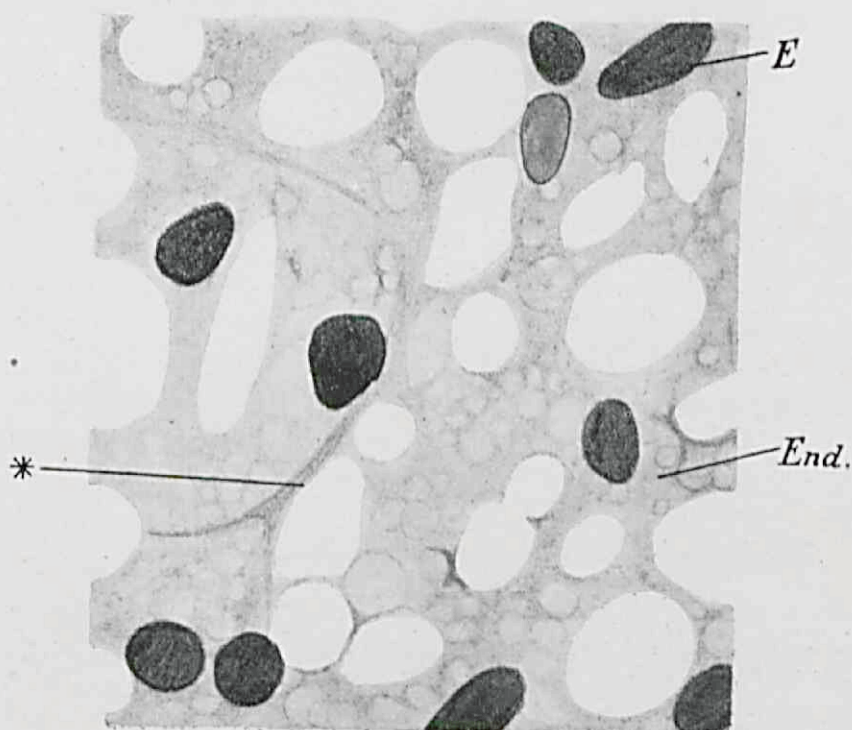


Fig. 32.
Longitudinale coupe. Flemming; Flemm. driekleurig.
End. endoplast, E. plasma-insluitel, *. zie tekst.

Bij de cystevorming treden weer fibrillen op, opgebouwd uit eveneens opnieuw in het plasma optredende granula. In fig. 33, 34 en 38 zijn 3 verschillende deelen van hetzelfde dier weergegeven, een stadium, iets grooter dan dat van fig. 27. Deze 3 figuren demonstreeren, wel op zeer duidelijke wijze, de snelle veranderingen en de snelheid van het proces, dat bij de cystevorming plaats vindt en dat in tegengestelde richting verloopt als bij den

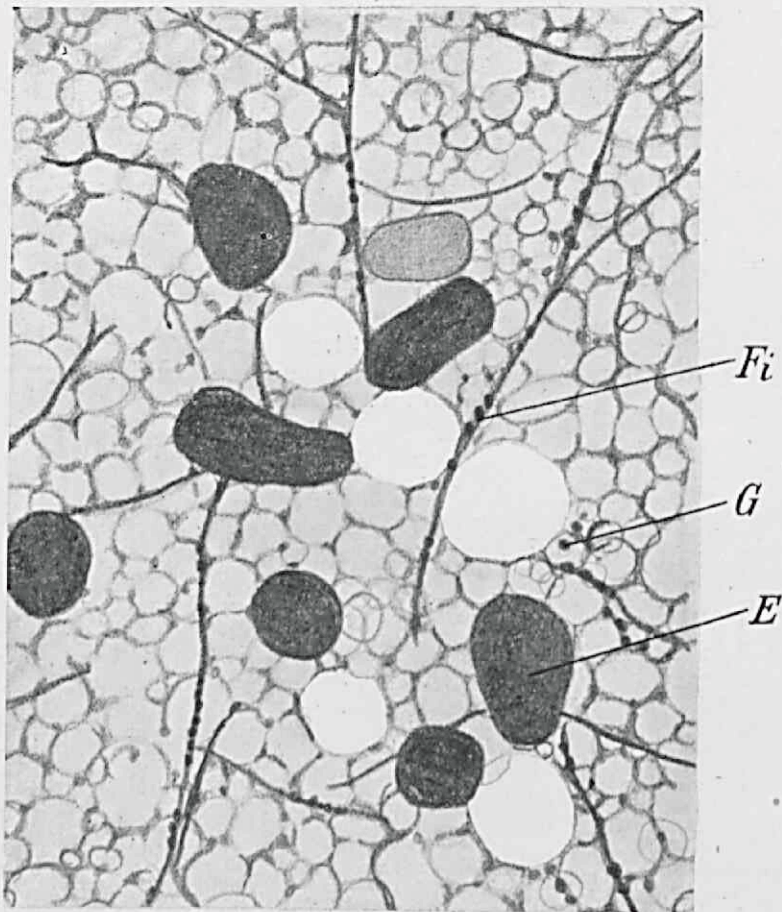


Fig. 33.
Tangentiaal-longitudinale coupe. Flemming; Heidenhain.
E. plasma-insluitsel, Fi. fibril, G. granula.

groei. Terwijl bij den groei de geheele endoplast ongeveer gelijktijdig (de buitenste laag uitgezonderd) dezelfde processen door-

maakt, blijken hier verschillende deelen ook te dien opzichte te verschillen. In het anterieure gedeelte (fig. 34) is reeds geen spoor

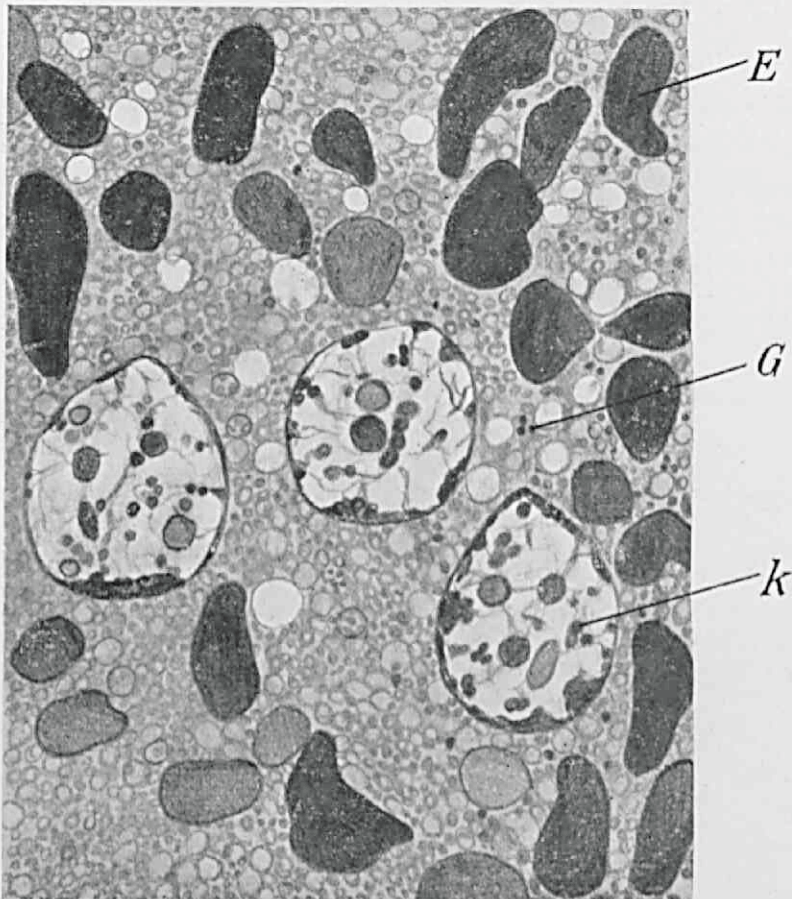


Fig. 34.
Tangentiaal-longitudinale coupe. Flemming; Heidenhain.
E. plasma-insluitel, G. granula, K. kern.

van fibrillen meer te bekenen, slechts verspreide granula; het plasma bevindt zich in een toestand als in fig. 24. In het midden- en posterieure deel (fig. 33 en 38) bevindt het plasma met de fibrillen zich in een toestand als in fig. 27. De fibrillen zijn echter niet uitgesproken dorso-ventraal gerangschikt, maar meer verspreid; een fibrillair netwerk is niet te zien. Vermoedelijk treedt dit bij het snelle deelingsproces ook niet als zoodanig op. Bij dit

proces wordt dus duidelijk gedemonstreerd, dat de veranderingen in het plasma en in de fibrillen, bij het cystevormingsproces optredend, van de anteriore naar de posterieure pool voortschrijden, een volgorde, die ook, zooals wij zagen, bij de vorming der ciliënrijen tot uiting komt.

De fibrillen worden gevormd uit granula, die zich in rijen rangschikken. Fig. 24, 26 en 27 demonstreeren dit op afdoende wijze. Zeer goed blijkt deze opbouw uit met kal. bichromaat behandelde preparaten. Fig. 20 (*) en fig. 35 mogen hiervoor als bewijs

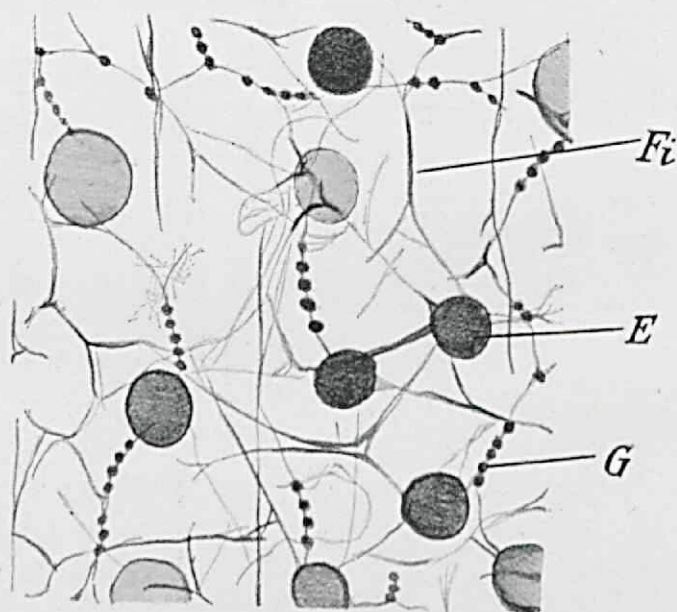


Fig. 35.

Kal. bichromaat; Heidenhain.
E. plasma-insluitel, Fi. fibril, G. granula.

gelden. Uit het feit, dat de fibrillen uit granula opgebouwd worden, verklaart zich tevens, waarom de jongere stadiën rijker aan granula zijn dan de oudere.

Wat stellen deze granula voor? Ik heb noch de granularijen, noch de eigenlijke fibrillen, in het levende dier kunnen waarnemen, wel kleine korreltjes in het plasma, waarvan ik natuurlijk niet weet, of zij de componenten zijn, waaruit de fibrillen gevormd worden. Ook met vitaalkleurstoffen mocht ik er niet in slagen fibrillen aan

te toonen, evenmin als zulks Peschkowsky (1927, pag. 41) bij *Holosticha* gelukt was.

Volgens Schneider's theorie (pag. 84—89) wordt het skelet of linom van *Opalina* opgebouwd uit draadvormig gerangschikte-, submicroscopische en microscopisch aantoonbare granula, z.g. tagmen of „Struktursubstanz”, ontstaand uit, en weer oploosend in de intertagmale substantie als „Lösungsmittel”. Deze theorie geeft dus reeds de mogelijkheid van een verdwijnen van de fibrillen in het normale levende dier.

Over het verband tusschen de lipoïden van de intertagmale substantie en de tagmen, heeft Schn. zich als volgt uitgedrukt: „Will man die Beziehung des Lipoids zu den Tagmen zutreffend charakterisieren, so empfiehlt es sich, jenes als Arbeitssubstanz, diese insgesamt als lebende Substanz zu bezeichnen. Die lebende Substanz bedient sich des Lipoids für bestimmte, vor allem für Bewegungszwecke.”

Volgens een andere, door velen gehuldigde, opvatting, ontstaan de fibrillen uit mitochondriën. Over het wezen van deze mitochondriën is men het nog oneens. Ik verwijs hierbij echter naar de uitgebreide literatuur. Wanneer Alexeieff (1928, pag. 280) deze vormingen als volgt karakteriseert: „Dès lors on comprend que les mitochondries sensu largo — complexe lipoïdo-protéïque étant support des deux sortes de ferments — lipase et protéase — sont pour ainsi dire omnipotents”, en verder zegt: „Qu'on se rappelle que même pour les différenciations permanentes dans les cellules hautement spécialisées comme point de départ on trouve les mitochondries. Ainsi les myofibrilles dans les cellules musculaires, les neurofibrilles dans la cellule nerveuse, ont été formées à partir des mitochondries”, dan lijkt het mij waarschijnlijk, dat Schneider's „tagmen” onder het begrip mitochondriën zullen vallen. Hoewel ik de Benda'sche mitochondriënkleuring niet toegepast heb, lijkt het mij daarom toch geoorloofd te zeggen, dat de fibrillen van *Opalina* uit mitochondriën (chondriosomen) opgebouwd worden.

Het morphologisch onderzoek van de verschillende, op elkaar volgende, ontwikkelingsstadiën van *O. ranarum*, blijkt het ver-

rassend resultaat te geven, dat het fibrillensysteem slechts gedurende een bepaalden ontwikkelingstoestand van het dier aanwezig is, daarna echter verdwijnt. Daarmede vervalt de stelling, dat de vorm van *O. ranarum* door het fibrillensysteem behouden blijft, geenszins echter de mogelijkheid, dat deze fibrillen als morphonemen optevatten zijn, zooals zij door ten Kate beschreven werden.

Wel heeft dit onderzoek mij geleerd, dat een neurofibrillensysteem bij deze soort niet bestaat; de, als zoodanig beschreven, vormingen hebben, zooals gezegd, een anderen bouw en een andere betekenis. Wil men, inplaats van aan het plasma in het algemeen, toch aan een bepaalde vorming een prikkelgeleidende functie toeschrijven, dan zal men hiervoor de lijsten of fibrillen moeten kiezen, die de basaalkorrels van dezelfde rijen onderling verbinden. Ik zal mij, uit gebrek aan bewijs, niet daartegen verzetten.

Dit fibrillensysteem is reeds bij de jonge *Opalina*'s in aanleg aanwezig, in dieren, die, op doorsnede, nog een min of meer ronden vorm hebben. Daarbij worden de dorso-ventrale fibrillen het eerst aangelegd (Fig. 24). Eerst wanneer de platte vorm in de ontwikkeling begint op te treden, blijkt een eigenlijk fibrillair systeem aanwezig te zijn, in hoofdzaak dorso-ventraad georiënteerd, tusschen de vlakke zijden uitgespannen. In dit stadium vindt men in het dier een plasmanetwerk met dunne plasmaverbindingen. Wanneer deze plasmaverbindingen dikker worden, waardoor het plasma een compacteren bouw krijgt, verdwijnen de fibrillen.

Uit deze twee feiten meen ik de conclusie te mogen trekken, dat het fibrillensysteem in die bepaalde ontwikkelingsperiode van het dier een vormbehoudende functie heeft, welke later door het plasma wordt overgenomen.

Bresslau (1928) heeft fibrillen door georiënteerde, op een bepaalde wijze gerichte, trek- en drukspanningen zien optreden. Tegen de mogelijkheid, dat het fibrilaire netwerk van *Opalina* op deze wijze zou ontstaan, spreekt in de eerste plaats het feit, dat dit fibrillensysteem reeds van te voren blijkt te worden aangelegd, maar ook de wijze, waarop deze fibrillen zich met de basaalkorrels der ciliën verbinden. Uit alles blijkt, dat men hier te doen heeft met vormbehoudende elementen, met morphonemen. De interpretatie van ten Kate lijkt mij de eenig mogelijke.

Waar de fibrillen, bij het sterker worden van den plasmabouw, blijken te verdwijnen, heb ik gemeend te mogen concludeeren, dat het plasma dan de vormbehoudende taak overneemt. Wanneer deze conclusie, gevestigd door de beelden van gefixeerd materiaal, juist is, kan het plasma niet in „vloeistof” vorm aanwezig zijn, doch moet het een vastere consistentie hebben. Deze vastere samenstelling blijkt, wanneer men het levende dier met den micromanipulator aansnijdt; er treedt dan geen plasma naar buiten, slechts eenige enchylemadroppels. Bij *Nyctotherus* ziet men het plasma in zoo'n geval naar buiten stróómen. Men kan een dier dwars doorsnijden zoodat men 2 aparte deelen krijgt, zonder dat daarbij plasma naar buiten komt en zonder dat de vorm van deze 2 deelen blijkt te veranderen. Het anterieure gedeelte kan zich daarna verder bewegen, terwijl het posterieure deel onbeweeglijk liggen blijft. Het centrum van de ciliënbeweging ligt dus in het anterieure deel, vermoedelijk in de groeizône.

Het lijkt mij niet waarschijnlijk, dat de vastheid van het plasma in het volwassen dier veroorzaakt zou worden door de viscositeit der chondriosomen, terwijl het plasma dan zelf toch vloeibaar zou kunnen zijn (Levi, 1927, pag. 71), want, zooals gezegd, is het plasma in de volwassen stadiën vrijwel zonder granula, zonder chondriosomen. Hierin verschilt *Opalina* van een soort als *Nyctotherus*. Mogelijk is het natuurlijk, dat de viscositeit wel een rol speelt in de jonge stadiën, waarin veel chondriosomen voorkomen.

In ieder geval blijkt het „kaasachtige” plasma (Calkins) ook in de volwassen *Opalina*'s aanwezig te zijn en als vormbehoudend te mogen worden beschouwd. Het is gemakkelijk te begrijpen, hoe goed men van dergelijke dieren uitstrijkpreparaten maken kan. Het plasma „gelatineert” (Bresslau, 1921) op het oogenblik, dat de laatste hoeveelheid vloeistof, waarin de dieren zich bevinden, verdampt is. Men krijgt hiervan een duidelijk beeld, wanneer men een dier, in een geïsoleerden druppel van de vloeistof geplaatst, met den micromanipulator aansnijdt op het oogenblik, dat het laatste restje van die vloeistof verdampt is. Er treden geen enchylemadroppels meer naar buiten. De sterke pellicula maakt verdere voorzorgsmaatregelen overbodig; men behoeft de dieren niet

in een bepaalde, gemakkelijk gelatineerbare vloeistof uittestrijken.

Het is zeer moeilijk het aandeel te bepalen, dat de pellicula bij het behouden van den vorm heeft. Dat zij daartoe niet alleen in staat is, blijkt uit de onvolwassen stadiën, waarin een fibrillensysteem ter versterking optreedt. Wanneer men bij een volwassen *Opalina* het plasma door druk zooveel mogelijk uit het dier verwijderd, schrompelt de pellicula in elkaar. Bij een gestorven dier, blijkt de pellicula het eerst op te lossen, het dier, d.w.z. het plasma, behoudt echter zijn oorspronkelijken vorm. Daaruit blijkt, dat de pellicula in de volwassen en bijna volwassen stadiën op zijn hoogst slechts een ondergeschikte vormbehoudende rol speelt; veeleer moet haar functie als een, het dier beschuttende, gedacht worden. Daarom geloof ik ook, dat dieren, die een „kaasachtig” plasma bezitten, een uitzondering kunnen maken op de theorie van Koltzoff.

De jonge stadiën heb ik niet met den micromanipulator bewerkt; misschien treedt bij deze de vormbehoudende functie van de pellicula, tegenover die van het plasma, meer op den voorgrond. Een vergelijking van de in mijn onderzoek beschreven, ontwikkelingsprocessen in de Protozoëncel met die, welke in de Metazoëncel plaats vinden, heb ik niet kunnen treffen, omdat mij geen literatuur daarover bekend is.

VII. *De plasma-insluitels.*

In dit hoofdstuk zal men niet de resultaten vinden van een uitgebreid onderzoek over de eigenaardige lichaampjes, die in het plasma van *Opalina ranarum* voorkomen; slechts enkele gegevens uit het vele, voor het eigenlijke onderzoek bewerkte materiaal. Waar er, ondanks de talrijke onderzoekingen, toch nog onzekerheid heerscht over het wezen van die lichaampjes, leek het mij niet overbodig, mijn eigen waarnemingen hierover mede te deelen. Later hoop ik nog eens, in een speciaal onderzoek, op die plasma-insluitels terug te komen, waaraan ik dan tevens een uitgebreider literatuurbespreking zal verbinden. Hier geef ik in het kort de conclusies, waartoe de verschillende onderzoekers gekomen zijn.

Zeller, de ontdekker van de plasma-insluitels, die hij als „Scheibenförmige Körperchen” beschreef, heeft geen verdere beschouwingen aan deze ontdekking vastgeknoopt. Hoewel de latere onderzoekers nogal verschillen in hun opvattingen, komen toch alle beschouwingen in hoofdzaak daarin overeen, dat de plasma-insluitels een rol zouden spelen bij de stofwisselingsprocessen. Eerst Tönniges (1898), later Metcalf (1909) en Konsuloff (1922) hebben getracht te bewijzen, dat de insluitels geen secreet-producten zouden zijn. Tönniges op grond van het microchemisch onderzoek en de, bij de insluitels waargenomen, deelingen; Metcalf na een uitgebreid microchemisch onderzoek en Konsuloff uit het feit, dat bij *O. ranarum* een excretorisch orgaan aanwezig zou zijn. Dit laatste argument lijkt mij echter vrij zwak, omdat het voorkomen van een dergelijk orgaan nog in het geheel niet vaststaat.

Metcalf en Konsuloff zijn de eenigste onderzoekers, die een speciaal excretie-apparaat bij *O. dimidiata* en *O. ranarum* waargenomen hebben. Metcalf zag bij jonge, nooit bij oude *O. dimidiata*'s een rij van opelkaar volgende vacuolen in het posterieure deel van het dier. Voor het bestaan van een uitmondingsplaats van deze vacuolen zouden de korreltjes spreken, die aan het achtereinde van die dieren zichtbaar waren. In het vorig hoofdstuk heb ik er reeds op gewezen, dat er nog een andere mogelijkheid bestaat,

waardoor de aanwezigheid van deze korreltjes verklaard zou kunnen worden. M. nam bovendien waar, dat juist die *Opalina*'s, welke als vrijzwemmende dieren door de kikkerlarven opgenomen werden, een bijzonder goed ontwikkeld vacuolensysteem bezaten. Dit pleit m.i. meer voor de mogelijkheid, dat deze vacuolen bij abnormale dieren optreden, dan dat zij normaliter aanwezig zullen zijn. Een beeld, als door Metcalf in fig. A weergegeven, heb ik meermalen in de jonge stadiën gezien, alleen echter in preparaten, die niet met de noodige zorg behandeld worden. Konsuloff zag een excretie-apparaat, dat met meerdere openingen aan de posterieure zijde naar buiten mondde, vooral bij dieren, die in cultures 1 of 2 dagen honger geleden hadden. Zoowel de cultuurvloei-stof als de hongertoestand zijn in dit geval abnormale factoren, waardoor waarschijnlijk een abnormaal plasmabeeld zal kunnen ontstaan. In al het materiaal heb ik nooit een stadium als het door Konsuloff in tekstfig. 4 afgebeelde waargenomen. Ik geloof, dat zoowel Metcalf als Konsuloff hierin conclusies hebben getrokken uit artefacten.

Daarmede wil ik echter niet zeggen, dat ik zelf van meening ben, dat de insluitsels als excreetproducten moeten worden beschouwd. Het eenige, wat ik daartegen te berde kan brengen, is het feit, dat in alle ontwikkelingsstadiën van het dier, ook in de cysten en in de gameten, plasma-insluitsels voorkomen. Hetzelfde heeft Metcalf waargenomen; ook Léger en Duboscq (1904) hebben in fig. 8, pl. XIV een microgameet van *O. saturnalis* afgebeeld, waarin zich talrijke plasma-insluitsels bevinden. Konsuloff zag daarentegen alle gameten- en cystensstadiën zonder insluitsels; Tönniges alleen de geëncysteerde dieren.

De mogelijkheid, dat het reservestoffen zouden zijn, is door Konsuloff verworpen op grond van het feit, dat dieren, die langen tijd gehongerd hebben, toch nog het normale aantal insluitsels blijken te bezitten. Hierbij moet ik echter een waarneming vermelden, die er op zou kunnen wijzen, dat bij bepaalde levensprocessen toch bouwstoffen door de insluitsels geleverd kunnen worden. Gedurende het deelingsproces vóór de encyστεering, vindt men in het plasma van dieren, die daaraan deelnemen, ook in de geëncysteër-

de, een groot aantal droppeltjes van een vetachtige substantie, zooals kleuring met sudan III en osmiumzuur doet zien. Buiten dezen tijd kan men de droppeltjes ook aantreffen, maar in veel kleiner aantal. Zoowel Nussbaum als Barfurth schijnen deze „vet“-droppels waargenomen te hebben. Na Schaudinn-finatie en kleuring met fuchsine S, zag ik in dergelijke stadiën naast de rood-gekleurde plasma-insluitsels een groot aantal ongekleurde „vet“-droppels. Daarnaast echter ook overgangen, waarbij het den indruk maakte, alsof verschillende plasma-insluitsels in „vet“-droppels omgevormd werden. Gezien den grooten rijkdom aan lipoïden, die de insluitsels, na behandeling met osmiumzuur, blijken te bezitten, lijkt mij dit niet onwaarschijnlijk. In de laatste onderzoekingen (King en Gatenby, 1926; Sokolska, 1927) worden, juist op grond van deze reacties, de insluitsels als Golgi'sche elementen beschouwd. Ongetwijfeld zal de grootere rijkdom aan „vet“-droppels in het plasma, in nauw verband staan met de encysteeringsprocessen. Glycogeen heb ik met de Langhans'sche methode nooit kunnen aantoonen; volgens Barfurth komt glycogeen echter ook niet constant voor.

Tönniges heeft reeds in 1898 de mogelijkheid verondersteld, dat bij *Opalina* de macronucleus in den vorm van deze plasma-insluitsels aanwezig zou zijn. Hij zag herhaaldelijk deelingen optreden. Later (1919) heeft T. ook het ontstaan uit de kern beschreven en afgebeeld, waarbij hij den naam „Makrochromidiën“ invoerde, „um anzudeuten, dass der Makronucleus in Form von Chromidien das Plasma des Opalinenkörpers durchsetzt“. Als bewijs hiervoor zouden de figuren 11—13 moeten dienen; ongetwijfeld zijn dit echter afbeeldingen van artefacten. Het eenige motief voor de macronucleus-natuur van de insluitsels, zou dus gelegen zijn in de waargenomen mogelijkheid, zich te deelen. Ook Konsuloff geeft dit alleen als reden op. Noch Metcalf, noch Bezzenberger hebben deelingen gezien. Metcalf zegt hierover: „I am unable to convince myself that the endosarc spherules divide“. Ik zou mij volkomen bij deze woorden kunnen aansluiten, omdat ikzelf ook nooit een deeling zag optreden, wanneer mijn preparaten mij daaromtrent meer zekerheid lieten. De vraag, waarom zij dat niet doen, zal ik later bespreken.

In ieder geval heeft Reichenow (1928) met de „Nuklealfärbung“-methode, geen positieve reactie bij de plasma-insluitels waargenomen. Dit pleit tegen hun macronucleus-natuur.

Ditzelfde argument kan aangevoerd worden tegen de opvattingen van de onderzoekers, die meenen, dat de insluitels uit chromatine-massa's ontstaan, die uit de kernen gestooten worden. Conte en Vaney (1902) beweerden dit proces van het begin tot het einde toe te hebben kunnen vervolgen. Bezzenberger en Metcalf hielden het verband met uitgestooten kernchromatine voor mogelijk, terwijl Tönniges, zooals reeds gezegd, op die gronden de insluitels als „Makrochromidien“ beschreef. Neresheimer's hypothese, die de insluitels als het achromatische deel van de generatieve kernen beschouwt, lijkt mij wel een zeer onwaarschijnlijke interpretatie van de, in iederen encyστεeringstijd optredende, sterk vergroote plasma-insluitels.

Het feit, dat de plasma-insluitels eenigszins overeenkomen met chromatine, wat de kleurbaarheid betreft, heeft Metcalf (1909), pag. 245) op de volgende wijze trachten te verklaren: „It seems well-nigh certain, that the chromatin spherules dissolve, and it is probable that they pass in liquid form through the nuclear membrane into the cytoplasm. It is not improbable that, having reached the cytoplasm, this material reforms in the endoplasmic spherules. Very likely, however, material from the cytoplasm as well is used in the formation of the cytoplasmic spherules“.

In mijn preparaten heb ik geen enkele maal het uittreden van chromatine-massa's uit de kernen kunnen waarnemen. Zeer positief hebben zich hierover Rumjantzew en Wermel uitgelaten (1925, pag. 260): „jetzt aber können wir vollkommen ruhig behaupten, dass diese Beschreibungen des Austritts und des Ausschwitzens hauptsächlich von einer schlechten Fixation herrühren (s. darüber Duesberg 1912, Kemnitz 1912). Wir wollen auch darauf hinweisen, dass diejenigen Forscher, welche das Austreten des Chromatins beschreiben (wenn wir annehmen, dass ein solches Austreten überhaupt in Form von α - und Submikronen möglich ist), kein einziges Mal zur Bestätigung eine genaue histochemische Analyse des austretenden Stoffes vorgenommen, sich hingegen nur

auf färberische und, man muss sagen, ziemlich einfache Methoden beschränkt haben". Hoe gemakkelijk men zich kan vergissen met de interpretatie van een verschijnsel, toont mijn fig. 36, waaruit men zou kunnen concludeeren, dat de insluitsels uit de kernen

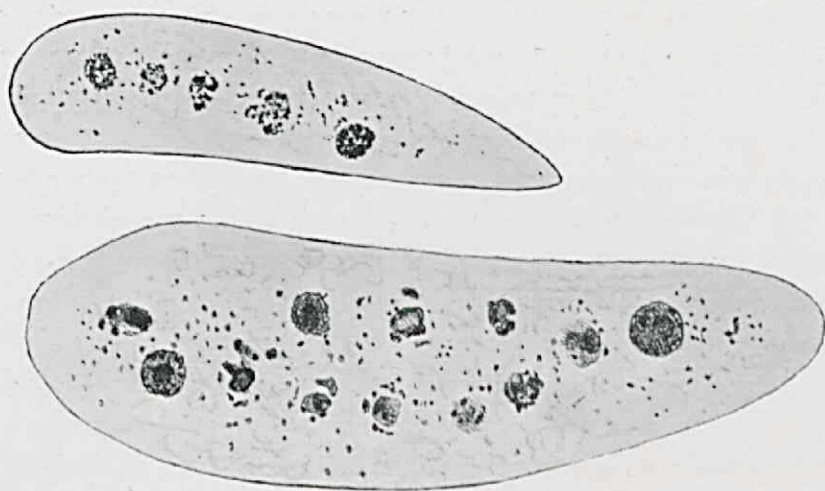


Fig. 36.
Gewoon gedroogd; Delafield.

ontstaan. Evenwel vertoonen slechts dit en een ander preparaat, van volwassen stadiën, op dezelfde wijze behandeld, deze beelden. Zij bleken ontstaan te zijn door een foutieve behandeling.

De plasma-insluitsels zijn niet dubbelbrekend, evenmin als eenig ander deel van *Opalina*, de kristallen, die vooral in de encysteeringsperiode, ook in de geëncysteerde dieren, veelvuldig voorkomen, uitgezonderd.

Kunstler en Gineste (1905) hebben nog een andere meening over de plasma-insluitsels. Zij zagen, dat de kern van deze insluitsels, dat: „le corpuscule central pouvait subir des destinées diverses et que dans une foule de cas, il était le porteur des granules sécrétés”. Daarom beschouwen zij de plasma-insluitsels als een „véritable appareil de sécrétion”. Fauré-Fremiet (1905) heeft zich bij deze meening aangesloten; hij stelde de insluitsels, die hij „sphéropastes” noemde, op één lijn met de celkern, in tegenstelling met Kunstler, die een protoplasmatischen bouw waarnam.

Over het ontstaan van de plasma-insluitsels, waarover dus nog

niets met zekerheid bekend blijkt te zijn, ondanks de verschillende gegeven benamingen, kan ik geen mededeelingen doen. Alle ontwikkelingsstadiën, inclusief de gameten en de geëncysteerde dieren, waren in het bezit van deze insluitsels; in oudere dieren waren er meer dan in jongere. Vermoedelijk zal er wel een verband bestaan tusschen de grootte van het dier en het aantal der insluitsels.

Metcalf (1909) heeft een scherpe scheiding gemaakt tusschen de ecto- en endoplasma-insluitsels. Slechts in één geval, bij *O. obtrigona*, zag hij endoplasma-insluitsels ook tusschen de groote vacuolen van het ectoplasma. Op pag. 246 zegt hij: „I have seen nothing to indicate any genetic connection between the spherules of the endosarc and those of the ectosarc, except, that with iron-haematoxylin, when very thoroughly extracted, one sometimes finds, in the ectosarc, spherules showing an internally granular and fibrous appearance, exactly similar to that seen in the endosarc spherules”. Met alle andere kleurstoffen was er een verschil in kleur tusschen de ecto- en endoplasma-insluitsels. Dit verschil in kleur heb ik zelf, na de Mallory'sche kleuring, waargenomen. Is het echter wel getolereerd om uit een verschil in kleur, verkregen door behandeling met kleurstoffen, waarvan men de werking niet in finessen kent, te concludeeren, dat de aldus gekleurde objecten ook niets met elkaar te maken zullen hebben? De kleurverschillen lijken mij geen reden te veronderstellen, dat de ectoplasma-insluitsels, die Metcalf beschreef, niet dezelfde vormen zouden kunnen zijn als de endoplasma-insluitsels, alleen met een andere chemische samenstelling, als fasen van een bepaald proces. Het gaat er slechts om, aan te toonen, dat beide vormen in elkaar overgaan.

Reeds in het levende dier kan men zien, dat geen scherpe scheiding tusschen de beide soorten insluitsels bestaat. Bij kleuring met neutraalrood zijn alle mogelijke overgangen te zien tusschen de verschillende uitsluitsels. Men kan onmogelijk van 2 categorieën spreken, zooals Metcalf deed. Integendeel, het kan slechts den indruk maken, dat men verschillende fasen ziet van één proces. Met Janusgroen waren deze verschillen minder uitgesproken; deze vloeistof kleurt echter veel flauwer, zoodat daardoor vanzelf min-

der duidelijke contrasten mogelijk zijn. Heel goed zijn dan de korreltjes te zien, die in de insluitsels liggen, en reeds door Kunstler, Fauré-Fremiet, Bezenberger en Metcalf beschreven zijn. In gefixeerd materiaal zal de duidelijkheid, waarmee de korreltjes gezien worden, sterk afhankelijk zijn van den graad van differentiatie. Zeer duidelijk waren zij te zien in de insluitsels van de buitenste laag van den endoplast, na kleuring met Flemming'sche drie-kleuring.

Uit fig. 37—41 blijkt m.i. overtuigend, dat er slechts één soort van insluitsels bestaat, waarvan men de verschillende fasen naast elkaar in het plasma ziet liggen, alle fasen van één en hetzelfde proces. Ik kan mij tenminste niet indenken, dat de insluitsels, die men in die buitenste laag van den endoplast naast elkaar ziet liggen, de buitenste in duidelijke, de meer naar binnen

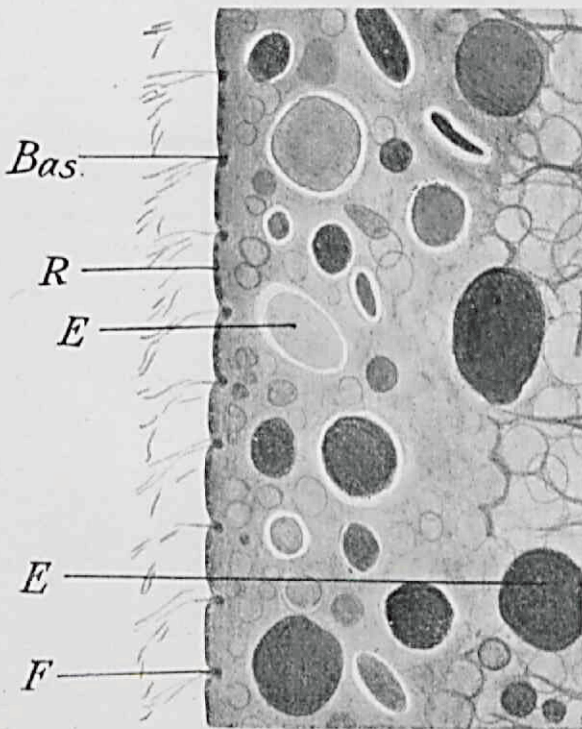


Fig. 37.

Dwarscoupe, Flemming; Heidenhain.

Bas. basaalkorrel, E. plasma-insluitsel, F. ciliëngroeve, R. pellicularichel.

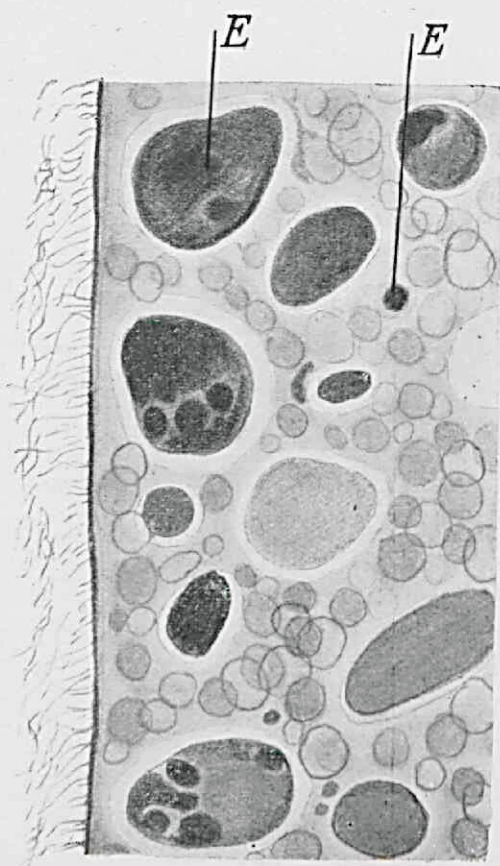


Fig. 38.
Longitudinale coupe. Flemming; Heidenhain.
E. plasma-insluitel.



Fig. 39.
Longitudinale coupe. Flemming; Heidenhain.
E. plasma-insluitel, K. kern, Se. secreetgranula.

gelegenen in minder duidelijke, of in het geheel niet in vacuolen gelegen, niets met elkaar te maken zouden hebben. In de diepere lagen van den endoplast zijn deze verschillen niet te zien; de zone, waarin zich het proces afspeelt, ligt aan den buitenkant, wat ook heel begrijpelijk is bij een dier, dat zich langs osmotischen weg voedt, en niet in het bezit is van een meer centraal gelegen vacuolensysteem, zooals dat bij *O. intestinalis* aangetroffen wordt.

Verschillende onderzoekers (Tönniges, Maier, Sokolska) zagen deze insluitsels in een bepaalde richting gerangschikt, parallel aan de beide vlakke zijden van het dier. Alleen in fig. 29 heb ik een dergelijke gerichtheid waargenomen.

Tönniges (1898) heeft de insluitsels „in inniger Verbindung mit den Strängen des protoplasmatischen Netzwerkes” beschreven. Daarmede kan ik het volkomen eens zijn; ik geloof tevens, dat dit ook de reden is, dat b.v. King en Gatenby gedacht hebben, dat de fibrillen, die toch in dit plasmatische netwerk verlopen, met die insluitsels verbonden zouden zijn.

Ik geloof, dat de figuren 37—41 de verschillende stadiën voorstellen van het proces, waarin de plasma-insluitsels een rol spelen, een naar mijn voorloopige opvatting secretorisch proces. In fig. 37 ziet men, dat de plasma-insluitsels in de buitenste laag van den endoplast in vacuolen komen te liggen. Ongetwijfeld heeft Metcalf dit ook waargenomen, waar hij in de ectoplasmalaag insluitsels beschreef, die overeenkwamen met die uit het endoplasma. In fig. 38 treden veranderingen in de insluitsels op; zij maken nu den indruk van conglomeraten. Een nog later stadium, waarin de secreetkorrels gevormd zijn, toont fig. 39. Een dergelijk stadium, van *O. saturnalis*, is ook reeds door Léger en Duboscq (pl. XIV, fig. 4) afgebeeld. Deze secreetkorrels zullen dienst doen bij de opname van het voedsel, misschien ook bij de extracellulaire vertering, die, volgens door Konsuloff genomen proeven, plaats moet hebben. Waarschijnlijk zijn de korrels, die men in fig. 40 direct onder den ectoplast ziet liggen, de op deze wijze gevormde secreetgranula, die na uitstooting of verdwijning op andere wijze, een toestand zullen achterlaten, als in fig. 41 weergegeven is. Ik heb niet kunnen nagaan, wat er verder met de talrijke kleine insluitsels

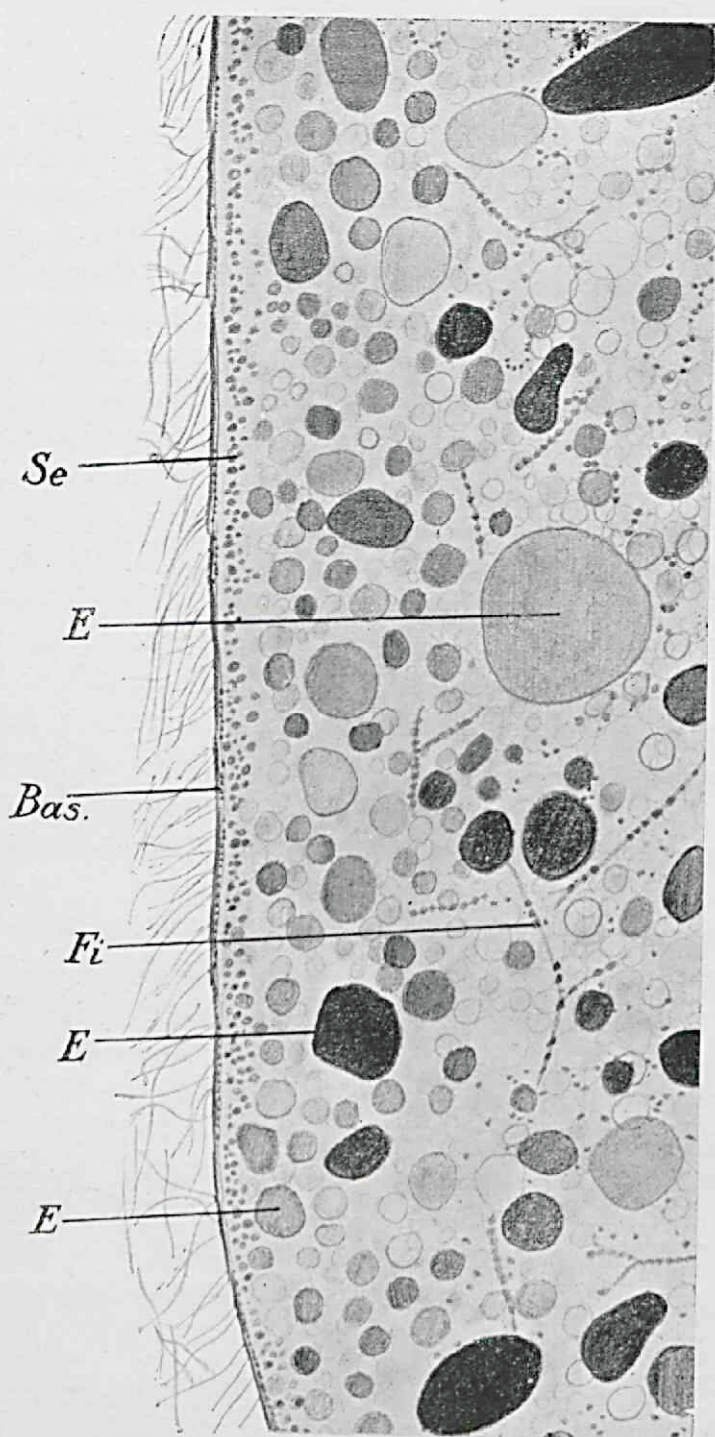


Fig. 40.
Tangential-longitudinale coupe. Flemming; Heidenhain.
Bas. basaalkorrel, E. plasma-insluitel, Fi. fibril, Se. secreetgranula.

gebeurt. Ongetwijfeld zijn zij identiek met de grootere, moeten

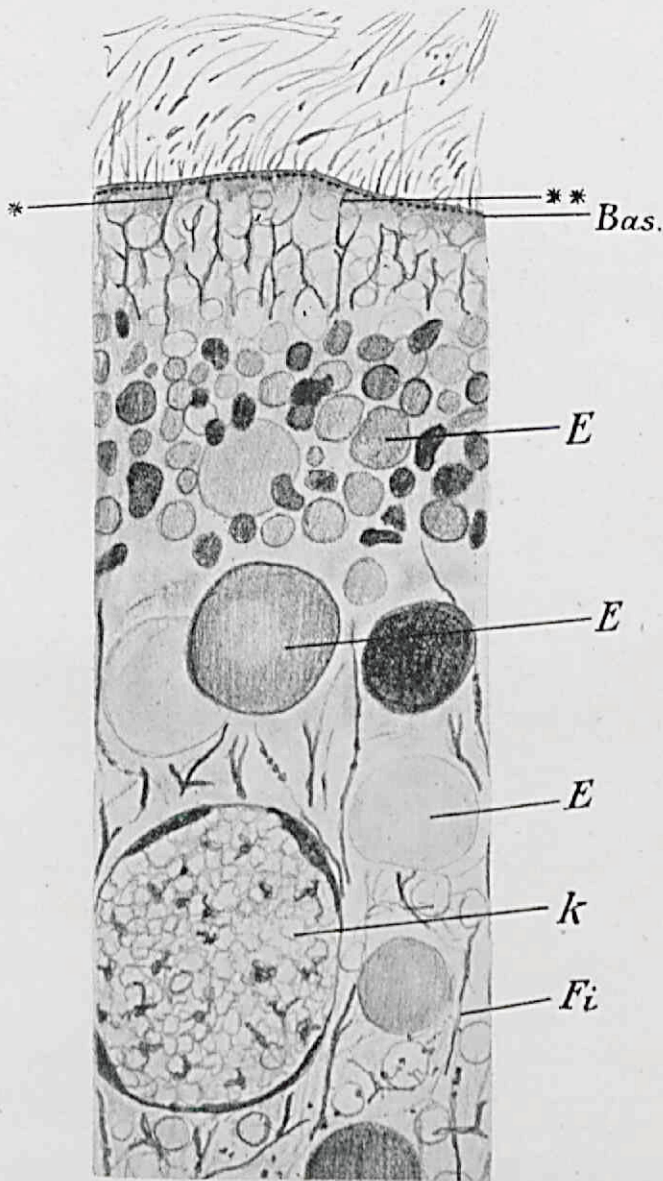


Fig. 41.

Longitudinale coupe. Flemming; Heidenhain.

Bas. basaalkorrel, E. plasma-insluitel, Fi. fibril, K. kern.

* en **, verbindingsen van basaalkorrels met fibrillen.

eigenlijk wel door deeling uit deze ontstaan zijn, omdat men in

de diepere lagen van den endoplast zulke grootte-verschillen niet aantreft. Daarom durf ik de mogelijkheid van deeling ook niet te ontkennen, al zag ik deze nooit optreden.

Het is natuurlijk de vraag, of de door mij gegeven interpretatie van dit proces wel juist is; gaarne geef ik mijn meening voor een betere.

In ieder geval meen ik wel met zekerheid te mogen zeggen, dat men hierbij te doen heeft met één proces, zoodat de vroegere indeeling in ecto- en endoplasma daarmee vervallen moet.

VIII. *Samenvatting van de voornaamste resultaten.*

1. De *Opalina*'s, die uit de, door de volwassen kikvorschen uitgescheiden, cysten te voorschijn komen, gedragen zich verschillend. Het eene deel vormt gameten; het andere deel groeit direct uit tot den volwassen vorm (pag. 29).
2. Het lichaam van *O. ranarum* is te verdeelen in een ectoplast en een endoplast. De buitenste laag van den endoplast, waarin de groote vacuolen voorkomen, is tot dusver ten onrechte als ectoplasmatisch beschreven (pag. 32 en 92).
3. De binnenste laag van den ectoplast vormt geen neurfibrillair netwerk. De als zoodanig beschreven vormingen dienen voor de versterking van den ectoplast, voor de vorming van de basaalkorrels der ciliën en voor de voeding van deze laatsten (pag. 47—48).
4. De basaalkorrels der ciliën ontstaan op de plaats zelve in den ectoplast, als differentieeringen van dezen op een lijst of fibril, onafhankelijk van de kernen (pag. 43—45).
5. Een fibrillensysteem treedt slechts tijdelijk op als een netwerk van steungevende elementen, van morphonemen. Het optreden van dit fibrillaire netwerk is afhankelijk van den ontwikkelings-toestand van het plasma (pag. 78).
6. Het cytoplasma vertoont een bepaalde ontwikkeling gedurende den groei van het dier, waarbij het aantal en de grootte der holten in het plasma geleidelijk toenemen tot den bijna volwassen toestand bereikt is. Daarna worden de holten kleiner, hun aantal neemt ook af, terwijl de plasmaverbindingen tusschen de holten veel dikker worden. Daardoor krijgt het plasma

weer een compacteren bouw. In de encysteeringsperiode verloopt dit proces in omgekeerde richting, evenwel sneller, met minder duidelijk uitgesproken stadiën (pag. 55—56).

7. In het volwassen dier is het cytoplasma zelf de vormbehoudende component, niet de pellicula (pag. 78—80).
8. Wanneer het dier in een droog milieu gebracht wordt, „gelatineert” het plasma onmiddellijk (pag. 79).
9. Het centrum der ciliënbeweging ligt in het anterieure gedeelte van het dier, vermoedelijk in de groeizone der ciliënrijen (pag. 79).
10. De ecto- en endoplasma-insluitels zijn stadiën (fasen) van één en hetzelfde, secretorisch proces (pag. 89—92).

Addendum.

Terwijl dit proefschrift reeds bij den drukker was, verscheen een onderzoek van N. K. Koltzoff in het Biol. Zentralblatt, Bd. 48, 1928, getiteld: „Physikalisch-chemische Grundlage der Morphologie”.

Daarin handhaaft K. de reeds eerder besproken theorie. Meestal echter zouden de skeletvormigen door hun fijnheid onzichtbaar zijn. In de volwassen *Opalina*'s zou dus ook een skelet aanwezig moeten zijn. Waar het in dit geval dus een onzichtbaar skelet zou betreffen, is een discussie hierover onmogelijk. Wel zou echter in dat geval aangenomen moeten worden, dat bij een bepaalden ontwikkelings-toestand het aantoonbare skelet vervangen wordt door een niet aantoonbaar, of dat van deze, naast elkaar aanwezige skeletvormen, alleen het aantoonbare verdwijnt.

LITERATUUR-LIJST.

- ALEXEIEFF, A. (1928): Sur la question des Mitochondries et de l'appareil de Golgi chez les Protistes
Archiv. f. Protistenk. Bd. 60.
- ARNOLD, J. (1907): Plasmosomen, Granula, Mitochondrien, Chondriomiten und Netzfiguren.
Anat. Anz. Bd. 31.
- BECKER, E. R. (1928): Streaming and Polarity in Mastigina Hylae (Frenzel).
Biol. Bulletin Vol. 54.
- BĚLAŘ, K. (1921): Protozoen studien III.
Archiv. f. Protistenk. Bd. 43.
- „ (1926): Der Formwechsel der Protistenkerne.
Jena. G. Fischer.
- BEZZENBERGER, E. (1904): Ueber Infusorien aus Asiatische Anuren. Archiv.
f. Protistenk. Bd. 3.
- BHATIA, B. L. AND GULATI, A. N. (1927): On some parasitic Ciliates from Indian frogs, toads, earthworms and cockroaches. Archiv. f. Protistenk.
Bd. 57.
- BRAUER, A. (1886): Bursaria truncatella unter Berücksichtigung anderer Heterotrichen und der Vorticellinen. Jen. Zeitschr. f. Naturw. Bd. 19.
- BRAUNE, R. (1914): Untersuchungen über die im Wiederkäuermagen vorkommenden Protozoen. Archiv. f. Protistenk. Bd. 32.
- BRESSLAU, E. (1921): Die gelatinierbarkeit des Protoplasmas als Grundlage eines Verfahrens zur Schnellanfertigung gefärbter Dauerpräparate von Infusorien.
Archiv. Protistenk. Bd. 43.
- „ (1928): Zum Problem der Fibrillenbildung. Zool. Jahrb. (Abt. f. Zool. u. Physiol.). Bd. 45.
- BRETSCHNEIDER, L. H. UND HIRSCH, G. C. (1927): Nahrungsaufnahme intraplasmatische Verdauung und Ausscheidung bei Balantidium giganteum
Zeitschr. f. vergleich. Physiol.
(Abt. C. der Zeitschr. f. wiss. Biologie). Bd. 6.
- BRUMPT, E. (1915): Cycle évolutif des Opalines.
Bull. Soc. pathol. exotique. Vol. 8.
- BÜTSCHLI, O. (1887—'89): Protozoen.
Bronn's Klassen und Ordnungen des Thier-Reichs. Bd. 1. Abt. III.
- „ (1888): Müssen wir ein Wachstum des Plasmas durch Intussusception annehmen? Biol. Centralbl. Bd. 8.

- BÜTSCHLI, O.* (1889): Ueber die Struktur des Protoplasmas.
Verhandl. Naturh.-Med. Ver. zu Heidelberg. N. F. IV. Bd. 3.
- „ (1890): Weitere Mittheilungen über die Structur des Protoplasmas.
Verhandl. Naturh.-Med. Ver. zu Heidelberg. N. F. IV. Bd. 4.
- „ (1891): Ueber die Structur des Protoplasmas.
Verhandl. Deutsch. Zool. Gesellsch.
- CALKINS, G. N.*: Biology of the Protozoa.
- CONTE, A. ET VANEY, C.* (1902): Sur des émissions nucléaires observées chez les Protozoaires.
Compt. Rend. des Séanc. de l'Acad. des Sc. T. 135.
- DOFLEIN, F.* (1927): Lehrbuch der Protozoenkunde. Neubearbeitet von Prof. Dr. E. Reichenow.
- Mc. DONALD, J. D.* (1922): On *Balantidium coli* (Malmsten) and *Balantidium suis* (sp. nov.), with an account of their neuromotor apparatus.
Univ. of Calif. Public. in Zoology. Vol. 20. No. 10.
- ENGELMANN, Th. W.* (1874—'75): Over ontwikkeling en voortplanting van Infusoria.
Physiol. Onderzoek. Utrechtsche Hoogeschool. 3e Reeks.
- „ (1876): Ueber Entwicklung und Fortpflanzung von Infusorien. Morph. Jahrb. Bd. 1.
- ENTZ, G. Jun.* (1909): Studien über Organisation und Biologie der Tintinniden.
Archiv. f. Protistenk. Bd. 15.
- „ (1913): Ueber die Organisationsverhältnisse von *Nyctotherus piscicola*.
Archiv. f. Protistenk. Bd. 29.
- „ (1928): Over rangschikking en beteekenis van de fibrillen der Ciliaten.
Ned. Tijdschr. v. Hygiene, Microbiol. en Serologie.
- FAURÉ-FREMIET, E.* (1905): La structure intime du protoplasma chez les Protozoaires.
Compt. Rend. séanc. et mém. d. l. Soc. de Biol. T. 59.
- „ (1905): Sur la structure du protoplasma chez les Protozoaires.
Compt. Rend. séanc. et mém. d. l. Soc. de Biol. T. 59.
- „ (1906): Sur la structure intime du protoplasma chez les Protozoaires.
Compt. Rend. des séanc. de l'Acad. des Sc. T. 142.
- GELEI, J. v.* (1926): Zur Kenntnis des Wimperapparates.
Zeitschr. f. Anat. u. Entwickl. gesch. Abt. I. Bd. 81.
- „ (1926): Zilienstruktur und Zilienbewegung.
Verhandl. der D. Zool. Ges. Jahresvers. 31.
- HAECKEL, E.* (1873): Zur morphologie der Infusorien.
Jen. Zeitschr. f. Naturw. Bd. 7.
- HAMBURGER, Cl.* (1903): Beiträge zur Kenntnis von *Trachelius ovum*. Archiv. f. Protistenk. Bd. 3.
- HARTMANN, M.* (1925): Allgemeine Biologie.
- HEGNER, R. W. and HSIANG-FONG WU.* (1921): An analysis of the rela-

- tion between growth and nuclear division in a parasitic Infusorian, *Opalina* sp.
The American Naturalist. Vol. 55.
- HEIDENHAIN, M.* (1899): Beiträge zur Aufklärung des wahren Wesens der faserförmigen Differenzierungen.
Anat. Anz. Bd. 16.
- HIRSCHLER, J.* (1912): Zur kenntnis der „Chromidialstränge“ in den Ascaridenzellen.
Anat. Anz. Bd. 41.
- „ (1914): Ueber Plasmastrukturen (Golgi'scher apparat, Mitochondrien, u. a.) in den Tunicaten-, Spongien und Protozoenzellen.
Anat. Anz. Bd. 47
- IHLE, J. E. W.* en *NIÉRSTRASZ, H. F.* (1928): Leerboek der bijzondere Dierkunde.
- JACOBS, W.* (1927): Der golgische Binnenapparat.
Ergebnisse und Probleme.
Ergebn. der Biologie. Bd. 2.
- „ (1928): Untersuchungen über die Cytologie der Sekretbildung.
Sitz. ber. Gesellsch. f. Morph. u. Physiol. in München. Bd. 38.
- JIROVEC, O.* (1927): Protozoenstudien II.
Archiv. f. Protistenk. Bd. 59.
- TEN KATE, C. G. B.* (1926): Ueber das Fibrillensystem der Ciliaten.
Dissertatie. Nauta & Co., Zutphen.
- KING, S. D.* and *GATENBY, J. B.* (1926): Note on certain new Bodies in *Opalina ranarum* presumed to represent the golgi elements.
Quart. Journ. Microsc. Sc. Vol. 70.
- KLAPTOCZ, B.* 1907): Die Fortpflanzung der Opalinen.
Verhandl. Zool.-botan. Gesellsch. Wien. Bd. 57.
- KLEIN, B. M.* (1926): Ueber eine neue Eigentümlichkeit der Pellicula von *Chilodon uncinatus* Ehrbg. Zool. Anz. Bd. 67.
- „ (1926): Ergebnisse mit einer Silbermethode bei Ciliaten. Archiv. f. Protistenk. Bd. 56.
- „ (1927): Die Silberliniensysteme der Ciliaten. Archiv. f. Protistenk. Bd. 58.
- KÖLSCH, K.* (1902): Untersuchungen über die Zerfliessungserscheinungen der Ciliaten Infusorien.
Zool. Jahrb. (Abt. f. Anat. und Ontog.) Bd. 16.
- KOLTZOFF, N. K.* (1903): Ueber formbestimmende elastische Gebilde in Zellen. Biol. Centralbl. Bd. 23.
- „ (1906): Studien über die Gestalt der Zelle.
Archiv. f. Mikros. Anat. u. Entwickl. Bd. 67.
- KONSULOFF, St.* (1922): Untersuchungen über *Opalina*.
Archiv. f. Protistenk. Bd. 44.

- KUNSTLER, J.* (1904): Notice sur les téguments des micro-organismes.
Archiv d'Anat. microscop. T. 6.
- KUNSTLER, J.* et *GINESTE, Ch.* (1905): Les sphérules trophoplasmiques des infusoires ciliés.
Comp. Rend. séanc. de l'Acad. d. Sc. T. 141.
- „ (1906): Contribution à la morphologie générale des Protozoaires supérieurs. Comp. Rend. séanc. de l'Acad. d. Sc. T. 142.
- LAWSON, A. ANSTRUTHER.* (1926): A contribution to the life-history of *Bowenia*.
Transact. roy. soc. of Edinburgh. Bd. 54.
- LÉGER, L.* et *DUBOSCQ, O.* (1904): Notes sur les Infusoires endoparasites.
Archiv. d. Zool. Expér. Ser. 4 T. II.
- LEVI, G.* (1927): Trattato di Istologia. Torino.
- LOEWENTHAL, W.* (1904): Das Auftreten eines Mikronukleusartigen Gebildes bei *Opalina ranarum*.
Archiv. f. Protistenk. Bd. 3.
- „ (1909): Notizen über *Opalina ranarum*.
Archiv. f. Protistenk. Bd. 13.
- MAIER, H. N.* (1903): Ueber den feineren Bau der Wimperapparate der Infusorien.
Archiv. f. Protistenk. Bd. 2.
- MAUPAS, E.* (1883): Contribution à l'Etude morphologique et anatomique des Infusoires ciliés.
Archiv. Zool. Expér. Ser. 2. T. I.
- METCALF, M. M.* (1907): The Excretory organs of *Opalina*.
Archiv. f. Protistenk. Bd. 10.
- „ (1907): Studies on *Opalina*.
Zool. Anz. Bd. 32.
- „ (1909): *Opalina*.
Archiv. f. Protistenk. Bd. 13.
- „ (1912): *Opalina mitotica*.
Zool. Jahrb. Suppl. Heft. XV¹.
- „ (1914): Notes upon *Opalina*.
Zool. Anz. Bd. 44.
- „ (1923): The Opalinid Ciliate Infusorians. Smithsonian Institution. United States. National Museum. Bull. 120.
- MEVES, Fr.* (1907): Die Chondriokonten in ihrem Verhältnis zur Filarmasse Flemmings.
Anat. Anz. Bd. 31
- MIZUNO, F.* (1927): Sur la Croissance normale du *Paramecium caudatum*.
Sc. Reports of the Tohoku Imp. Univ. Ser. 4. Vol. II.
- NERESHEIMER, E.* (1906): Der Zeugungskreis von *Opalina*.
Sitz. Ber. Gesellsch. für Morphol. u. Physiol. in München XXII.

- NERESHEIMER, E.* (1907): Die Fortpflanzung der Opalinen.
Archiv. f. Protistenk. Suppl. I.
- PENSA, A.* (1926): Particolarità strutturale di alcuni protozoi cigliati in rapporto alla contrattilità.
Boll. d. Soc. di biol. separi. Bd. S. N. 4.
- „ (1926): Particolarità strutturale di alcuni protozoi cigliati in rapporto con la contrattilità.
Monitore Zool. Ital. Bd. 37.
- PESCHKOWSKY, L.* (1927): Skelettgebilde bei Infusorien.
Archiv. f. Protistenk. Bd. 57.
- REES, C. W.* (1922): The neuromotor apparatus of *Paramecium*.
Univ. of Calif. Public. in Zool. Vol. 20. No. 14.
- REICHARDT, A.* (1927): Beiträge zur Cytologie der Protisten.
Archiv. f. Protistenk. Bd. 59.
- REICHENOW, E.* (1928): Ergebnisse mit der Nuklealfärbung bei Protozoen.
Archiv. f. Protistenk. Bd. 61.
- ROSKIN, Gr.* (1925): Ueber die Axopodien der Heliozoa und die Greiftentakeln der Ephelotidae.
- SAGUCHI, S.* (1917): Studies on ciliated cells.
Journ. of Morph. Vol. 29.
- SCHMÄHL, O.* (1926): Die Neubildung des Peristoms bei der Teilung von *Bursaria truncatella*.
Archiv. f. Protistenk. Bd. 54.
- SCHMIDT, W. J.* (1928): Der submikroskopische Bau des Chromatins.
Zool. Jahrb. Abt. f. allgem. Zool. u. Physiol. Bd. 45.
- SCHNEIDER, K. C.* (1906): Plasmastruktur und -bewegung bei Protozoen und Pflanzenzellen.
Abh. a. d. Zool. Institut. des Univ. Wien. Bd. 16.
- SCHUBERG, A.* (1887): Ueber den Bau der *Bursaria truncatella*.
Morph. Jahrb. Bd. 12.
- „ (1905): Ueber Cilien und Trichocysten einiger Infusorien.
Archiv. f. Protistenk. Bd. 6.
- SHARP, R. G.* (1914): *Diplodinium ecaudatum*. With an account of its neuromotor apparatus.
Univ. of Calif. Public. in Zool. Vol. 13. No. 4.
- SOKOLSKA, J.* (1927): Sur les composants lipoidifères du plasma du Protozoaire parasite *Opalina ranarum*. Park et Val.
Compt. Rend. Soc. de Biol. T. 96. No. 8.
- SPEK, J.* (1923): Ueber den physikalischen Zustand von Plasma und Zelle der *Opalina ranarum*.
Archiv. f. Protistenk. Bd. 46.
- STEVENS, N. M.* (1901): Studies on Ciliate Infusoria.
Proc. of the Calif. Acad. of Sc. Ser. III. Zool. III.

- TAYLOR, Ch. V.* (1920): Demonstration of the Function of the neuromotor apparatus in *Euplotes* by the Method of Microdissection.
Univ. of Calif. Public. in Zool. Vol. 19. No. 13.
- TÖNNIGES, C.* (1898): Die feineren Bauverhältnisse von *Opalina ranarum*.
Sitz. Ber. Ges. z. Beförd. der gesamt. Naturw. zu Marburg.
- „ (1899): Nachtrag zu den Untersuchungen über die feineren Bauverhältnisse von *Opalina ranarum*.
Sitz. Ber. Ges. z. Beförd. der gesamt. Naturw. zu Marburg.
- „ (1914): Die Trichocysten von *Frontonia leucas* (Ehrbg). und ihr chromidialer Ursprung.
Archiv. f. Protistenk. Bd. 32.
- „ (1919): Weitere Mitteilungen über die feineren Bauverhältnisse und über die Fortpflanzung von *Opalina ran.*
Sitz. Ber. der Ges. z. Beförd. der gesamt. Naturw. zu Marburg.
- WETZEL, A.* (1925): Vergleichend cytologische Untersuchungen an Ciliaten.
Archiv. f. Protistenk. Bd. 51.
- YOCOM, H. B.* (1918): The neuromotor apparatus of *Euplotes patella*.
Univ. of Calif. Public. in Zool. Vol. 18. No. 14.
- ZELLER, E.* (1877): Untersuchungen über die Fortpflanzung und die Entwicklung der in unseren Batrachiern schmarotzenden Opalinen.
Zeitschr. f. Wiss. Zool. Bd. 29.
-

STELLINGEN.

I.

Het genus *Opalina* wordt op onjuiste gronden tot de Ciliaten gerekend.

II.

De door Verweij uitgevoerde proeven met vogelcoccidiën maken een hernieuwd onderzoek over de geslachten, die de groep der *Coccidia* vormen, noodzakelijk.

III.

Het gebruik van landbruggen om de geographische verspreiding van landdieren te kunnen verklaren, moet in de meeste gevallen als ontoelaatbaar worden beschouwd.

IV.

De theorie van Porsch is in strijd met de ontwikkelingsrichting, die zich bij de verschillende plantengroepen openbaart of geopenbaard heeft, waarbij de ♂ gametophyt gereduceerd wordt. Daardoor is deze theorie minder aannemelijk.

V.

De kristalsteel der Gastropoden mag beschouwd worden als homoloog te zijn met dien der Lamellibranchiaten. (Mackintosh, Quart. Journ. of Microsc. Sc. Vol 69, 1925.)

VI.

De z.g. beschermende kleuren blijven in het algemeen niet bewaard als gevolg van een selectief werkend proces; in de meeste gevallen worden zij aangetroffen ten gevolge van de inwerking van klimatologische factoren.

VII.

De veelal in ons land gevolgde methode van ring-onderzoek, waarbij jonge vogels reeds in het nest van ringen voorzien worden, moet ten sterkste afgekeurd worden.



