

**Estudos de citologia em nova especie de coccidio,
"Adelea hartmanni", do intestino do Dysdercus ruficollis L.**

PELO

Dr. Carlos Chagas,

Chefe de serviço.

(Com as estampas 11 - 15)

**Cytologische Studien ueber "Adelea hartmanni",
ein neues Coccidium aus dem Darne von Dysdercus ruficollis L.**

VON

Dr. Carlos Chagas,

Abteilungsvorsteher am Institute.

(Mit Tafeln 11 - 15)

MATERIAL E TECNICA.

O material que nos serviu para estes estudos provem de intensas infeções encontradas em dois unicos exemplares d'um hemiptero da subfamilia « *Pyrrhocoridae* » *Dysdercus ruficollis* L., (*) cujo intestino mostrava elevadissimo numero de parasitos, em todos os estádios evolutivos.

Pesquisas posteriores, em numerozos exemplares daquelle hemiptero não nos forneceram nova infeção, pelo que tivemos de realizar nossos estudos nos unicos preparados iniciais, nelles encontrando, aliaz, todos os estádios dos ciclos evolutivos, esquizogonico e esporogonico, do parasito.

Com os intestinos dos dois hemipteros fizemos esfregaços, dissociando os tecidos das paredes intestinais e espalhando com cuidado, sem esmagar o material, as fézes

(*) Devemos a determinação dessa especie á gentileza do Snr. R. VON IHERING do Museu Paulista ao qual deixamos consignado aqui nosso agradecimento.

MATERIAL UND TECHNIK.

Das Material, welches diesen Studien zu Grunde liegt, stammt von zwei intensiv infizierten Exemplaren einer Wanzenart (*Dysdercus ruficollis* L. zu Fam. *Pyrrhocoridae*), (*) deren Darm eine sehr grosse Zahl dieser Parasiten in allen Entwicklungsstadien aufwies. Spätere Untersuchungen an zahlreichen Exemplaren derselben Hemipterenart, ergab kein weiteres Material dieser Infektion, so dass ich meine Studien auf die ursprünglichen Präparate beschränken musste, in welchen sich übrigens alle Stadien, sowohl der schizogonischen, als auch der sexuellen und sporogonischen Entwicklung vorfanden.

Mit dem Darmkanal der beiden Wanzen machte ich Ausstrichspräparate, indem ich das Gewebe zerzupfte und die Fäzes sorgfältig, ohne Zerquetschung des Mate-

(*) Herrn R. VON IHERING vom Museu Paulista, der die Art für mich bestimmte, möchte ich dafür an dieser Stelle meinen besten Dank aussprechen.

presentes. Estes esfregaços foram fixados no sublimado-alcool de SCHAUDINN e corados pela hematoxilina férrea, segundo o metodo de HEIDENHAIN. Os aspetos extracelulares observados demonstram o sucesso da tecnica uzada que, no caso, apesar de simples, foi suficiente para garantir a verdade das deducções. A deficiencia de material não nos permitiu, infelizmente, a pratica de córtes, nos quais poderíamos ter noção, talvez mais clara, dos estádios intracelulares do parasito e esclarecer um fenomeno, adiante referido, de ordem fisiologica, sobre cuja interpretação permanecemos indecizo.

INTRODUÇÃO.

Nos estudos de SIEDLECKI (1899) sobre o ciclo evolutivo da *Adelea ovata*, parasito do intestino do *Lithobius forficatus*, vêm referidos pela primeira vez, os fenomenos citologicos intimos correlativos aos diversos estádios da evolução de um coccidio do genero *Adelea*. Aí, no ciclo esquizogonico, aquelle experimentador demonstrou a existencia de dimorfismo, bem caracterizado pela diversidade de aspetos estruturais no macro- e no microesquizonte. Estudando o processo citologico na macroesquizogonia, SIEDLECKI verificou a transformação do cariozoma inicial (por gemulação) em duas esferas cromaticas, colocadas na zona de suco nuclear. As duas esferas primitivas, por processo identico, davam esferas cromaticas secundarias que, a principio colocadas na face interna da membrana nuclear, pela ruptura desta vinham colocar-se na superficie do plasma do parasito, aí constituindo novos cariozomas, centros de atração da cromatina contida na zona de suco nuclear.

As novas estruturas nucleares, assim constituídas, transformavam o parasito em organismo multinucleado, tendo os nucleos, a principio, o aspeto estelar caracteristico, condensando-se depois, em cada um delles, a substancia cromatica, ficando assim organizados os nucleos dos novos merozoitos.

rials, ausbreitete. Die Fixation geschah mit Sublimatalkohol nach SCHAUDINN und die Färbung mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHAIN. Die beobachteten Strukturbilder bewiesen den guten Erfolg dieser Technik, die in diesem Falle bei aller Einfachheit vollkommen genügte, um die Richtigkeit der Schlüsse zu garantieren. Der Mangel an Material gestattete mir leider nicht, Schnitte zu machen, welche uns vielleicht eine genauere Kenntnis der intracellulären Parasitenstadien und Aufklärung über eine noch zu erwähnende physiologische Erscheinung verschafft hätten, über deren Deutung ich im Ungewissen blieb.

EINLEITUNG.

Die genaueren cytologischen Erscheinungen bei den verschiedenen Entwicklungsstadien eines Coccidiums aus dem Genus *Adelea* finden sich zum ersten Male in SIEDLECKI's Studien über den Entwicklungscyclus von *Adelea ovata* aus dem Darne von *Lithobius forficatus* beschrieben (1899). Dieser Forscher zeigte beim schizogonischen Entwicklungscyclus dieser Art das Vorkommen eines Dimorphismus, welcher durch die verschiedenen Strukturbilder der Makro- und Mikroschizonten deutlich charakterisiert ist. Während des Studiums der cytologischen Vorgänge bei der Makroschizogonie beobachtete SIEDLECKI eine Umwandlung des ursprünglichen Caryosomas durch Knospung in zwei chromatische Sphären, welche in der Kernsaftzone lagen. Diese gaben durch einen analogen Prozess secundäre chromatische Sphären, welche zuerst an der Innenseite der Kernmembran lagen, aber nach Zerreißung derselben an die Oberfläche des Parasitenplasmas rückten und dort neue Caryosomen bildeten, indem sie für das in der Kernsaftzone gelegene Chromatin Attraktionszonen bildeten.

Die so gebildeten neuen Kernstrukturen verwandelten den Parasiten in einen vielkernigen Organismus, dessen Kerne anfangs typische sternförmige Gestalt

Estudando a formação dos microgâmetas, nos microgametócitos, SIEDLECKI referiu, no fenomeno, duas divizões nucleares, que devem ser interpretadas como divizões de redução. D'af rezultavam quatro microgâmetas individualizados.

Os processos citolojicos estudados na *Adelea ovata* por SIEDLECKI, assim como o ciclo evolutivo deste coccidio, foram, em seu conjunto, verificados por LÉGER na *Adelea dimidiata* e na *Adelea tipulidae*.

DOBELL, estudando alguns estádios do ciclo evolutivo do mesmo coccidio, cuidou principalmente de explicar o processo de formação dos microgâmetas como diferenciação do nucleo, provindo de cromídios. Segundo DOBELL o cariozoma do nucleo de um microgametócito, para a formação de microgâmetas, apresentava-se sob a forma de rede cromatica. Depois da associação do microgametócito com o macrogametócito, os elementos da rede cromatica intranuclear eram expulsos para o citoplasma, onde formavam estrutura cromidial completa (*chromidial net.*) Esta estrutura dividia-se então em quatro massas, a principio com aspeto estelar, que se condensavam depois em corpusculos cromaticos esfericos, destes rezultando os quatro microgâmetas, organismos com uma das extremidades afilada e apresentando na parte central um vacuolo. DOBELL interpreta ainda como condição cromidial o aspeto da cromatina no citoplasma do macromerozoito.

Revedo, em recentes estudos, a citolojia da *Adelea ovata*, JOLLOS (1909) traz ao assunto noções interessantes, interpretando os fenomenos observados á luz das novas idéas de SCHAUDINN, HARTMANN e v. PROWAZEK sobre a organização e a evolução do nucleo nos protozoarios.

Segundo JOLLOS a macro- e a microesquizogonia da *Adelea ovata* são realizadas segundo dois processos: No primeiro delles, o nucleo do esquizonte sofre divizões binarias sucessivas, homopolares, delias rezultando os nucleos das unidades

zeigten; später verdichtete sich in denselben die chromatische Substanz und organisierte sich zu den Kernen der neuen Merozoiten.

Beim Studium der Bildung der Mikrogameten in den Mikrogametocyten, beschreibt SIEDLECKI das Auftreten zweier Kernteilungen, die als Reduktionsteilungen aufzufassen sind. Daraus resultieren vier getrennte Mikrogameten.

Die von SIEDLECKI bei *Adelea ovata* studierten cytologischen Prozesse und der Entwicklungscyclus derselben wurde von LÉGER bei *Adelea ovata* und bei *A. tipulidae* bestätigt.

DOBELL, welcher einige Stadien des Entwicklungscyclus desselben Coccidiums studierte, suchte besonders den Prozess der Mikrogametenbildung als eine Differenzierung der Kerne aus einem Chromidium hinzustellen. Nach ihm zeigt sich das Caryosom des Mikrogametocytenkernes bei der Bildung der Mikrogameten in der Form eines chromatischen Netzes. Nach der Vereinigung von Mikro- und Makrogameocyten wurden die Elemente des intranucleären Chromatinnetzes in das Cytoplasma entleert, woselbst sie ein Chromidialnetz bildeten. Diese Struktur teilte sich dann in vier Massen, die zuerst Sternform zeigten und sich dann in runde Chromatinkörperchen kondensierten, aus welchen die vier Mikrogameten hervorgingen. Diese Formen sind an einem Ende zugespitzt und zeigen im mittleren Teile eine Vakuole. DOBELL deutet auch die Form des Chromatins im Cytoplasma der Makromerozoiten als einen Chromidialzustand.

JOLLOS (1909), der in neueren Studien die Cytologie der *Adelea ovata* nachuntersuchte, bringt in das Thema interessante Gesichtspunkte, indem er die beobachteten Erscheinungen im Lichte der neuen Ideen betrachtet, welche SCHAUDINN, HARTMANN und v. PROWAZEK über die Evolution des Protozookernes äusserten.

Nach JOLLOS vollzieht sich die Makro- und Mikroschizogonie bei *Adelea ovata* auf zweierlei Art: bei der ersten erleidet der Schizontenkern successive homopolare

esquizogonicas. No segundo processo, o cariozoma experimenta divizões repetidas no interior do nucleo, espalhando-se as unidades cariozomicas pela zona de suco nuclear, constituindo cada uma dellas nova *energia*, no sentido de HARTMANN; dest'arte fica demonstrada a polienerjia do nucleo do coccidio

Rompendo-se a membrana nuclear passam os cariozomas para o plasma, onde continuam a se dividir e, por afofamento, se transformam em nucleos tipicos de merozoitos. E' a verificacão, neste protozoario, da nova teoria de nucleos com polienerjia (*polyenergide Kerne*) formulada por MAX HARTMANN em trabalhos sobre processos citolojicos nos *radiolarios*.

Nos estudos de JOLLOS vem minuciosamente descrito o processo de divizão do cariozoma, havendo, ora mitoze primitiva (*promitose*) do tipo da descrita por NAEGLER nas amebas do grupo *limax*, ora mitoze mais aperfeçoada, com a formacão de fuзо e com a presença de placa equatorial (Est. II, Fig. 5). Na mitoze primitiva, dá-se, primeiro, a divizão do centriolo, cujas metades se afastam, permanecendo ligadas pelo filamento central. Na parte central do cariozoma ha então rarefacão da cromatina, formando-se especie de vacuolo que divide o cariozoma em duas metades iguais. Estas, a principio, semilunares, tornam-se depois esfericas, afastando-se uma da outra, sempre ligadas pelo filamento central (JOLLOS — Textfigur A.).

A redução nuclear do macrogametócito, segundo JOLLOS, verifica-se por processo de divizão inteiramente diverso do que se observa na esquizogonia, diferindo o fenomeno do processo de maturacão referido por SIEDLECKI que verificou apenas a eliminacão de cromatina para o plasma — a denominada « *épuration nucléaire* ». — Aqui o cariozoma do macrogametócito se alonga, apresentando a forma de biscoito, adelgaça-se na parte central, estrangula-se, sendo então eliminada metade delle, acompanhada de camada de

Zweiteilungen, aus welchen die Teilindividuen hervorgehen. Bei der zweiten Art erfährt das Caryosom im Innern des Kernes successive Zweiteilungen und die neugebildeten Einheiten zerstreuen sich über die Kernsaftzone, indem jede derselben eine neue Energide im Sinne HARTMANN's bildet; auf diese Weise wird die Polyenergie des Coccidienkernes erwiesen.

Nach Zerreißen der Kernmembran treten die Caryosome ins Plasma aus, wo sie sich weiter zu teilen vermögen und durch Auflockerung zu typischen Merozoitenkernen werden. Die Theorie der polyenergiden Kerne, welche HARTMANN bei seinen Arbeiten über die Cytologie der Radiolarien aufgestellt hat, wird auf diese Weise bei einem Coccidium begründet.

In den Studien von JOLLOS wird der Prozess der Caryosomteilung ausführlich beschrieben; es findet dabei entweder eine Promitose statt, wie sie von NAEGLER bei den Amöben der *Limax*gruppe beschrieben wurde oder eine vollkommenerere Mitose mit Spindelbildung und Aequatorialplatte (Taf. II, Fig. 5). Bei der Promitose findet zuerst eine Teilung des Centriols statt, dessen Hälften auseinanderrücken, aber durch einen Centrifaden verbunden bleiben. In der Mitte des Caryosoms greift dann eine Rarefaction des Chromatins Platz, indem sich eine Art von Vacuole bildet, welche das Caryosom in zwei gleiche Teile zerlegt. Diese sind anfangs halbmondförmig, werden dann rund und entfernen sich endlich von einander, bleiben aber durch den Centrifaden verbunden, (JOLLOS, Textfigur A.).

Nach JOLLOS erfolgt die Kernreduktion des Mikrogametocyten durch einen, von dem, bei der Schizogonie gefundenen, sehr verschiedenen Teilungsvorgang, während SIEDLECKI nur eine Ausstossung von Chromatin ins Plasma, eine sog. *épuration nucléaire*, beobachtet hatte. Es verlängert sich das Caryosom des Makrogametocyten und zeigt eine Biscuitform; die mittlere Partie verdünnt sich und schnürt sich ab, worauf die eine Hälfte zugleich mit einer Plasmaschicht ausgestossen wird.

plasma. Este processo é muito semelhante ao da formação dos corpos polares na maturação dos ovos dos metazoários.

Os fatos citológicos referidos por JOLLOS foram, em sua maioria, confirmados em nossas observações, havendo, apenas, divergências de pequena monta, na interpretação de algumas minúcias, entre as observações daquele pesquisador e as que passamos a relatar.

MACROESQUIZOGONIA DA « ADELEA HARTMANNI ».

Os macromerozoitos da *Adelea hartmanni* (Est. 11, Fig. 1) apresentam-se como organismos falciformes, tendo uma das extremidades arredondada, e a outra afilada, munidos de volumoso núcleo com membrana, de contornos nitidos, e grande cariozoma, em cujo centro, às vezes, é visível um centríolo. Na zona de suco nuclear vêm-se trabéculas de linina e na face interna da membrana do núcleo alguns grânulos de cromatina. O plasma, granuloso, mostra grandes alvéolos de dimensões maiores do que nos micromerozoitos. Penetrando nas células epiteliais do intestino o macromerozoito se transforma em macroesquizonte, cuja estrutura apresenta aspectos vários que passamos a estudar:

O núcleo do macroesquizonte mostra dois aspectos distintos, correspondentes às duas modalidades de divisão múltipla referidas na *Adelea ovata*.

Num dos casos o núcleo apresenta em seu interior diversos cariozomas, ora colocados na periferia, às vezes fazendo saliência no plasma (Est. 11, Fig. 2), ora colocados no interior de massa de substância acromática, na zona central do núcleo (Est. 11, Fig. 8 e 9). Destruída a membrana nuclear passam os cariozomas para o plasma, onde sofrem ainda divisões sucessivas, (Est. 11, 12, Fig. 7, 9 a, 10, 11, 12).

No outro caso a divisão do núcleo é realizada por mitose homopolar (Est. 11,

Der Vorgang gleicht somit ganz einer Richtungkörperbildung bei der Reifung der Metazoeneier.

Die von JOLLOS berichteten Tatsachen wurden zum grössten Teile in meinen Beobachtungen bestätigt und nur in einigen Einzelheiten gab es kleine Abweichungen zwischen den Beobachtungen jenes Forschers und den noch zu beschreibenden von mir selbst.

MAKROSCHIZOGONIE DER « ADELEA HARTMANNI ».

Die Makromerozoiten der *Adelea Hartmanni* (Taf. 11, Fig. 1) erscheinen als sichelförmige Organismen mit einem abgerundeten und einem zugespitzten Ende; sie zeigen einen grossen Kern mit wohlumschriebener Membran und grossem Caryosom, in dessen Mitte man öfters ein Centriol wahrnimmt. In der Kernsaftzone sieht man Lininfäden und an der Innenseite der Membran einige Chromatinkörnchen. Das granuliertes Plasma zeigt grosse Alveolen, welche in ihren Dimensionen diejenigen der Mikromerozoiten übertreffen.

Nach seinem Eindringen in die Epithelialzellen des Darmes verwandelt sich der Makromerozoit in einen Makroschizonten, dessen verschiedene Strukturbilder ich weiter unten erörtere. Der Kern des Makroschizonten zeigt zwei verschiedene Formen, entsprechend den zwei Arten der multiplen Teilung, über die JOLLOS bei der *Adelea ovata* berichtet hat.

Im ersten Falle zeigt der Kern in seinem Innern verschiedene Caryosomen, bald peripherisch gelagert und manchmal ins Plasma vorspringend (Fig. 2), bald im Centrum des Kernes im Innern einer Masse achromatischer Substanz (Taf. 11, Fig. 8 und 9). Nach Zerstörung der Kernmembran treten die Caryosomen ins Plasma über, wo sie noch weitere successiven Teilungen eingehen. (Taf. 11-12, Fig. 7, 9a, 10, 11, 12).

Im andern Falle erfolgt die Kernteilung durch eine homopolare Mitose

Fig. 3, 5). Nesta, é muitas vezes possível observar a promitose do cariozoma na *Adelea ovata*, segundo JOLLOS (Est. 11, Fig. 3). Tanto nos cariozomas, ainda no interior de nucleos, quanto naquelles livres no plasma do macroesquizonte, além da divisão pela mitose primitiva, segundo o processo descrito por NAEGLER nas amebas, verifica-se mitose mais aperfeiçoada, com divisão previa do centriolo, formação de placa equatorial e a existencia, no centro do fuzo, de filamento central (Est. 11, Fig. 4-5-8 a). A divisão prévia dos centriolos vem demonstrada na fig. 7, onde são vistos no plasma dois cariozomas volumozos, tendo, lateralmente colocados e ligados por delgada fibrila, dois pequenos corpusculos de cromatina, que representam as metades da divisão dos centriolos. Aspetto identico é verificado num cariozoma intranuclear da fig 6. Merece especial atenção o aspeto da mitose do cariozoma na fig. 8 a, porquanto aí, pela diferenciação bem feita, são muito nitidos os dois centriolos no interior dos novos cariozomas, ligados por filamento central. Transversalmente colocados sobre o filamento central existem, nesta figura duas massas de cromatina que representam, talvez, a cromatina da zona de suco nuclear, cuja divisão seria realizada posteriormente á do cariozoma e sempre dirigida pelo filamento central resultante da divisão do centriolo. O mesmo aspeto mostram as fig. 5 e 12, representando a primeira a divisão inicial do nucleo de um macroesquizonte, e a segunda as divisões secundarias dos nucleos num esquizonte multinucleado.

Nos estádios que precedem imediatamente a divisão do plasma (Fig. 13), os nucleos do macroesquizonte mostram aspeto irregular da cromatina, que aí se encontra sob a fôrma de corpusculos, dispostos irregularmente sobre trabeculas de substancia acromatica e ligados por filamentos de cromatina e os contornos dos nucleos não têm

(Fig. 3, 5). Bei dieser kann man oft Bilder beobachten, welche der Promitose bei *Adelea ovata* nach JOLLOS gleichen (Fig. 3). Sowohl bei den noch im Kerninnern, als auch bei frei im Plasma des Makroschizonten liegenden Caryosomen, kann man, ausser der Teilung durch primitive Mitose, wie sie NAEGLER bei Amoeben beschrieben hat, eine andere, vollkommeneren beobachten, bei welcher das Centriol geteilt, eine Aequatorialplatte gebildet wird und in der Mitte der Spindel ein Centralfaden besteht (Fig. 4, 5, 8a). Die vorhergehende Teilung der Centriolen ist aus der Fig. 7 ersichtlich, auf der man im Plasma zwei grosse Caryosomen sieht, neben welchen seitlich zwei durch eine dünne Fibrille verbundene Chromatinkörperchen liegen, welche die Teilungshälften des Chromatins vorstellen. Ein ähnliches Bild erkennt man bei einem intranucleären Caryosom auf Fig. 6. Besondere Aufmerksamkeit verdient das Bild der Caryosommitose in Fig. 8a, da hier die gut gelungene Differenzierung die beiden, durch einen Centralfaden verbundenen, Centriolen im Innern der neuen Caryosomen deutlich erkennen lässt. In dieser Figur sieht man, auf dem Centralfaden quer gelagert, zwei Chromatinmassen, welche vielleicht das Chromatin der Kernsaftzone darstellen, dessen Teilung erst nach derjenigen der Caryosome stattfindet, immer durch die Centralfaser beeinflusst, welche aus der Teilung der Centriolen hervorgeht. Dasselbe Bild zeigen Fig. 5 und 12, von denen erstere die anfängliche Kernteilung eines Makroschizonten und letztere die Secundärteilungen der Nuclei eines vielkernigen Schizonten zeigt.

In den Stadien, welche der Plasmateilung unmittelbar vorausgehen (Fig. 13) zeigen die Kerne der Makroschizonten eine unregelmässige Chromatinfigur, welche hier in der Form unregelmässig auf Fäden achromatischer Substanz gereihter und unter sich durch Chromatinfäden verbundener Körnchen erscheint. In diesem Stadium sind die Umrisse des Kernes nicht

neste estágio, nitidez, e aí não existe ainda membrana nuclear apreciável. Trata-se, portanto, de núcleo em organização. A divisão do plasma inicia-se na periferia, condensando-se massas plasmáticas em torno dos núcleos e formando-se fendas nos intervalos. O número de merozoítos de um macroesquizonte é bastante variável, quasi sempre muito grande, sendo difícil contar as unidades presentes, em vista da superposição dellas em diversos planos.

Os merozoítos acham-se colocados paralelamente, os núcleos situados de modo irregular, não havendo, no centro, massa de plasma residual. Nas formas, cuja esquizogonia está já completa, os núcleos mostram um único cariozoma compacto, cercado por uma orla clara, na qual é vista substância cromática (fig. 15). Não raro é visível, na superfície da forma segmentada, delgada película, que representa, de certo, os limites da célula em cujo interior se realizou a evolução do parasito, senão o periplasto deste.

MICROESQUIZOGONIA.

Os fenómenos citológicos na divisão múltipla do microesquizonte são, em seu conjunto, idênticos aos referidos na macroesquizogonia, havendo talvez aqui, em alguns dos aspectos observados, maior nitidez e base mais satisfatória para a interpretação que julgamos aplicável aos fatos estudados.

O micromerozoito é organismo ovoide (fig. 16), cujo plasma, não granuloso, se apresenta alveolar, sendo os alveolos sensivelmente menores do que os do macromerozoito. O núcleo mostra um cariozoma esférico, em cujo centro é quasi sempre visível um centríolo (muito nítido na fig. 16). Circunda o cariozoma zona clara, com finas trabéculas de linina, transversalmente

scharf umschrieben und es existiert noch keine eigentliche Kernmembran. Es handelt sich also um einen noch in Bildung begriffenen Kern.

Die Teilung des Plasmas beginnt an der Peripherie, indem sich die Plasmamassen in der Umgebung der Nuclei verdichten und dazwischen Spalten auftreten. Die bei einem Makroschizonten gebildete Merozoitenzahl ist ziemlich schwankend, aber gewöhnlich sehr gross, so dass es in Folge der gegenseitigen Ueberlagerung schwer fällt, die Einzelindividuen zu zählen.

Die Merozoiten findet man parallel gelagert, mit unregelmässig angeordneten Kernen, während im Centrum keine Masse von Residualplasma übrig bleibt. Bei vollendeter Schizogonie zeigen die Kerne ein kompaktes Caryosom, umgeben von einer hellen Zone, welche Chromatin aufweist (Fig. 15). Nicht selten sieht man an der Aussenfläche der segmentierten Formen eine zarte Haut, welche entweder die Gränze der Zelle, in deren Innern der Parasit sich entwickelte, darstellt oder auch den Periplast des Letzteren.

MIKROSCHIZOGONIE.

Die cytologischen Erscheinungen bei der multiplen Teilung der Mikroschizonten sind im Ganzen den, bei der Makroschizogonie beschriebenen, ähnlich; doch bemerkt man bei einigen der beobachteten Bilder wohl eine grössere Deutlichkeit und sie bilden für die Erklärung der studierten Verhältnisse eine bessere Grundlage.

Der Mikromerozoit (Fig. 16) ist ein eiförmiger Organismus, dessen Plasma nicht granuliert, aber wabig erscheint; die Waben sind aber jedoch bedeutend kleiner, als bei den Makromerozoiten. Der Kern zeigt ein kugeliges Caryosom, in dessen Centrum fast immer ein Centriol sichtbar ist. (Sehr deutlich in Fig. 16). Um das Caryosom liegt eine klare Zone mit feinen, transversal gelagerten Lininbälkchen, welche durch keine deutliche Membran abgegrenzt

colocadas, não limitadas por membrana apreciável. Ligado por um filamento ao cariozoma, mais especialmente ao centriolo, existe um corpusculo de cromatina, ora situado no plasma, ora no interior da zona clara que circunda o cariozoma. Na fig. 16, além do corpusculo referido, dois outros existem, numa das extremidades; estes deixam de ter importancia como estrutura normal. (Substancias de reserva).

Nos microesquizontes mais dezentolvidos (fig. 17) o nucleo mostra diversos cariozomas, ora situados na periferia, ora colocados na zona de suco nuclear. A multiplicação dos cariozomas no interior do nucleo realiza-se pelo mesmo processo que na macroesquizogonia. Pela ruptura do nucleo (fig. 18) os cariozomas passam para o plasma, onde continuam a se multiplicar, ficando o microesquizonte transformado em um organismo esferico com grande numero de cariozomas (fig. 21). Na microesquizogonia não observámos divizão mitozica do nucleo primitivo, tão clara na fig. 5 da macroesquizogonia. Acreditamos, por isso, que a divizão multipla é aqui realizada, quazi sempre, pela ruptura de um policario.

Nas fórmias segmentadas os micromerozoitos se apresentam irregularmente dispostos em varios planos. O numero de unidades em cada individuo esquizogonico é variavel, de vinte ou mais merozoitos, cada um destes apresentando no nucleo, quazi sempre, dois corpusculos cromaticos. Estes, as mais das vezes, são de igual volume, ligados por um filamento; em alguns merozoitos, porém, um dos corpusculos é representado por minuscula granulação (fig. 26). Este aspeto da cromatina nuclear dos micromerozoitos ou está em relação com o mecanismo de mitoze dos nucleos no microesquizonte, ou, o que é talvez mais provavel, indica uma multiplicação precoce do cariozoma nestes organismos, destinada á formação de policarios.

wird. Bald im Plasma, bald im Innern der hellen Zone, welche das Caryosom umgibt, findet sich ein Chromatinkörperchen, welches mit dem Caryosom und ganz besonders mit dem Centriol durch einen Faden verbunden ist. In Fig. 16 sieht man ausser diesem Chromatinkörperchen noch zwei andere an einem der Enden. Da diese nicht konstant sind, können sie nicht die Bedeutung normaler Strukturen beanspruchen. (Reservestoffkörner).

In weiter entwickelten Mikroschizonten (Fig. 17) zeigt der Kern verschiedene Caryosome, bald an der Peripherie, bald in der Kernsaftzone gelagert. Die Vermehrung der Caryosome im Kerninnern vollzieht sich durch denselben Vorgang, wie bei der Makroschizogonie. Durch Zerreißen des Kernes (Fig. 18) treten die Caryosome ins Plasma über, wo sie sich weiter vermehren, so dass sich der Mikroschizont in ein rundes Gebilde mit vielen Caryosomen umwandelt (Fig. 21). Bei der Mikroschizogonie habe ich keine mitotische Teilung des ursprünglichen Kernes beobachtet, wie sie bei der Makroschizogonie in Fig. 5 so deutlich erscheint. Ich glaube deshalb, dass die vielfache Teilung hier immer durch die Ruptur eines Kernes mit vielen Caryosomen stattfindet.

Nach stattgefundener Segmentierung zeigen sich die Mikromerozoiten in verschiedenen Ebenen unregelmässig angeordnet. Die Zahl der einzelnen, durch die Teilung entstandenen, Individuen schwankt und beträgt 20 oder mehr, von denen fast jedes in seinem Kerne zwei Chromatinkörperchen aufweist. Diese sind gewöhnlich von gleicher Grösse und in einigen Merozoiten durch einen Faden verbunden; dagegen ist in Fig. 26 eines der Körperchen durch ein kleines Korn vertreten. Dieses Bild des Kernchromatins der Mikromerozoiten steht entweder in Beziehung zum Mechanismus der Mitose der Mikroschizontenkerne oder, was wohl wahrscheinlicher ist, es zeigt eine frühzeitige Teilung des Caryosomas an, die bei diesem Organismus zur Bildung eines Polycarions bestimmt ist.

A multiplicação dos cariozomas nos microesquizontes é realizada por processo identico ao que verificámos na macroesquizogonia, havendo aqui aspetos bem tipicos de promitoze (fig. 20).

CICLO SEXUADO DA ADELEA HARTMANNI.

I. — Redução do macrogametócito (maturação).

Como maturação dos macrogametócitos nos coccidios, têm sido descritos diversos processos que, com certeza, em parte nada têm que ver com a verdadeira maturação (processos de redução) e que consistem, ás vezes, em divisão nuclear apenas modificada.

Pelas observações de SCHAUDINN a maturação do macrogametócito no *Coccidium schubergi* consta da expulsão total do cariozoma, que é visto na superficie do plasma dividido em varios corpusculos, exercendo estes, segundo aquelle observador, atração sobre os elementos machos fecundantes. Na *Cyclospora caryolytica* o fenomeno de redução inicia-se pela fragmentação do cariozoma em finos granulos que se espalham na zona de suco nuclear. Divide-se então o nucleo, por mitoze primitiva, e das duas unidades rezultantes uma sofre nova mitoze, ficando assim formados trez nucleos, dos quais dois são reabsorvidos no citoplasma como nucleos reduzidos, e o terceiro constitue o pronucleo do macrogâmeta.

Na *Adelea ovata*, segundo SIEDLECKI, só a cromatina, da zona de suco nuclear (nucleo exterior) seria eliminada, talvez com uma pequena porção de substancia separada da superficie do cariozoma. Para se completar o fenomeno o nucleo do coccidio se aproximaria da periferia, rompendo-se-lhe a membrana e assim sendo eliminada parte da substancia nuclear, vista muitas vezes aderente á superficie do macrogâmeta. Este fenomeno, como já o notára SIEDLECKI, não é processo de redução,

Die Vermehrung der Caryosome vollzieht sich bei den Mikroschizonten durch einen ähnlichen Prozess, wie wir ihn bei der Makroschizogonie konstatiert haben, indem man hier typische Bilder einer Promitose findet (Fig. 20).

SEXUELLER CYCLUS BEI ADELEA HARTMANNI.

I. — Kernreduktion oder Reifung der Makrogametocyten.

Als Reifung der Makrogametocyten sind bei Coccidien ganz verschiedene Vorgänge beschrieben worden, die teilweise sicher nichts mit echten Reife- oder Reduktionsprozessen zu tun haben, welche stets nur in einer, wenn auch modifizierten, Kernteilung bestehen. Nach SCHAUDINN's Beobachtungen zeigt sich bei *Coccidium schubergi* die Reifung der Makrogametocyten durch die vollständigen Ausstossung des Caryosomas, welches an der Oberfläche des Plasmas in verschiedene Körperchen geteilt erscheint, die auf die befruchtenden männlichen Elemente eine Anziehung ausüben. Bei *Cyclospora caryolytica* beginnt die Reduktion mit einem Zerfall des Caryosomas in feine Körner, welche sich in der Kernsaftzone verteilen. Hierauf teilt sich der Kern durch eine primitive Mitose und jede von den zwei neugebildeten Einheiten geht wiederum eine Mitose ein, so dass drei Kerne entstehen, von denen zwei im Cytoplasma als Reduktionskerne absorviert werden, während der dritte den Pronucleus des Makrogameten bildet.

Bei *Adelea ovata* würde nach SIEDLECKI nur das Chromatin der Kernsaftzone (der Aussenkern) ausgestossen, vielleicht zusammen mit einer kleinen Menge von der Oberfläche des Caryosoms abgelöster Substanz. Bei Vollendung des Vorganges soll sich der Coccidienkern der Peripherie nähern, worauf die Kernmembran einreißt und so ein Teil der Kernsubstanz ausgestossen wird, den man öfters noch der Oberfläche des Makrogameten anhängen sieht. Dieser Vorgang ist,

e corresponde, segundo JOLLOS, á diminuição preliminar do nucleo nas divizões de maturação dos ovos dos metazoarios.

Como vimos, JOLLOS, nesse coccidio, observou, ao contrario, verdadeira divizão de redução, havendo, segundo elle, estrangulamento do cariozoma e eliminação de parte delle, cercada de camada de plasma.

Na *Adelea hartmanni*, pela interpretação que nos parece cabivel aos aspetos das fig. 24 e 25, e de muitas outras idênticas que observámos, a verdadeira divizão de redução do macrogametócito é igualmente realizada por mitoze de natureza especial, como passamos a referir:

Os macrogametócitos, antes da redução nuclear, apresentam grande nucleo, munido de volumoso cariozoma, quazi sempre excentrico e circundado de orla clara; para fóra desta orla, na zona de suco nuclear, a substancia acromatica, ora se acha disposta em larga faxa semilunar, que abraça em sua concavidade o cariozoma (fig. 22), ora se apresenta espalhada de modo difuzo (fig. 23). A membrana nuclear é bastante espessa e de contornos nitidos.

Como fenomeno inicial pensamos que parte da cromatina do cariozoma se difunde na zona de suco nuclear, sendo aí vista sob a fórmula de corpusculos colocados nas trabeculas de linina, ficando o cariozoma reduzido a pequena esfera, muito menor do que nos macrogametócitos em estádios anteriores.

Para a redução nuclear (fig. 24) o cariozoma se divide e metade delle, que permanece ligada á outra pelo filamento central, se afasta do cariozoma primitivo.

Em torno do novo cariozoma (centriolo) se condensa parte da cromatina da zona de suco nuclear, organizando-se assim um nucleo de redução, que se aproxima da superficie e é eliminado (fig. 25). Ha aí,

wie schon SIEDLECKI bemerkt hat, kein Reduktionsprozess, und entspricht nach JOLLOS wohl nur der, den Reifeteilungen vorausgehenden, Kernverminderung der Metazoeneier.

Wie wir sahen, hat dagegen JOLLOS bei diesem *Coccidium* eine echte Reduktionsteilung beobachtet, indem nach ihm eine Durchschnürung des Caryosomas und Ausstossung des einen Teiles mit einer umgebenden Plasmaschicht stattfindet.

Nach der Deutung, die mir den Bildern der Fig. 24 und 25 und vielen ähnlichen von mir beobachteten zuzukommen scheint, findet bei *Adelea hartmanni* gleichfalls eine echte Reduktionsteilung der Makrogametocyten durch eine besondere Art von Mitose statt, wie sie bereits geschildert wurde. Vor der Kernreduktion zeigen die Makrogametocyten einen grossen Nucleus mit voluminösem Caryosom, welches fast immer excentrisch liegt und von einem hellen Saume umgeben ist; nach aussen von diesem und innerhalb der Kernsaftzone findet sich die achromatische Substanz in Form eines breiten Halbmondes, welcher das Caryosom in seiner Konkavität einschliesst (Fig. 22) oder sie erscheint diffus verteilt (Fig. 23). Die Kernmembran ist ziemlich dick und deutlich umschrieben.

Der erste Vorgang besteht nach meiner Ansicht darin, dass ein Teil des Chromatins aus dem Caryosoma in die Kernsaftzone übertritt, wo es in Form von Körnchen erscheint, welche auf den Lininbälckchen verteilt sind; das Caryosom wird dadurch auf eine Kugel reduziert, welche viel kleiner ist, als bei den früheren Stadien der Makrogametocyten.

Bei der Kernreduktion (fig. 24) teilt sich das Caryosom und eine Hälfte desselben, die mit der andern durch die Centrifaser verbunden bleibt, entfernt sich von dem Caryosom; sie erleidet während des Vorganges keine Veränderung und bleibt ungeteilt.

Um das neue Caryosom (Centriol) kondensiert sich ein Teil des Chromatins der Kernsaftzone, indem sich so ein Re-

como se vê, eliminação de uma parte da substancia do cariozoma, previamente difundida na zona de suco nuclear, isto antes de divizão do cariozoma diminuido (centriolo). Este processo de redução pode ser interpretado como divizão nuclear modificada e assim ser colocado a par das verdadeiras divizões de redução observadas na *Cyclospora caryolytica* (SCHAUDINN) e *Adelea ovata* (JOLLOS), apesar da grande diferença aparente nesta ultima.

E' esta, entretanto, a interpretação que nos parece aceitavel, para as fig. 24 e 25, as quais evidentemente representam a maturação do macrogametócito, não se podendo confundir com os fenomenos de divizão multipla dos macroesquizontes, nem ainda com a divizão do macrogâmeta fecundado. Sobre esse assunto, porém, esperamos realizar novas observações, que melhor o esclareçam.

II. — Associação dos gametócitos.

Foram SCHAUDINN e SIEDLECKI (1897) que primeiro interpretaram, na *Adelea ovata*, a associação prévia de gametócitos como ato precursor da fecundação, dando-se, neste cazo, a formação dos microgâmetas no microgametócito aderente ao elemento femeo e havendo aí redução do numero destes — quatro nos coccidios do genero *Adelea*.

Segundo SIEDLECKI, de regra, um unico microgametócito se uniria ao elemento femeo, sendo raro observar-se associação com dois elementos machos. Na observação de DOBELL, porém, essa ultima occurencia seria frequente.

A associação, na *Adelea hartmanni*, de dois microgametócitos a um macrogametócito é comumente vista (fig. 26) e tivemos oportunidade de observar alguns cazos de associação nos quais era de quatro

duktionskern bildet, welcher sich der Oberfläche nähert und ausgestossen wird (Fig. 25). Wie man sieht, findet hier die Ausstossung eines Teiles der Caryosomsubstanz statt, welche zuerst in die Kernsaftzone übergetreten war, jedoch erst nach einer Teilung der verkleinerten Caryosom (Centriols). Dieser Reduktionsvorgang lässt sich mithin als eine modifizierte Kernteilung auffassen und somit den echten Reduktionsteilungen bei *Cyclospora caryolytica* (SCHAUDINN) u. *Adelea ovata* (JOLLOS) anreihen, trotz der scheinbar grossen Abweichung gegenüber der letzteren. Dies scheint mir immerhin für die Figuren 24 und 25 die einzig annehmbare Deutung, da sie offenbar die Reifung des Makrogametocyten zeigen und sich weder mit dem Vorgange der multiplen Teilung der Makroschizonten, noch mit der Teilung des befruchteten Makrogameten verwechseln lassen. Doch hoffe ich zur weiteren Aufklärung dieses Themas neue Beobachtungen anstellen zu können.

II. — Vereinigung der Gametocyten.

SCHAUDINN u. SIEDLECKI (1897) waren die ersten, welche bei *Adelea ovata* die Vereinigung der Gametocyten als einleitenden Akt für die Befruchtung auffassten, indem hier die Bildung der Mikrogameten in dem bereits am weiblichen Elemente haftenden Mikrogametocyten stattfindet, wobei ihre Zahl beim Genus *Adelea* stets vier beträgt. Nach SIEDLECKI soll sich in der Regel nur ein Mikrogametocyt dem weiblichen Elemente beigesellen und eine Vereinigung mit zwei männlichen Elementen selten sein; dagegen war in den Beobachtungen von DOBELL letzteres Vorkommnis häufig.

Bei *Adelea Hartmanni* ist die Vereinigung eines Makrogametocyten mit zwei Mikrogametocyten ganz gewöhnlich (Fig. 26) und ich sah auch einige Fälle solcher Vereinigungen, bei welchen die Zahl der Mikrogametocyten vier betrug (Fig. 28), ein meines Wissens in der Coccidienliteratur noch unbeschriebener Fall.

o numero de microgametócitos (fig. 28), fato esse que não conhecemos referido na literatura dos coccidios.

Muito frequente, sinão constante, é a incluzão dos gametócitos associados no interior de espaço limitado por membrana de contornos nitidos e de bastante espessura, permanecendo essa membrana atravez todos os estádios da fecundação, até á divisão do macrogâmeta fecundado em esporoblastas. (fig. 26 a 30).

Sobre a intrepetação desse aspeto permanecemos indecizo entre duas hipotezes; ou representa a membrana externa os limites da celula epitelial em que se tenha realizado a evolução dos gametócitos, e, nesse cazo, a fecundação deste coccidio, ao contrario do que acontece nas outras especies do genero *Adelea*, seria intracelular, ou, na segunda hipoteze que nos parece mais provavel, haveria aqui fenomeno semelhante ao que se verifica na associação das gregarinas, onde os gametócitos (gamontes) são incluídos no interior de verdadeira membrana cistica (Cisto de associação). Nunca observámos, nos aspetos numerosos de associação que se nos apresentaram, restos de plasma celular, e, por outro lado, contra a primeira hipoteze fala ainda a coincidência frequente da evolução, na mesma celula, de organismos dos dois sexos. Poderia, é certo, haver a penetração de microgametócitos nas celulas epiteliaes em que se desenvolvem elementos femeos, a modo do que acontece na « *Klossia helicina* », dando-se dentro da celula a fecundação. Só a pratica de córtes poderá esclarecer definitivamente esse ponto.

A incluzão dos dois gametócitos no interior de membrana cistica, isto é, a presença aqui de cistos de associação, não importaria, aliaz, em anomalia de grande monta; expressaria mais condição biologica comum aos coccidios e ás gregarinas no ciclo sexuado, condição que serviria, como o fazem outros fenomenos, para indicar as estreitas relações filojeneticas entre os dois grupos dos telosporidios.

Sehr häufig, wenn nicht konstant, ist der Einschluss der vereinigten Gametocyten im Innern eines beschränkten Raumes durch eine ziemlich dicke und deutlich umschriebene Membran, welche durch alle Befruchtungsstadien bis zum Zerfall der befruchteten Makrogameten in Sporoblasten bestehen bleibt (Fig. 26—30). Bei der Deutung dieser Erscheinung konnte ich zwischen zwei zulässigen Erklärungen nicht entscheiden; entweder repräsentiert die äussere Membran die Grenzen einer Epithelialzelle, in welcher die Entwicklung der Gametocyten stattfand (und in diesem Falle wäre die Befruchtung unseres Coccidiums, im Gegensatz zu den anderen Adeleaarten, eine intracelluläre), oder, was mir wahrscheinlicher erscheint, es fände hier etwas Aehnliches statt, wie bei den Gregarinen, wo die Gametocyten (Gamonten) im Innern einer wirklichen Cystenmembran eingeschlossen sind. Bei den zahlreichen Bildern einer Vereinigung, die ich zu sehen Gelegenheit hatte, konnte ich niemals Reste von Zellplasma erkennen und andererseits spricht auch gegen die erste Hypothese das allzuhäufige Zusammentreffen der gleichzeitigen Entwicklung von Organismen verschiedenen Geschlechtes im Innern einer und derselben Zelle. Es könnte allerdings ein Eindringen von Mikrogametocyten in Epithelialzellen, in welchen sich weibliche Elemente entwickelt haben, stattfinden, wie dies bei der *Klossia helicina* der Fall ist, worauf eine intracelluläre Befruchtung stattfände. Diese Frage kann nur durch die Schnittmethode definitiv aufgeklärt werden.

Der Einschluss der beiden Gametocyten innerhalb einer Cystenmembran, d. h. das Vorkommen von Associationscysten, würde übrigens keine sehr auffällige Anomalie darstellen; vielmehr wäre sie der Ausdruck eines weiteren, beiden Gruppen der Coccidien und Gregarinen gemeinsamen, Zustandes des sexuellen Cyclus, welcher, ebenso wie andere Erscheinungen, dazu dienen würde, die engen phylogenetischen Beziehungen zwischen den beiden Telosporidiengruppen zu erweisen.

III. — Fecundação.

Os microgametócitos, da *Adelea hartmanni*, quando aderentes aos macrogametócitos, se apresentam como organismos de forma e de dimensões variáveis, ora ovoides (fig. 28) ora mais ou menos alongados (fig. 33 e 35). O núcleo, ás vezes unico, como na fig. 35, mostra-se frequentemente com diversos cariozomas, quasi sempre em numero de quatro (policario). Não raro, como na fig. 33, o microgametócito apresenta quatro núcleos distintos, possuindo cada um delles grande cariozoma destinado a formar o microgâmeta. Não nos foi possível acompanhar o processo de formação dos microgâmetas; dada, porém, a condição de polienergia do núcleo do microgametócito, é de acreditar que sejam os elementos fecundantes machos formados pela ruptura daquelle policario.

Os microgâmetas são pequenos organismos, piriformes, com uma das extremidades afilada, constituídos quasi só de cromatina (fig. 26 e 34); são vistos, ora na superfície dos microgametócitos, ora colocados num ponto qualquer do espaço limitado pela membrana externa. Antes da penetração do microgâmeta o núcleo do macrogâmeta forma o *fuzo de copulação*, cuja estrutura exata vem representada nas fig. 26 e 37. Destas, a ultima representa um macrogâmeta livre e fecundado, do qual já se destacou o microgametócito.

No fuzo de copulação a maior parte da cromatina do cariozoma permanece num dos pólos, distribuída em corpusculos distintos (cromozomios?). A linina forma duas faxas de fibrilas, que se dispõem longitudinalmente, constituindo dois arcos de concavidade para dentro e limitando externamente o fuzo. No centro deste ha sempre uma fibra ou fibrilas de substancia acromatica, que apresentam em todo comprimento, irregularmente dispostos, corpusculos de cromatina; no meio do filamento central, ocupando quasi sempre exactamente o centro do fuzo, existe uma granulação, maior e esferica, de substancia

III. — Befruchtung.

Die Mikrogametocyten der *Adelea Hartmanni*, welche den Makrogametocyten anhaften, erscheinen als Organismen von wechselnder, bald eiförmiger (Fig. 28), bald mehr oder weniger länglicher Gestalt (Fig. 33 und 35). Der, manchmal, wie in Fig. 35, einheitliche, Kern zeigt oft mehrfache Caryosomen, fast immer in der Vierzahl (Polycaryon). Nicht selten zeigt der Mikrogametocyt vier Kerne (Fig. 33), von denen jeder ein grosses, für die Bildung der Mikrogameten bestimmtes Caryosom aufweist. Es war mir nicht möglich, diesen Bildungsprozess zu verfolgen; doch ist es, in Hinsicht auf die Polyenergie des Mikrogametocytenkernes, wahrscheinlich, dass die befruchtenden männlichen Elemente durch Ruptur dieses Polycaryons entstehen.

Die Mikrogameten sind kleine birnförmige, an einem Ende zugespitzte und fast nur aus Chromatin bestehende Elemente (Fig. 26 und 34); man findet sie bald an der Oberfläche des Mikrogametocytens, bald an einer beliebigen Stelle des, von der Aussenmembran begrenzten, Raumes. Vor dem Eindringen des Mikrogameten bildet der Makrogametenkern eine Kopulationsspindel, deren genauere Struktur in Fig. 26 und 37 dargestellt ist. Letztere zeigt einen freien und befruchteten Makrogameten, von dem sich der Mikrogametocyt bereits abgelöst hat.

Bei der Kopulationsspindel bleibt die Hauptmasse des Caryosomchromatines, in deutliche Körperchen (Chromosomen?) geteilt, an einem der Pole. Das Linin bildet zwei dicke Fibrillenbündel, welche sich längsweise anordnen und zwei nach innen konkave Bogen bilden, welche die Spindel nach aussen begrenzen. Im Centrum derselben findet sich immer eine Faser oder eine Anzahl von Fibrillen achromatischer Substanz, welche in ihrer ganzen Länge unregelmässig gelagerte Chromatinkörperchen zeigen; in der Mitte der Centalfaser und fast immer genau im Centrum der Spindel findet sich ein

cromatica (Fig. 37). O microgâmeta penetra pelo pólo afilado do fuзо (Fig. 26), havendo a fuzão da cromatina delle com a do macrogâmeta sobre o filamento central. Depois da penetração do microgâmeta, que transforma o macrogâmeta em *oocineto*, aparece na superficie deste membrana espessa, que vai constituir a membrana do cisto (fig. 26, 27 etc.).

IV. — Formação dos esporoblastos.

A primeira divizão do nucleo, no oocineto (fig. 27, vista um pouco de perfil) é realizada por mitoze, na qual a cromatina do cariozoma, pelo que pudemos concluir de alguns aspetos observados, se divide por estrangulamento em duas metades, que são levadas pelos centriolos para as extremidades do fuзо, aí constituindo placas polares; a cromatina da zona de suco nuclear se dispõe em cromozomios cujo numero e mecanismo de divizão não nos foi dado conhecer exatamente.

Dos dois nucleos rezultantes da primeira divizão só um sofre, na maioria das vezes, segunda mitoze (fig. 29), de modo que, no cisto, são formados trez esporoblastas. Isso constitue, sem duvida, anomalia biologica, porquanto não conhecemos explicação para a dezharmonia de proceder dos dois nucleos filhos, rezultantes da primeira mitoze. Certo é, porém, que os cistos deste coccidio contêm apenas trez esporoblastas, conforme o demonstram amplamente as fig. 32 e 36, especialmente a ultima, nas quais os esporoblastas contidos no interior de um cisto ainda intato, se acham afastados uns dos outros, o que permitiria ver um quarto esporoblasta, se este existisse colocado em plano inferior.

Havia, nesse ponto, possibilidade de erro de interpretação, porquanto, tratando-se do estudo em esfregaços, um quarto esporoblasta poderia permanecer não vi-

grösseres und rundes Korn von chromatischer Substanz (Fig. 37).

Der Mikrogamet dringt fast immer an zugespitzten Ende der Spindel ein (Fig. 26), und es findet eine Fusion seines Chromatines mit demjenigen des Makrogameten auf der Centralspindel statt. Nach Eindringen des Mikrogameten, durch welches der Makrogamet zum Ookineten wird, erscheint an seiner Oberfläche eine dicke Membran, welche zur Cystenhaut wird (Fig. 26, 27 etc.).

IV. — Sporoblastenbildung.

Die erste Kernteilung im Ookineten (in Fig. 27 etwas von der Seite gesehen) findet durch eine Mitose statt, bei welcher das Chromatin des Caryosoms, soweit wir nach den vorliegenden Bildern urteilen konnten, in zwei Hälften durchgeschnürt wird, welche durch die Centriolen an die Enden der Spindel geführt werden, wo sie Polplatten bilden; das Chromatin der Kernsaftzone ordnet sich um den Centralfaden zu Chromosomen, über deren Zahl und Teilungsmechanismus ich nichts genaueres ausfindig machen konnte.

Von den beiden Kernen, die aus der ersten Teilung hervorgehen, geht in der Mehrzahl der Fälle nur einer eine zweite Teilung ein (Fig. 29), so dass in der Cyste drei Sporoblasten gebildet werden. Es repräsentiert dies zweifelsohne eine biologische Anomalie, da mir ein Grund für das ungleiche Verhalten der aus der ersten Mitose hervorgehenden Kerne nicht bekannt ist. Immerhin steht fest, dass die Cysten dieses Coccidiums nur drei Sporoblasten enthalten, wie zur Genüge aus den Fig. 32 und 36 hervorgeht, in welchen die, im Innern einer intakten Cyste enthaltenen, Sporoblaste von einander abstehen, so dass man einen vierten Sporoblasten leicht erkennen könnte, falls ein solcher sich in einer tieferen Ebene befände.

In diesem Punkte wäre eine fehlerhafte Auffassung möglich gewesen, da beim Studium von Ausstrichpräparaten ein vierter Sporoblast sich der Wahrnehmung entziehen könnte; ich habe daher die Beob-

zível ; repetimos, por isso, a observação em multiplos cistos, especialmente naquelles com esporoblastas destacados, tendo sempre a impressão da existencia de trez unidades. Aliaz, condição biologica similar é encontrada na *Benedenia eberthi*, coccidio, cujos esporoblastas se dividem em numero impar de esporozoitas, trez, o que indica, nas divizões do nucleo do esporoblasta, proceder identico ao observado no oocineto da *Adelea hartmanni*.

Para a formação de esporozoitas o nucleo do esporoblasta sofre primeira divizão no sentido do maior eixo, ficando os dois novos nucleos, a principio, com a cromatina condensada, colocados nos pólos opostos do esporoblasta (fig. 32). Cada novo nucleo se divide no sentido transversal, por processo de mitoze, com formação de um fuзо irregular de substancia acromatica, em cujo centro existe um filamento cromatico espesso (fig. 36). Sobre este e em torno d'elle, se dispõe toda a cromatina em alguns corpusculos (cromozomios?) quatro ou seis, de cuja divizão resultam dois novos nucleos, nos quais a principio, a substancia cromatica se acha em duas porções, ligadas entre si por delgada fibrila (fig. 38). Os quatro nucleos, assim constituídos, são os nucleos dos quatro esporozoitas em que se divide o esporoblasta.

No esporio maduro os esporozoitas em numero de quatro, acham-se colocados de modo que as extremidades posteriores de dois delles ficam em contato com as anteriores dos dois outros. Os nucleos ficam dispostos em dois pares opostos, apresentando-se o esporio como figura simetrica.

Dentro do esporio o plasma dos esporozoitas apresenta grandes alveolos, o nucleo mostra espessa membrana e um diminuto cariozoma central (fig. 39). Em esporozoitas livres (fig. 40) a estrutura é a mesma, havendo apenas que referir a presença de granulações de cromatina distintas na membrana nuclear, aspeto ausente nos esporozoitas ainda no esporocisto.

achtung in zahlreichen Cysten, besonders solchen mit abstehenden Sporoblasten wiederholt und stets den Eindruck erhalten, dass nur drei Einheiten vorhanden waren. Uebrigens findet sich ein ähnliches biologisches Verhalten bei der *Benedenia eberthi*; bei diesem Coccidium teilen sich die Sporoblasten in eine ungerade Anzahl von Sporozoiten, was bei der Teilung des Sporoblastenkernes ein ähnliches Verhalten andeutet, wie es bei der *Adelea hartmanni* vorliegt.

Bei Bildung der Sporozoiten erleidet der Sporoblastenkern eine erstmalige Teilung in der Richtung der längeren Axe, wobei die zwei neuen Kerne, deren Chromatin anfangs kondensiert ist, sich an den entgegengesetzten Polen des Sporoblasten lagern (Fig. 32). Jeder der beiden Tochterkerne teilt sich in querer Richtung durch eine Mitose mit Bildung einer unregelmässigen Spindel von achromatischer Substanz, in deren Centrum ein dicker Chromatinfaden liegt (Fig. 36). Auf und um diesen ordnet sich das ganze Chromatin in vier oder sechs Körperchen (Chromosomen?), aus deren Teilung zwei neue Kerne hervorgehen, in welchen anfangs die chromatische Substanz zwei mit einander durch eine dünne Faser verbundene Massen bildet (Fig. 38). Die vier so gebildeten Kerne entsprechen den vier Sporozoiten, in welche sich der Sporoblast teilt.

In der reifen Spore finden sich die vier Sporozoiten so gelagert, dass zwei derselben mit den Hinterenden die Vorderenden der beiden andern berühren. Die Kerne sind in zwei entgegengesetzte Paare geordnet, so dass die Spore eine symmetrische Figur zeigt.

Im Innern der Spore sieht man das grosswabige Plasma der Sporozoiten, während der Kern eine dicke Membran und ein kleines centrales Caryosom zeigt (Fig. 39). Die Struktur der freien Sporozoiten (Figur 40) ist dieselbe. Nur ist das Vorkommen von deutlichen Chromatinkörnchen in der Kernmembran zu erwähnen, welches bei den noch in den Sporocysten eingeschlossenen Sporozoiten vermisst wird.

CONCLUZÕES.

- I. A *Adelea hartmanni* apresenta, no ciclo esquizogonico, dimorfismo bem caracterizado.
- II. A divisão múltipla, na macro- e na microesquizogonia, ora se realiza por meio de mitozes homopolares do núcleo, ora pela ruptura de um policario, com passagem para o plasma e multiplicação aí dos cariozomas (núcleos secundarios). No mesmo organismo pode ser observada a simultaneidade dos dois processos.
- III. A associação dos gametócitos neste coccidio oferece, de curioso, a presença, na superficie dos organismos associados, de uma membrana. Serão cistos de associação, ou representará a membrana externa os limites da célula epitelial em que tenham crecido os dois organismos?
- IV. Na associação o numero de microgametas é as mais das vezes de dois, podendo haver cazos de quatro microgametócitos.
- V. O numero de esporoblastas de cada cisto é, as mais das vezes, provavelmente sempre, de trez.
- VI. Deverá esse coccidio, em vista do numero de esporoblastas contidos em cada cisto (trez), determinar a criação de novo genero? Os aspetos de semelhança que apresenta, nos dois ciclos evolutivos, com a *Adelea ovata*, fazem com que o conservemos nesse genero, dedicando a especie ao nosso estimado mestre, Prof. Dr. MAX HARTMANN.

Concluindo, deixamos aqui os protestos de nosso reconhecimento ao diretor deste Instituto, o nosso mestre Dr. OSWALDO CRUZ, pelos conselhos que nos dispensou na elaboração deste trabalho.

Manguinhos, Maio de 1910.

SCHLUSSFOLGERUNGEN :

- I. *Adelea Hartmanni* zeigt in ihrem Schizogonicyclus einen ausgesprochenen Dimorphismus.
- II. Die multiple Teilung bei der Makro- und Mikroschizogonie vollzieht sich bald durch eine homopolare Mitose des Kernes, bald durch Ruptur eines Polycaryon's unter Austreten der Caryosomen (Sekundarkerne) ins Plasma und nachfolgender Vermehrung daselbst. Die Gleichzeitigkeit beider Vorgänge kann bei demselben Organismus beobachtet werden.
- III. Die Verbindung der Gametocyten zeigt bei diesem Coccidium die Eigentümlichkeit, dass an der Oberfläche der verbundenen Organismen eine Membran existiert. Es ist unentschieden, ob dies Copulationscysten sind oder ob die Membran die Grenze der Epithelialzelle darstellt, in welcher die Organismen heranwachsen.
- IV. Bei der Verbindung beträgt die Zahl der Mikrogametocyten meistens zwei, manchmal sogar vier.
- V. Die Zahl der Sporoblasten in jeder Cyste beträgt gewöhnlich (und wahrscheinlich immer) drei.
- VI. Man könnte daran denken für dieses Coccidium, mit Rücksicht auf die Zahl der Sporoblasten in jeder Cyste (drei), ein neues Genus aufzustellen. Die morphologische Aehnlichkeit, welche sein Entwicklungscyclus mit demjenigen der *Adelea ovata* zeigt, bewegt mich jedoch, es diesem Genus einzureihen, während ich die Species meinem verehrten Lehrer, Prof. MAX HARTMANN widme.

Zum Schlusse spreche ich noch dem Direktor dieses Institutes, meinem Lehrer Dr. OSWALDO CRUZ für die Ratschläge, welche er mir bei dem Abfassen dieser Arbeit erteilte, meinen besten Dank aus.

Manguinhos, Mai 1910.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS.

ESTAMPAS II-15.

MACROESQUIZOGONIA.

- Fig. 1. Macromerozoito.
 Fig. de 2 a 5. Macroesquizontes.
 Fig. 3. Promitose do cariozoma.
 Fig. 4. Mitoze do cariozoma com placas polares e placa equatorial.
 Fig. 5. Mitoze do nucleo.
 Fig. 6. Centriolo dividido num cariozoma.
 Fig. 7. Macroesquizonte com diversos cariozomas.
 Fig. 8 e 9. Macroesquizontes cujos nucleos contêm varios cariozomas.
 Fig. 8 a. Mitoze do cariozoma. Centriolos muito claros.
 Fig. de 9 a a 12. Multiplicação de nucleos e de cariozomas no plasma de macroesquizontes.
 Fig. 13 e 13 a. Estádios que precedem a divisão do plasma.
 Fig. 14 e 15. Fórmias segmentadas de macroesquizontes.

MICROESQUIZOGONIA.

- Fig. 16. Micromerozoito.
 Fig. 17. Microesquizonte com policario.
 Fig. 18. Ruptura do nucleo do microesquizonte.
 Fig. 19. Microesquizonte com diversos cariozomas no plasma.
 Fig. 20. Multiplicação de cariozomas no plasma do microesquizonte.
 Fig. 21. Forma segmentada na microesquizogonia.

CICLO SEXUADO.

- Fig. 22 e 23. Macrogametócitos.
 Fig. 24 e 25. Redução nuclear (maturação) dos macrogametócitos.
 Fig. 26. Associação de dois microgametócitos com um macrogametócito. Penetração do microgâmeta. *Fuzo de copulação*.
 Fig. 27. Divisão do nucleo do microgâmeta fecundado.
 Fig. 28. Associação com quatro microgametócitos.
 Fig. 29. Macrogâmeta fecundado com trez nucleos. Um dos nucleos permaneceu indivizo.
 Fig. 30. Formação de esporoblastas. Microgametócito ainda aderente ao cisto, incluído na membrana externa.

ERKLAERUNG DER FIGUREN.

TAFELN II-15.

MACROSCHIZOGONIE.

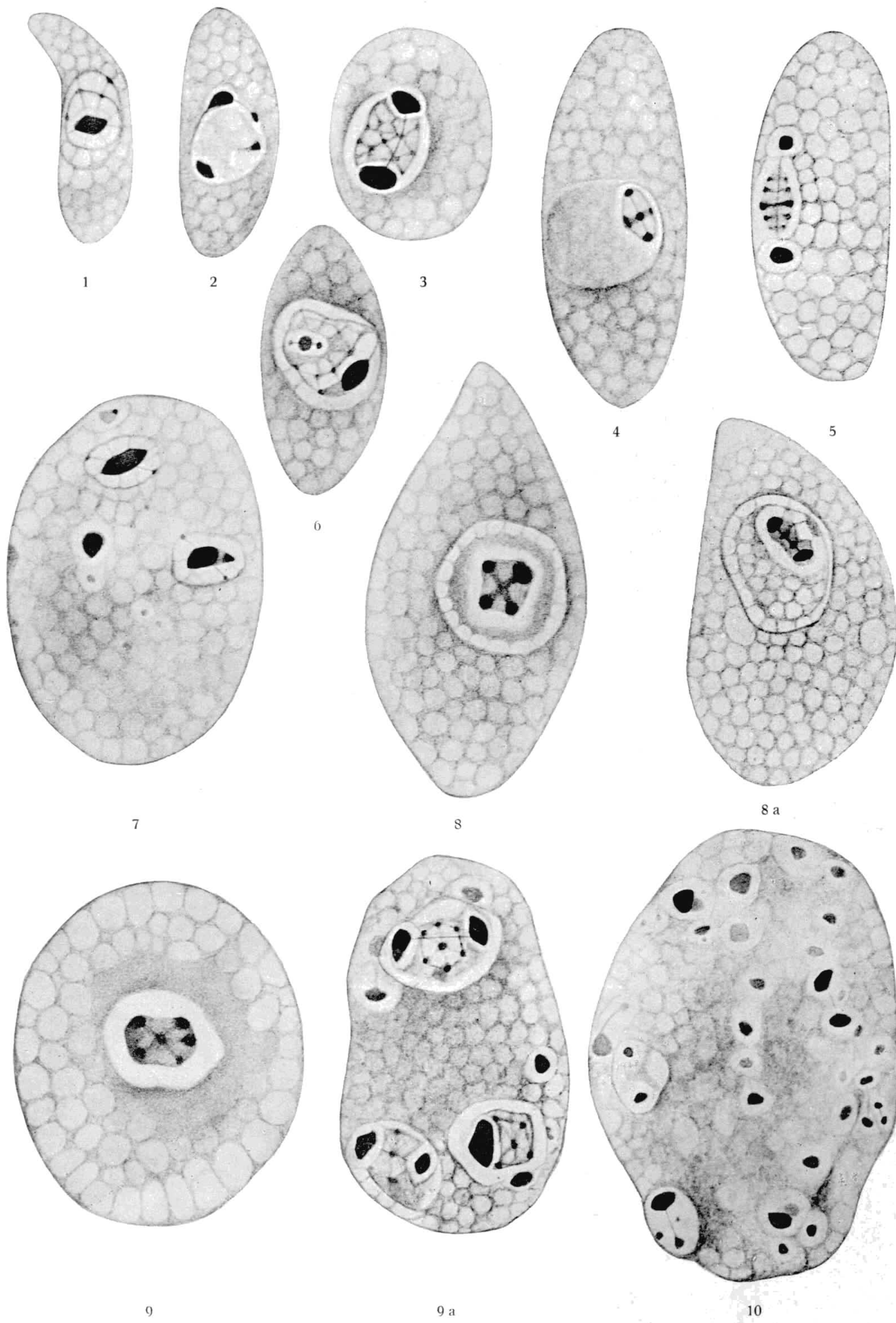
- Fig. 1. Makromerozoit.
 » 2-5. Makroschizonten.
 » 3. Promitose des Caryosoms.
 » 4. Mitose des Caryosoms mit Polarplatte.
 » 5. Kernmitose.
 » 6. Caryosom mit geteiltem Centriol.
 » 7. Makroschizont mit mehreren Caryosomen.
 » 8-9. Makroschizonten, deren Kerne mehrere Caryosomen enthalten.
 » 9-12. Caryosommitose mit sehr deutlichen Centriolen.
 » 9-12. Vermehrung der Kerne und Caryosomen im Plasma des Makroschizonten.
 » 13-13 a. Stadien, die der Plasmateilung vorangehen.
 » 14-15. Segmentierte Makroschizonten.

MICROESCHIZOGONIE.

- Fig. 16. Mikromerozoit.
 » 17. Mikroschizont mit Polycarion.
 » 18. Ruptur des Mikroschizontenkernes.
 » 19. Mikroschizont mit mehreren Caryosomen im Plasma.
 » 20. Vermehrung des Caryosoms im Plasma des Mikroschizonten.
 » 21. Segmentierte Mikroschizogoniform.

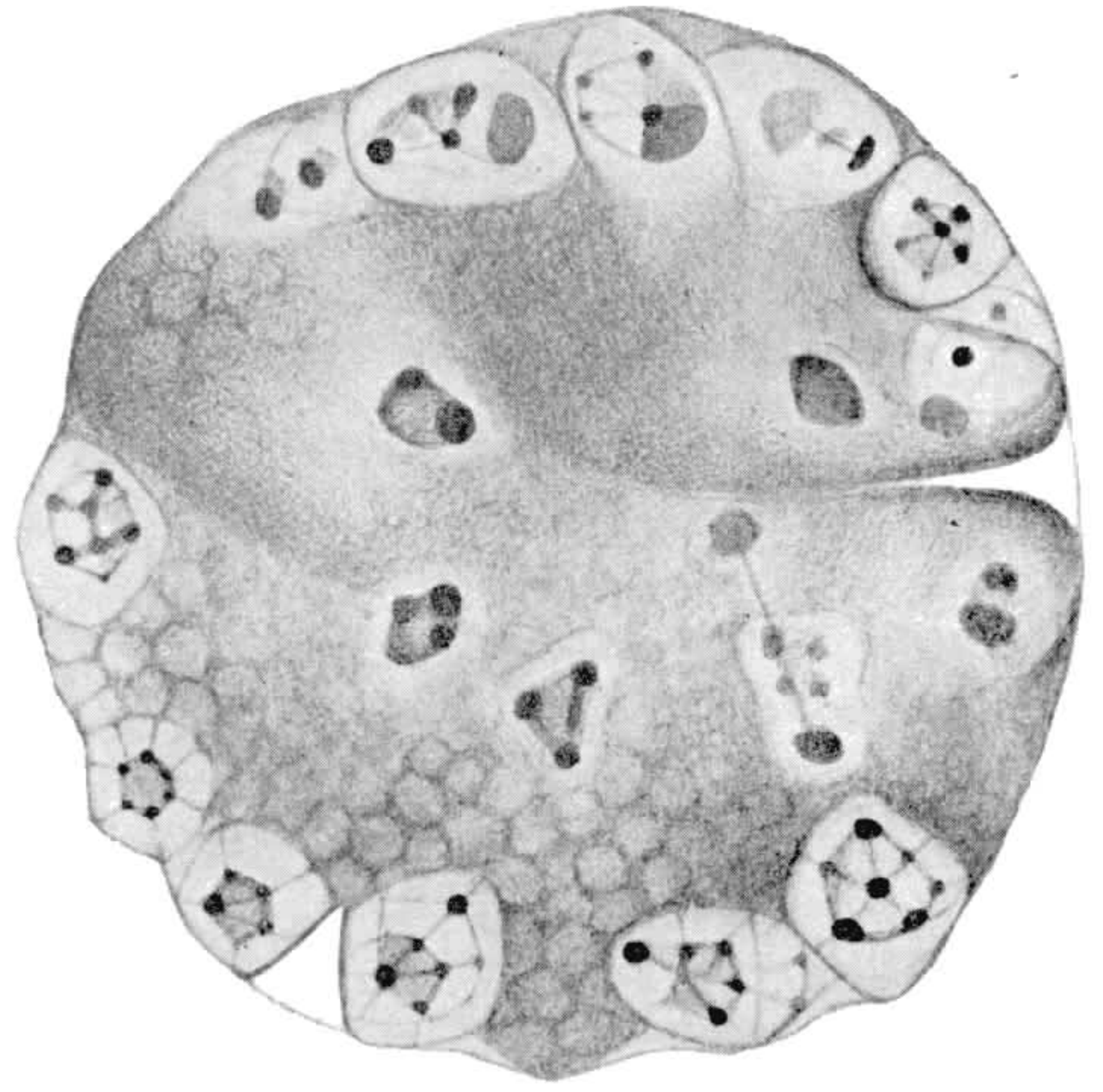
SEXUELLER CYCLUS.

- » 22-23. Makrogametocyten.
 » 24-25. Kernreduktion (Reifung) des Makrogametocyten.
 » 26. Vireinigung zweier Mikrogametocyten mit einem Makrogameten. Kopulationsspindel.
 Fig. 27. Kernteilung des befruchteten Makrogameten.
 » 28. Verbindung mit vier Mikrogametocyten.
 » 29. Befruchteter Makrogamet mit drei Kernen; einer derselben verbleibt ungeteilt.
 » 30. Bildung von Sporoblasten. Mikrogametocyt der Cyste noch anhängend und von der Aussenmembran umgeben.

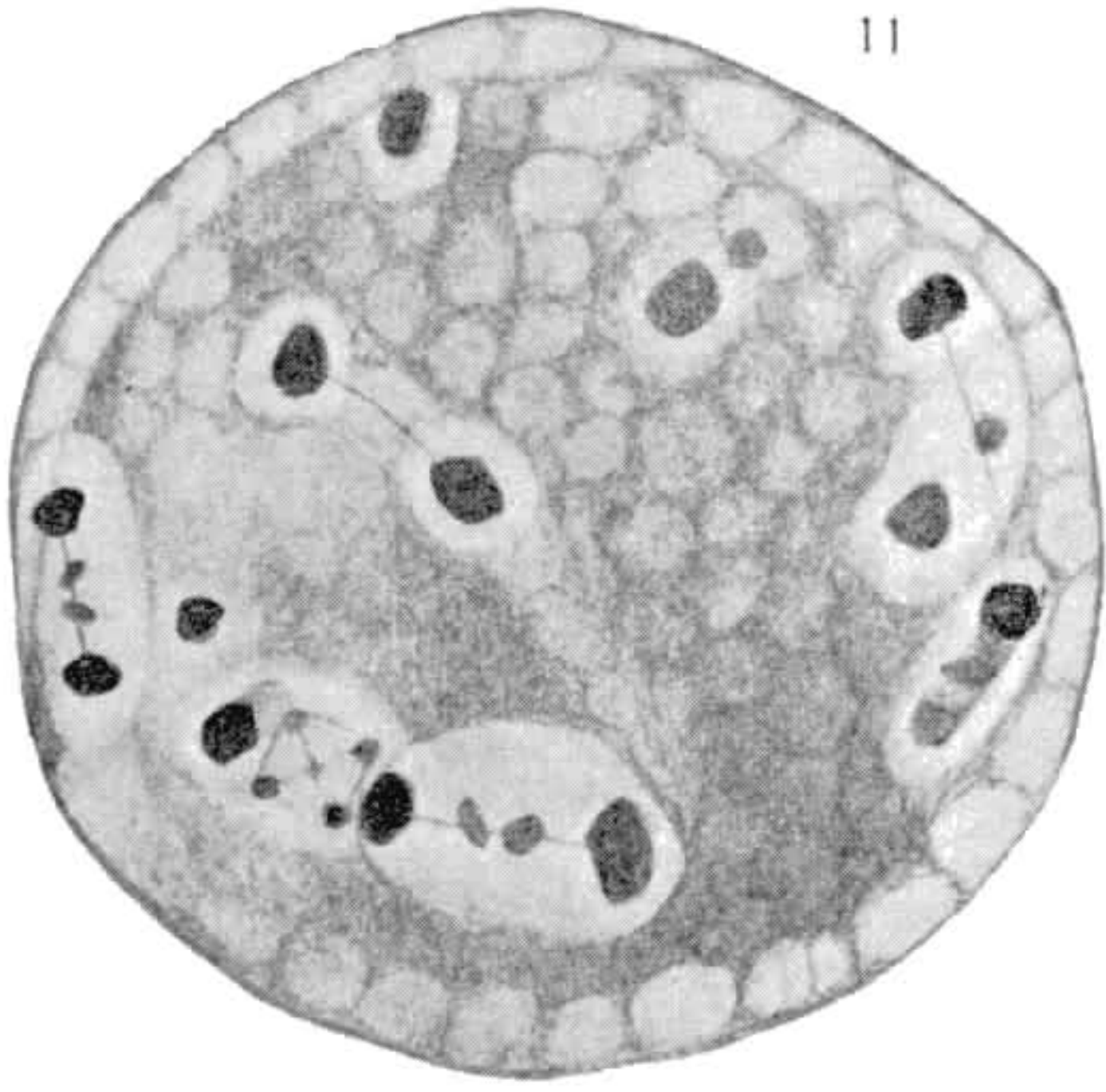




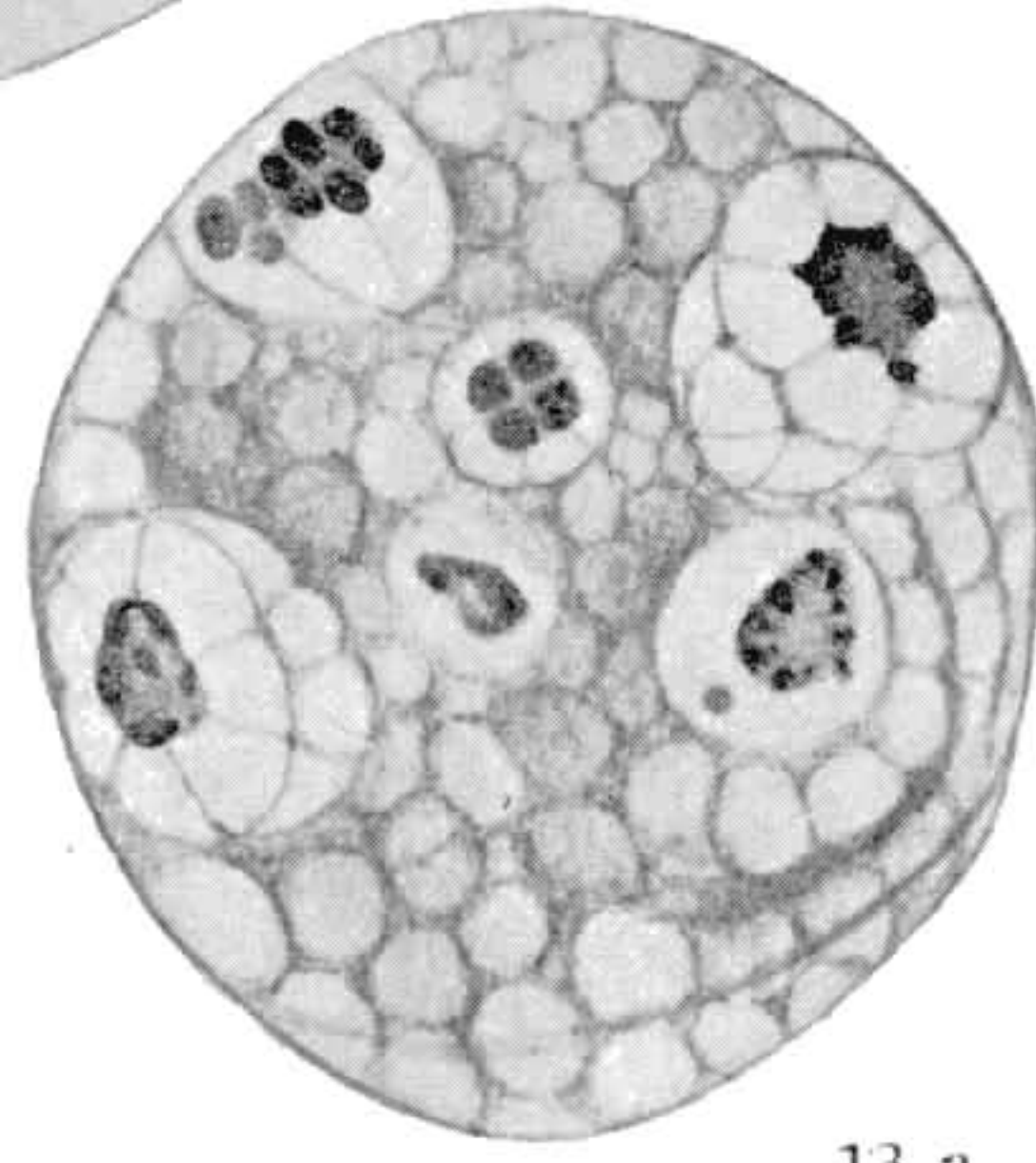
11



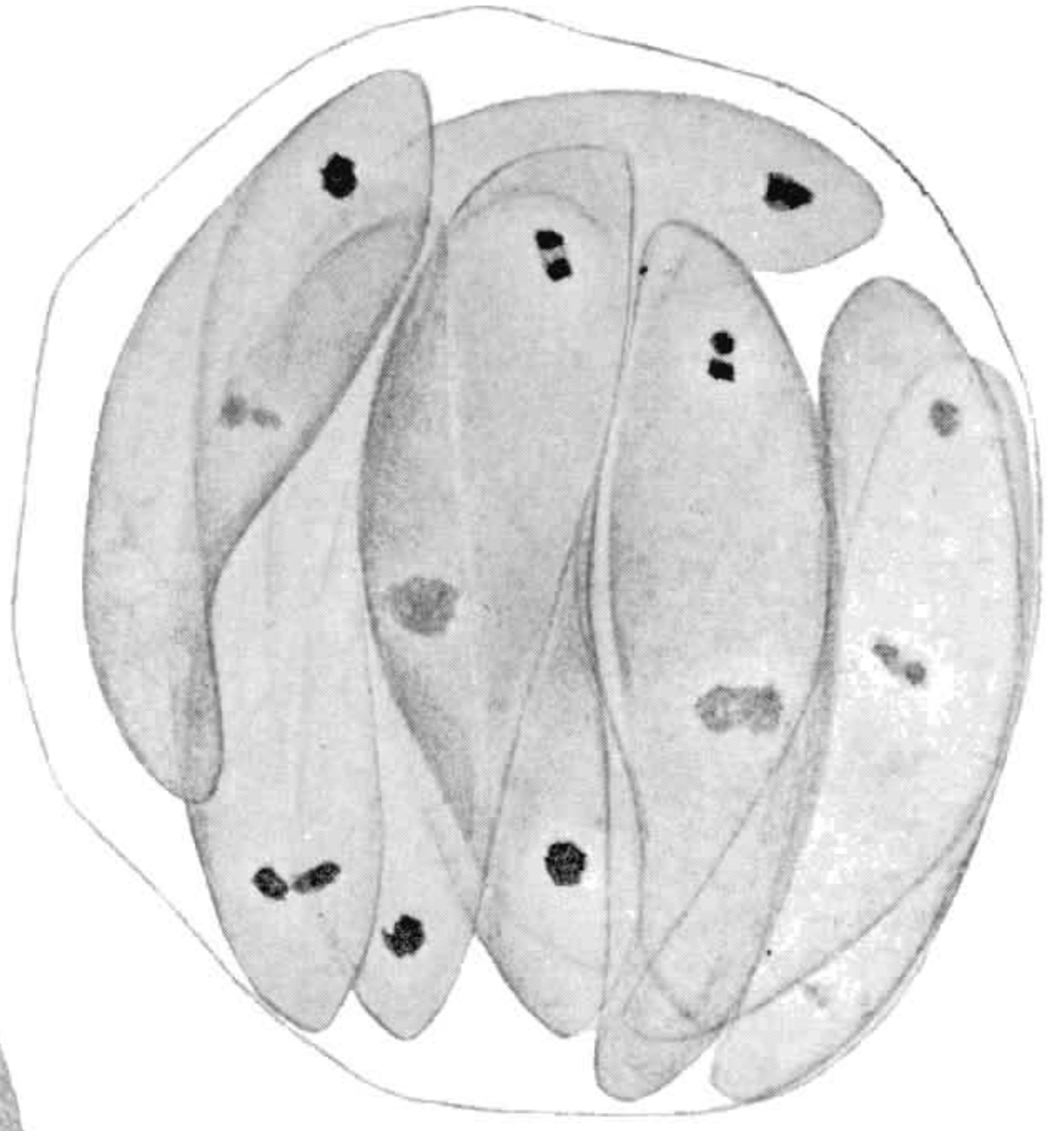
13



12



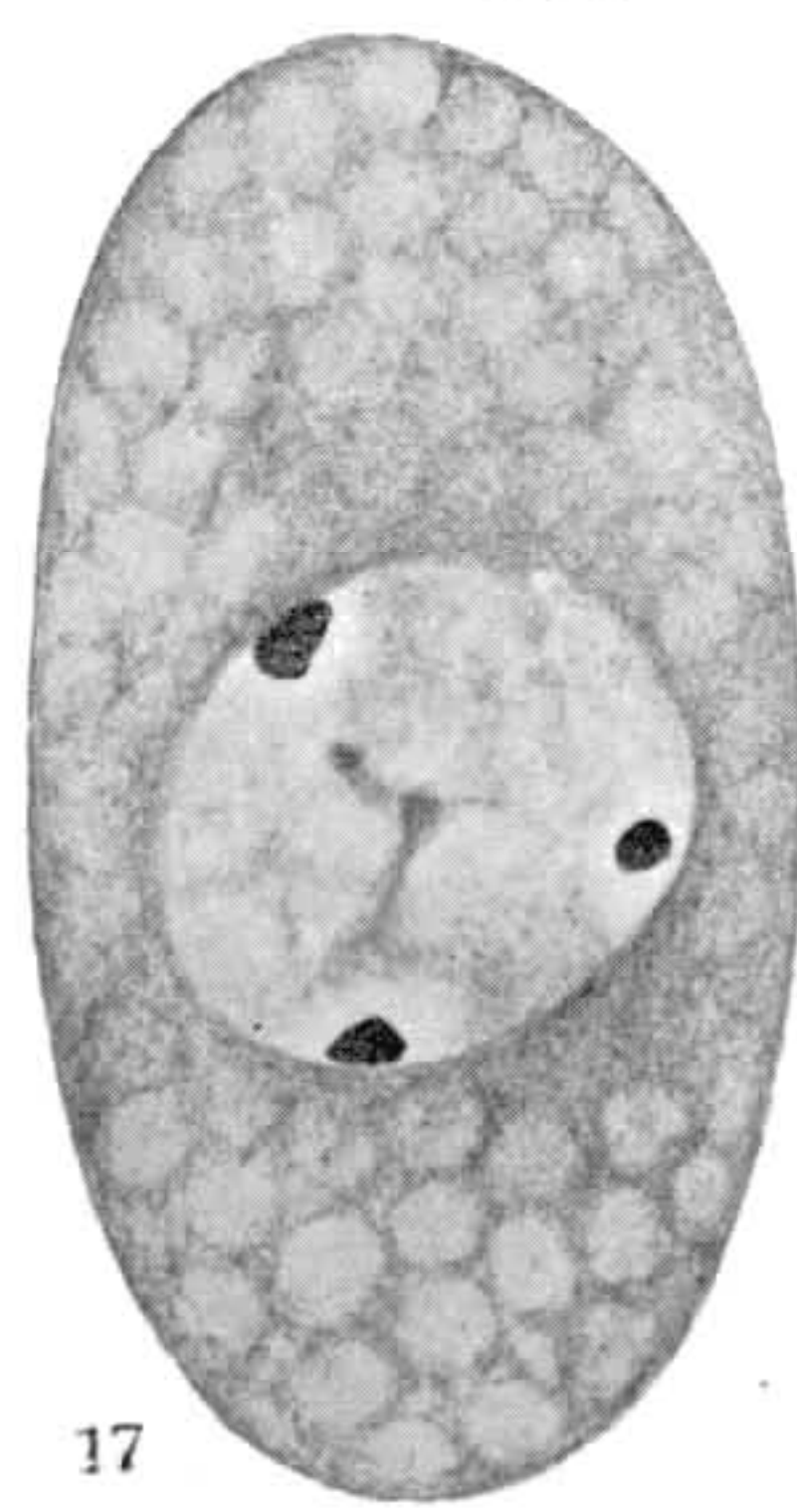
13 a



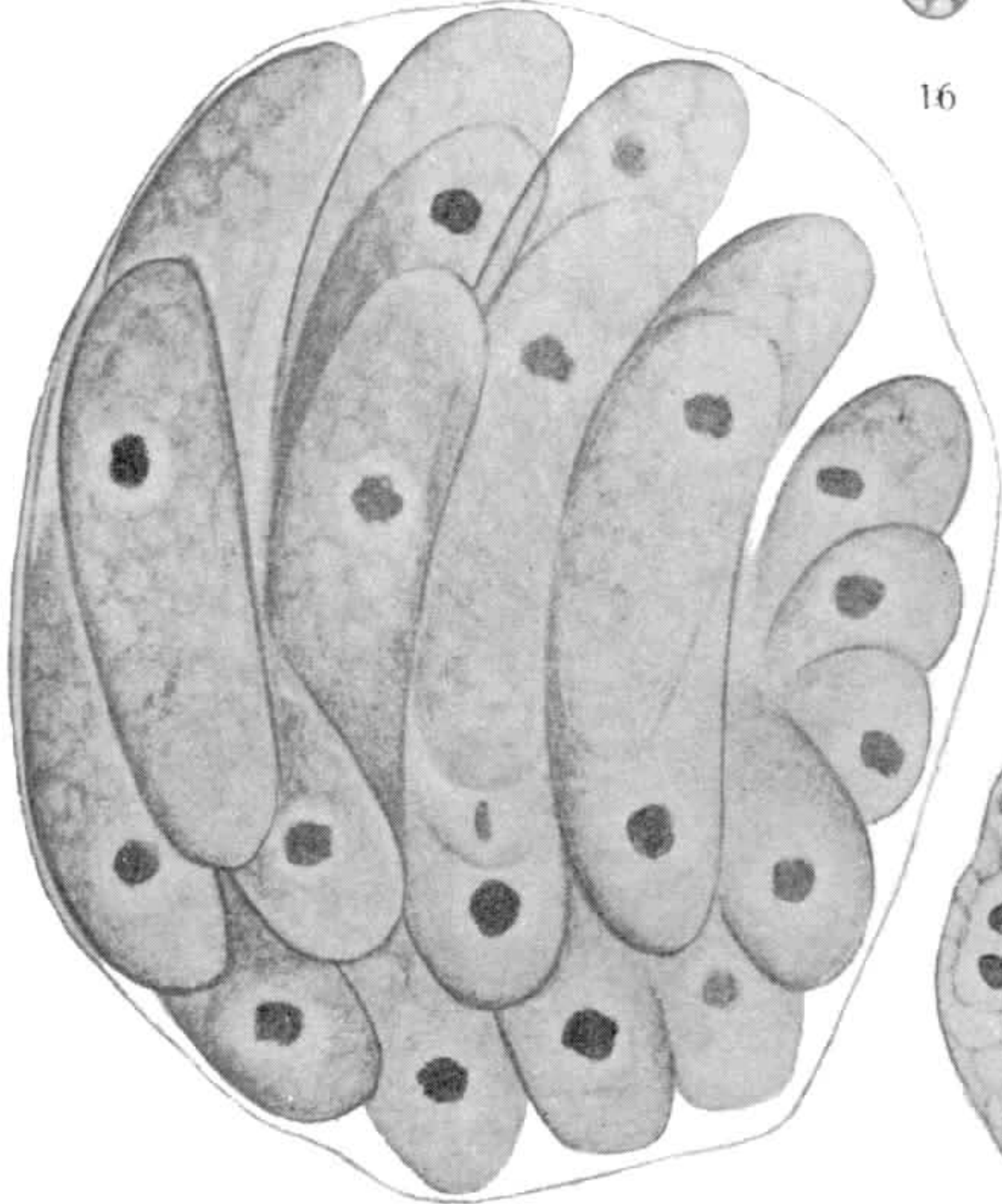
14



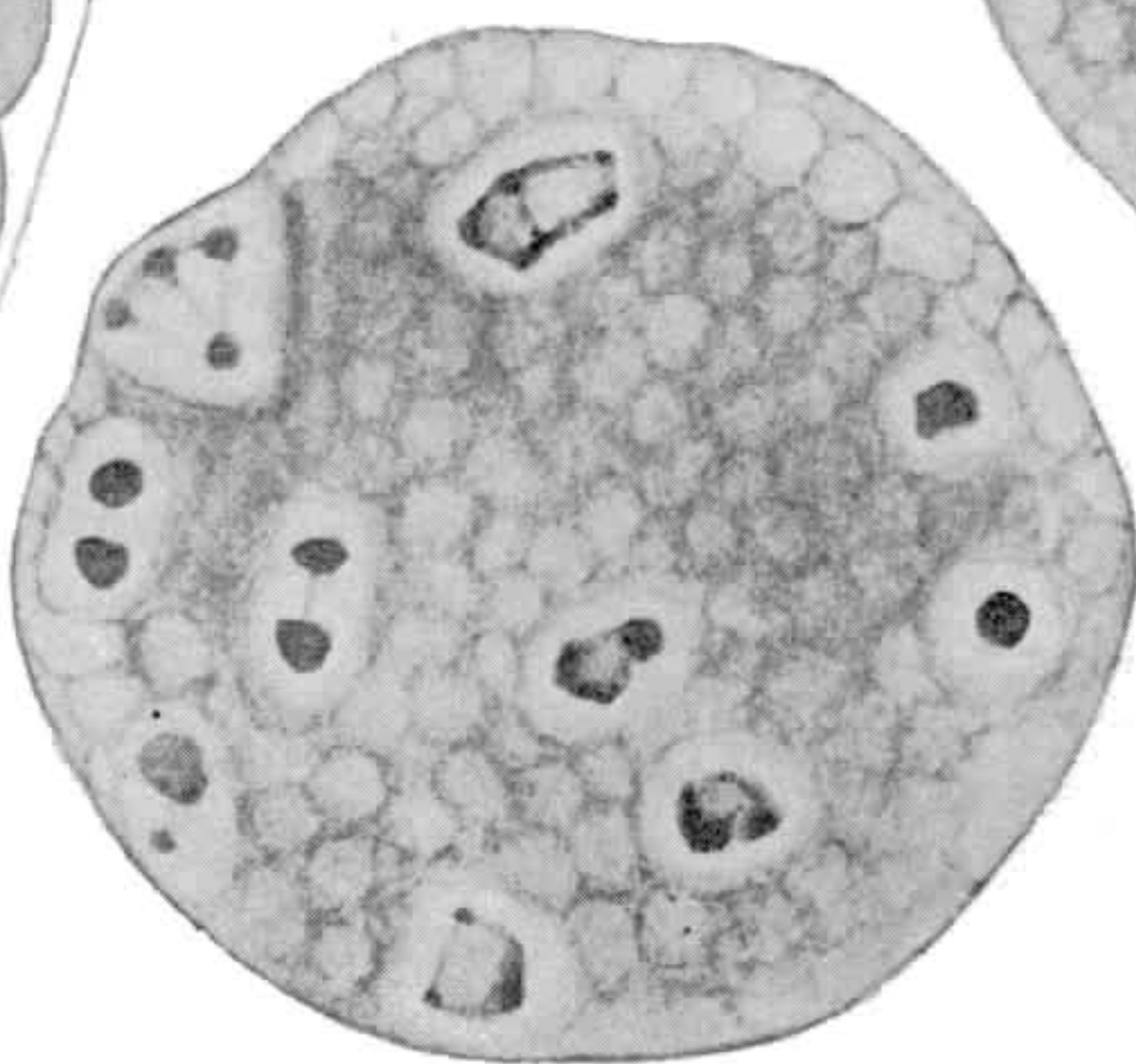
16



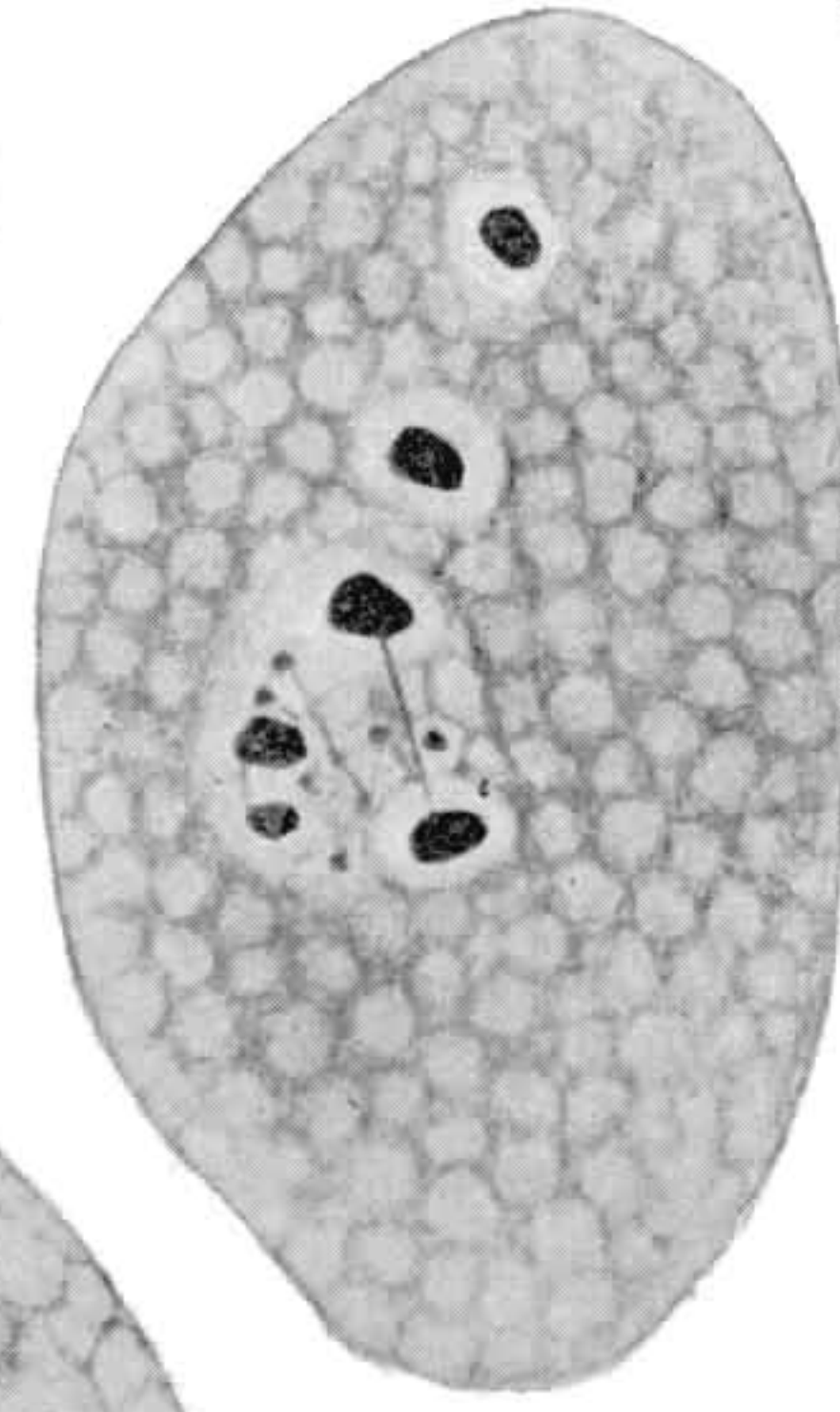
17



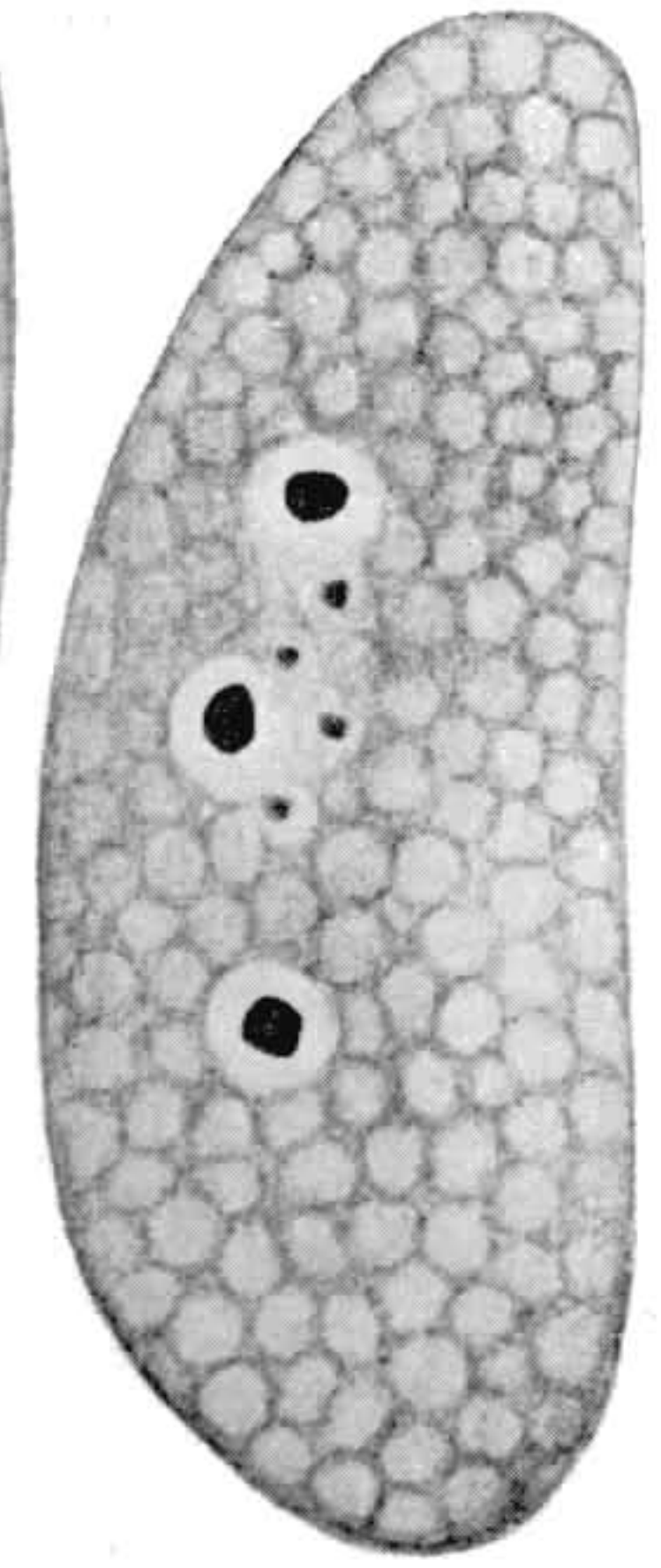
15



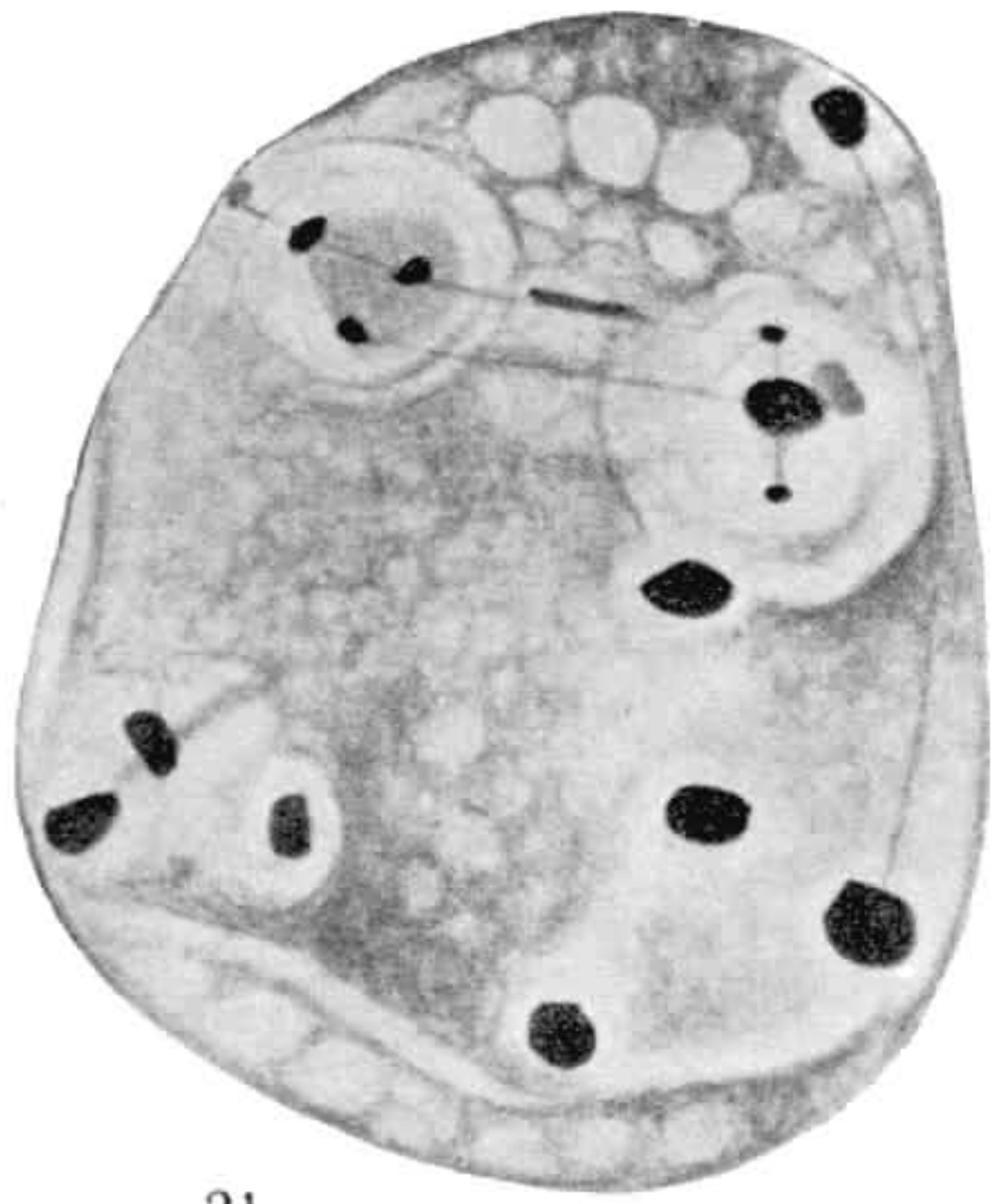
20



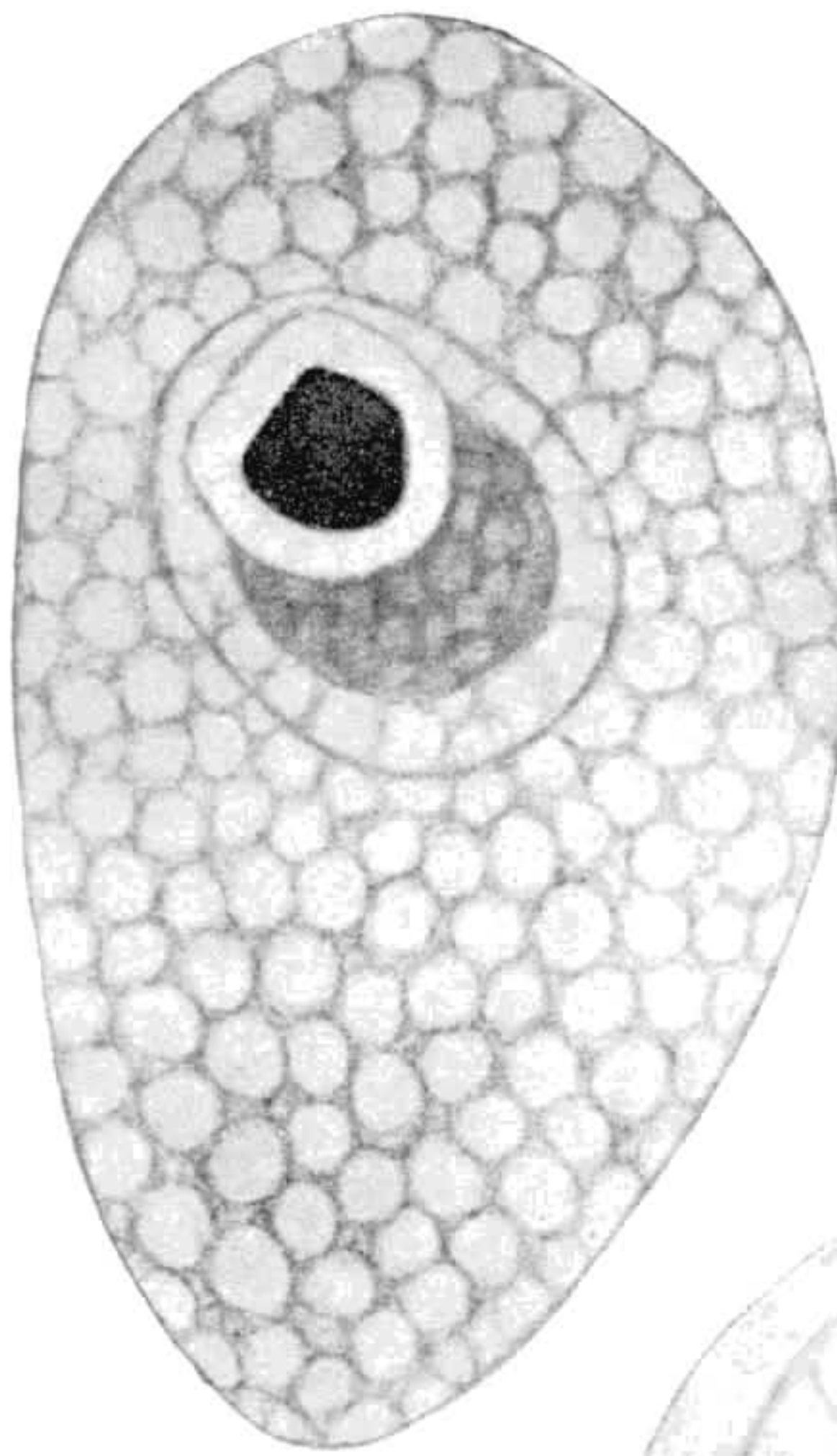
18



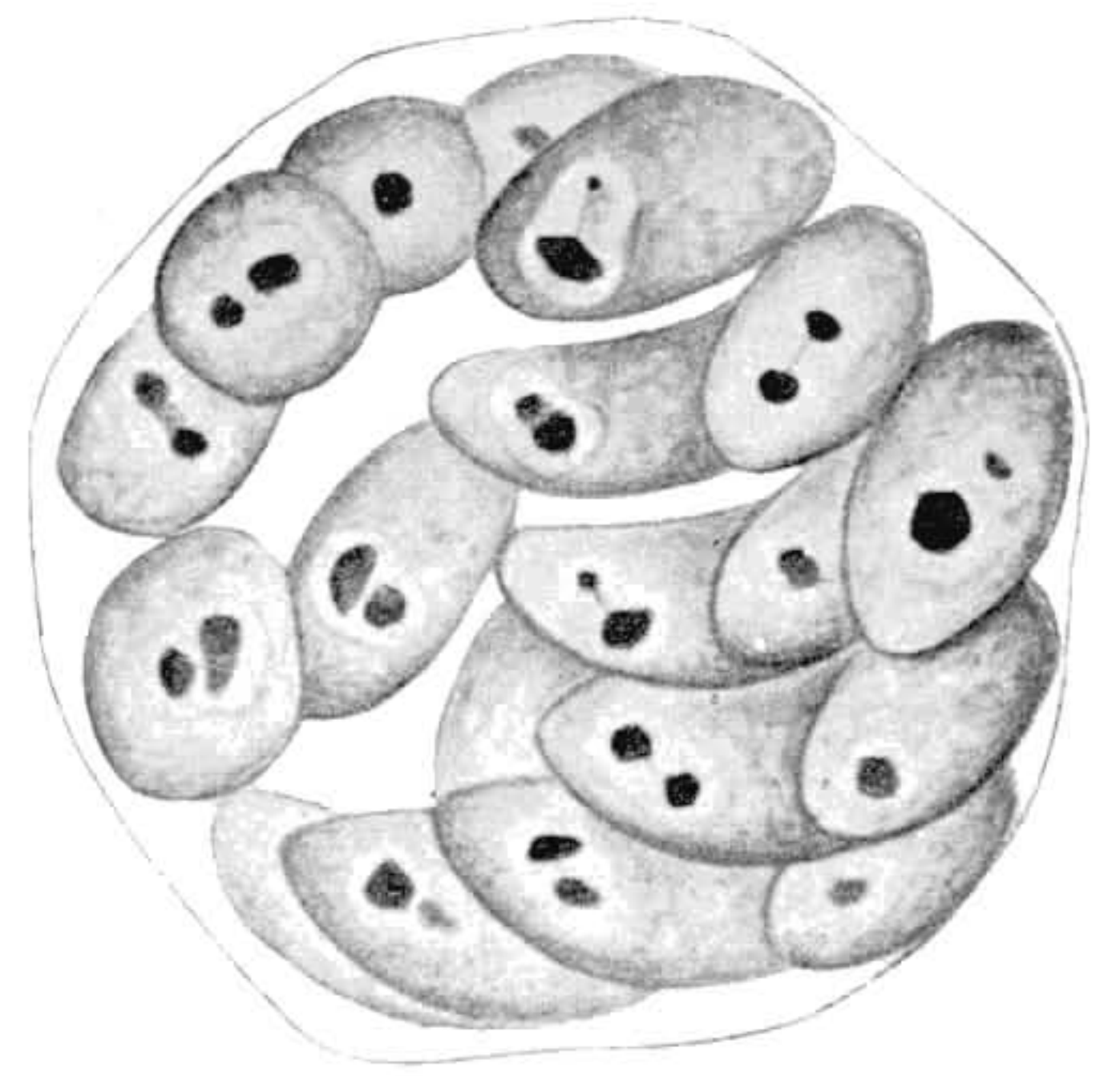
19



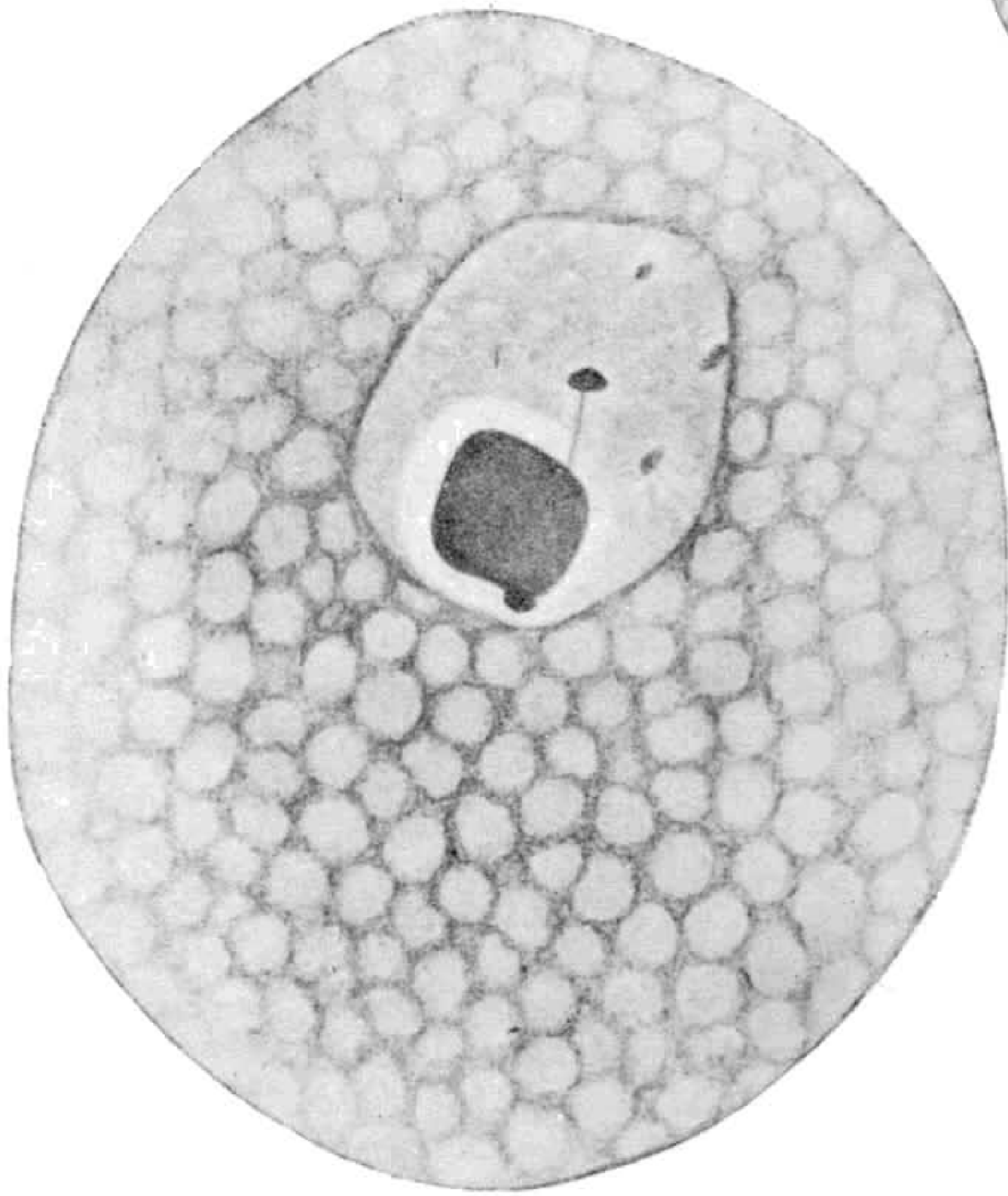
21



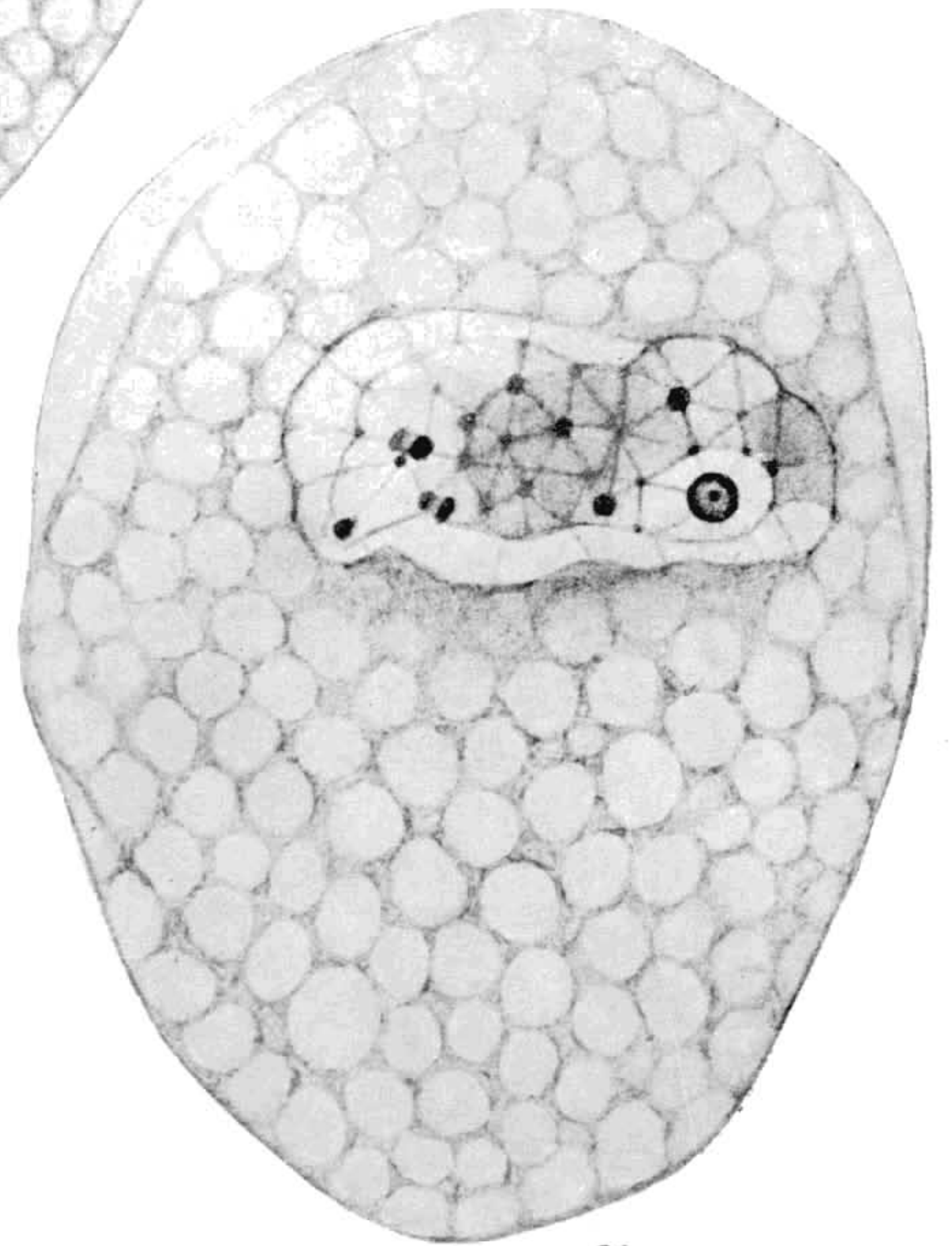
22



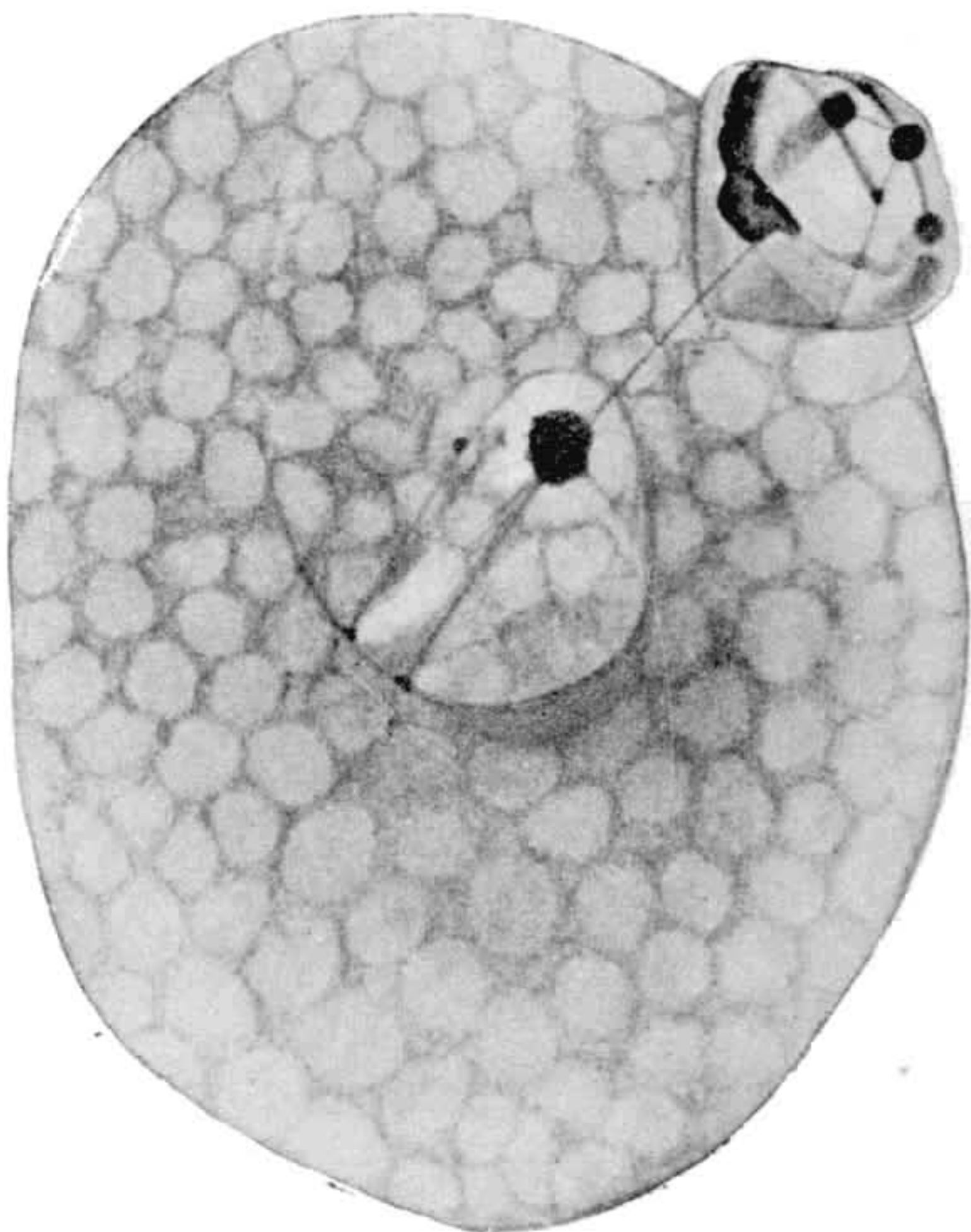
21 a



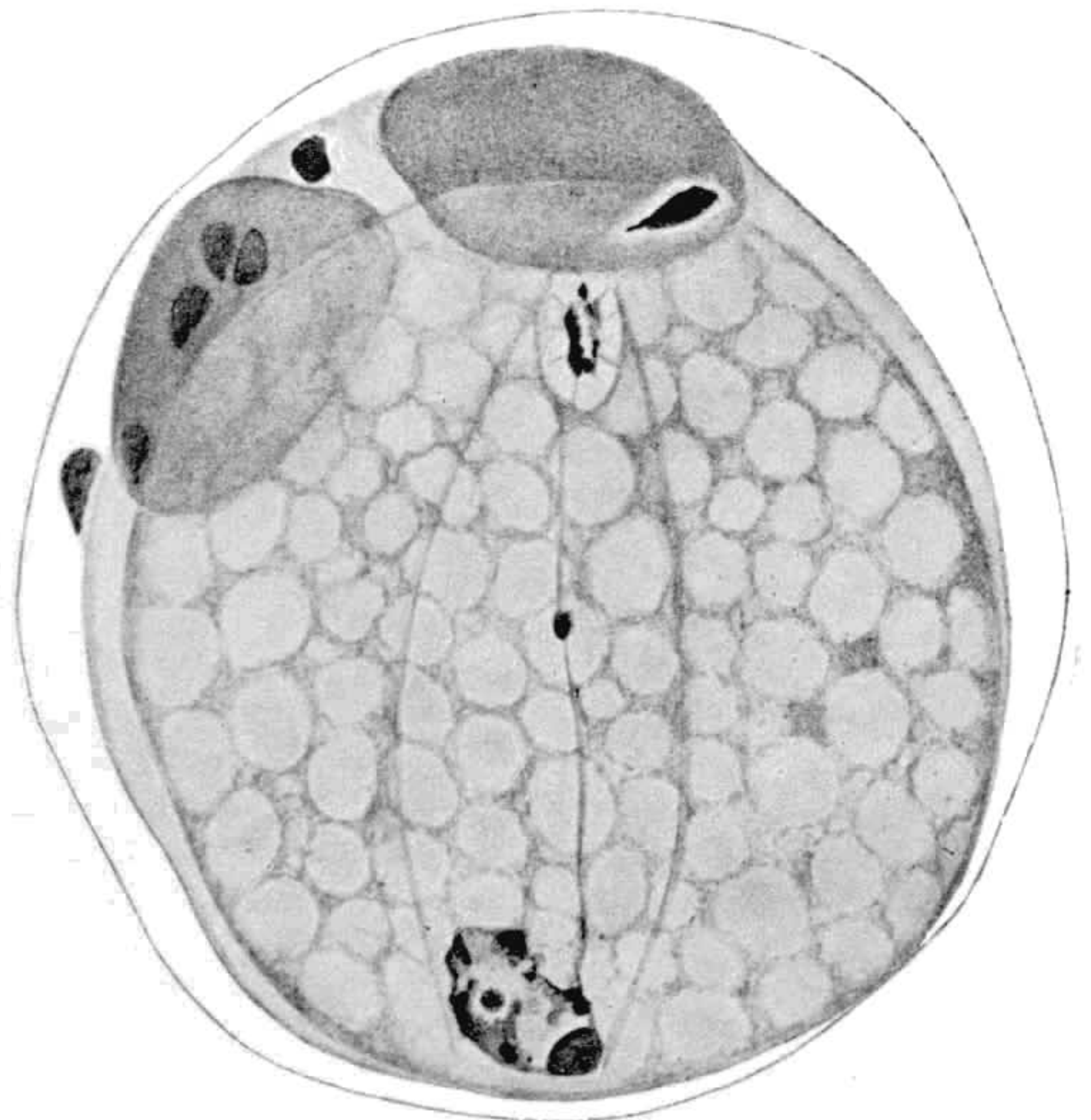
23



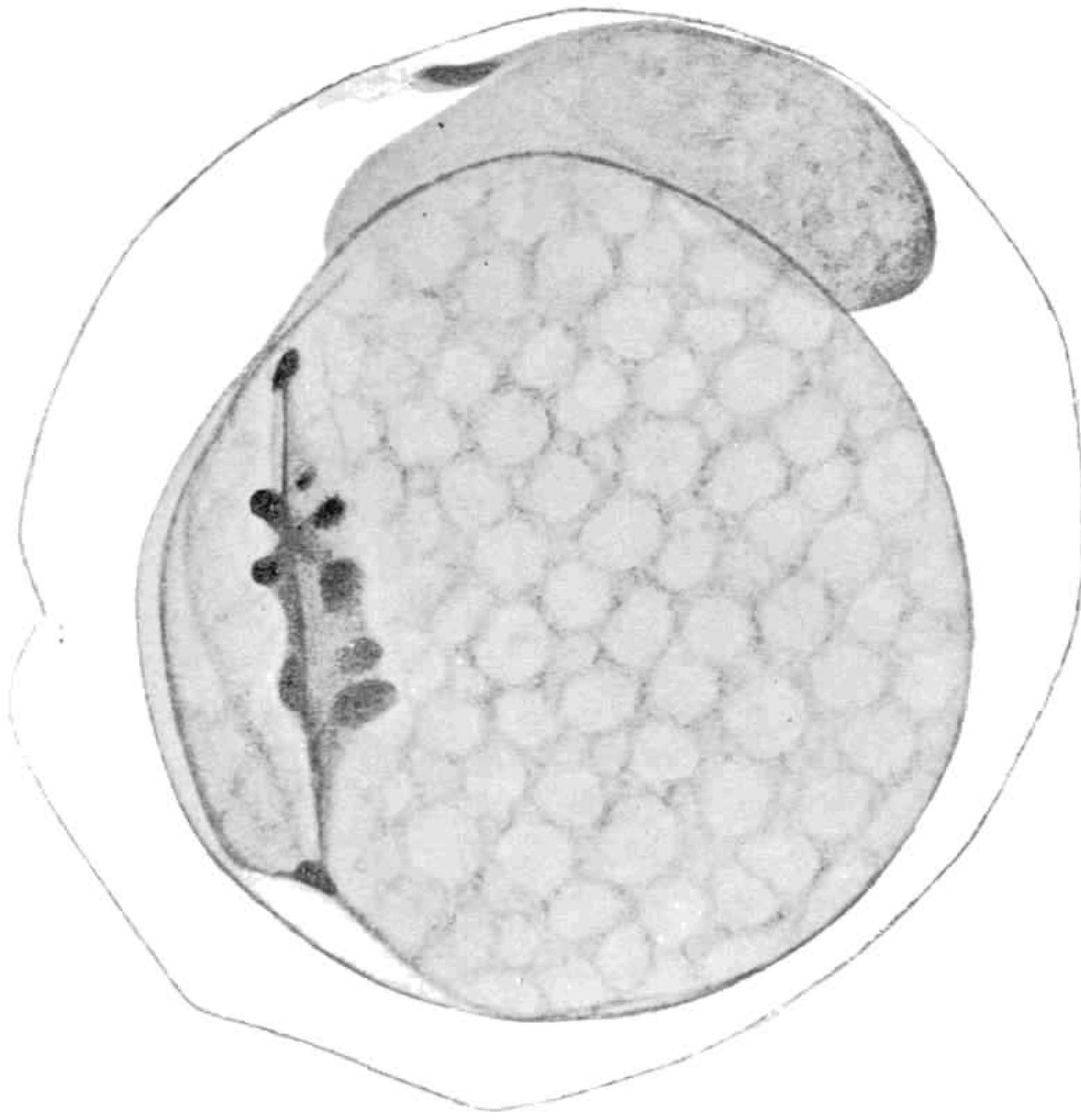
24



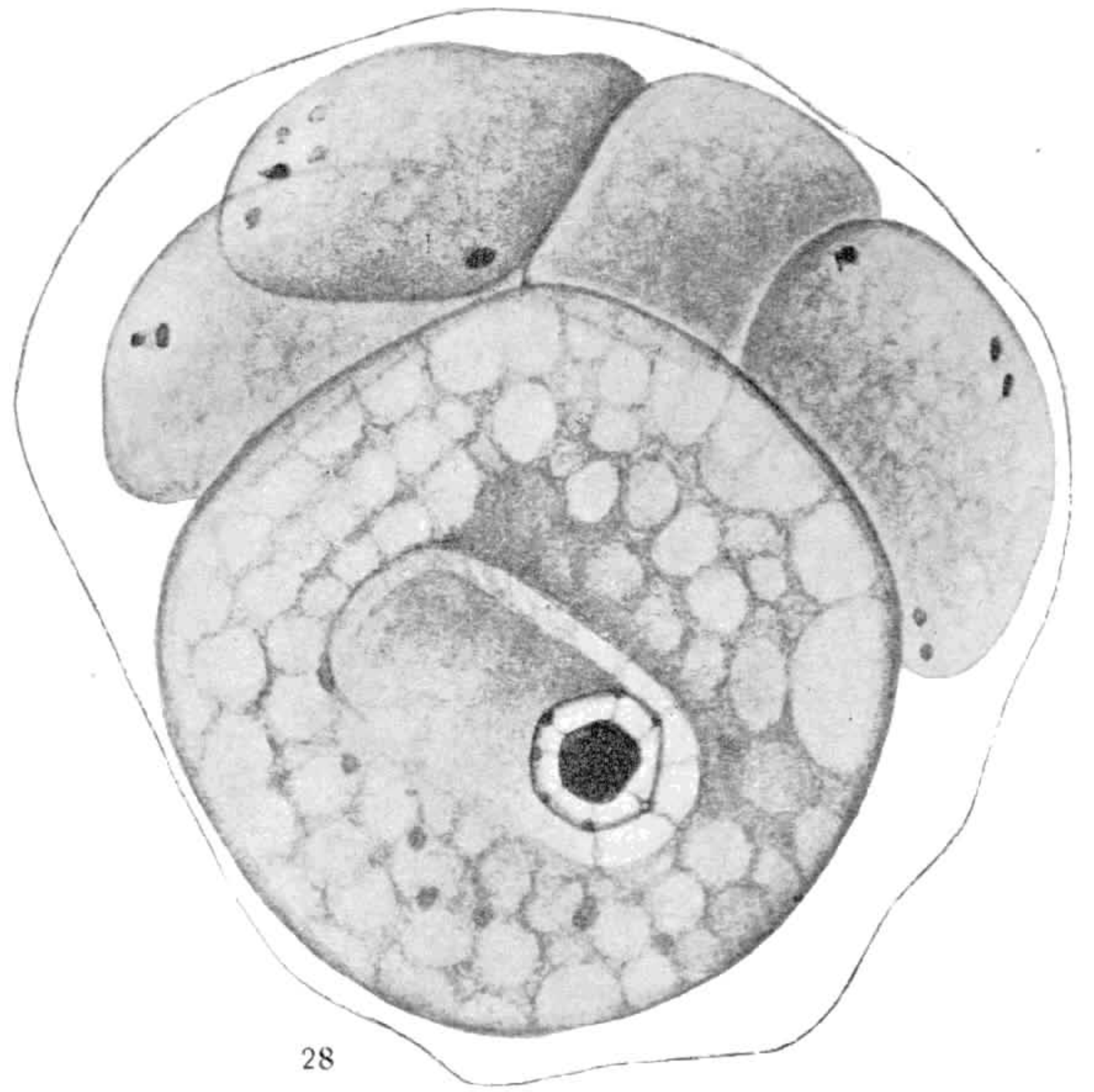
25



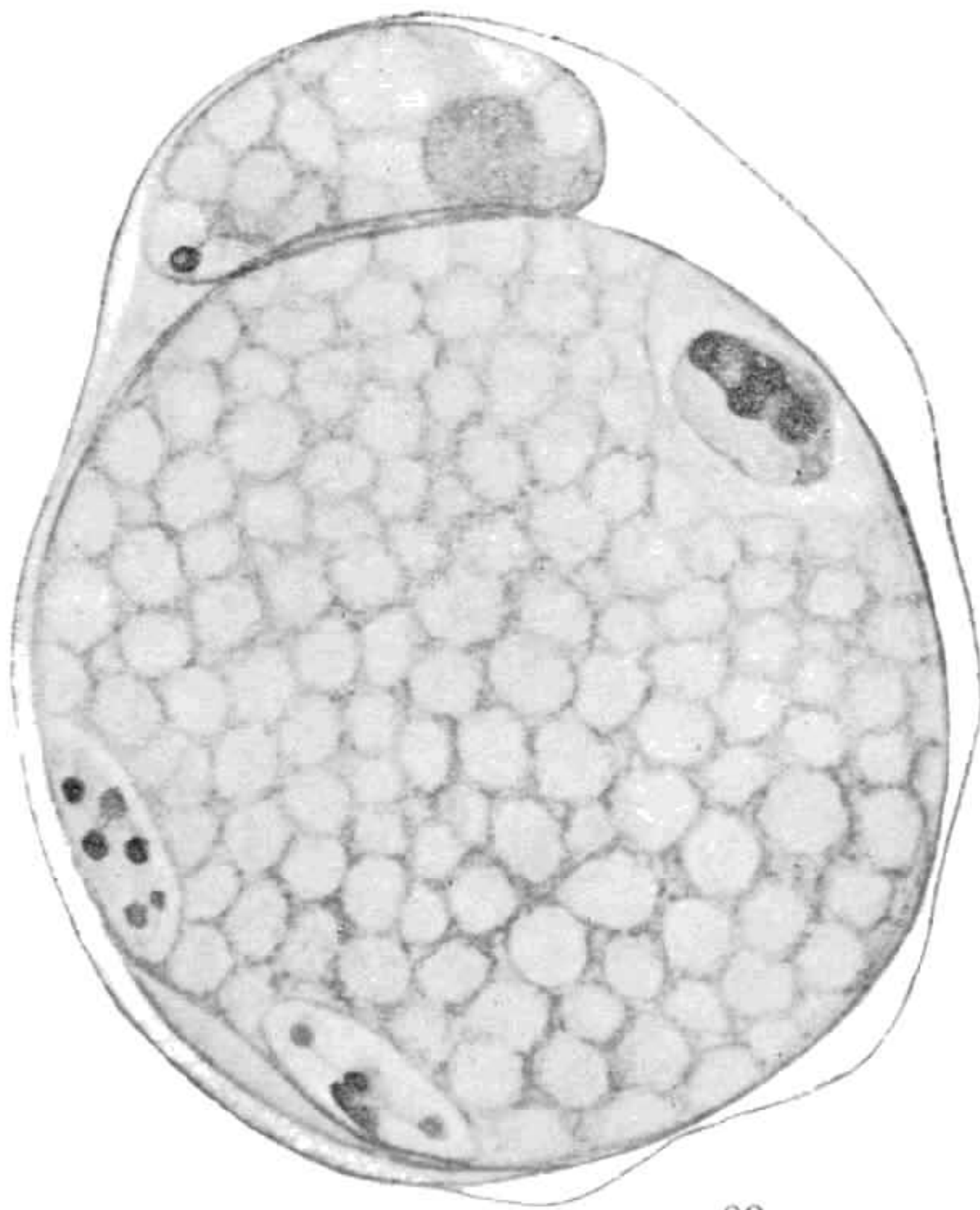
26



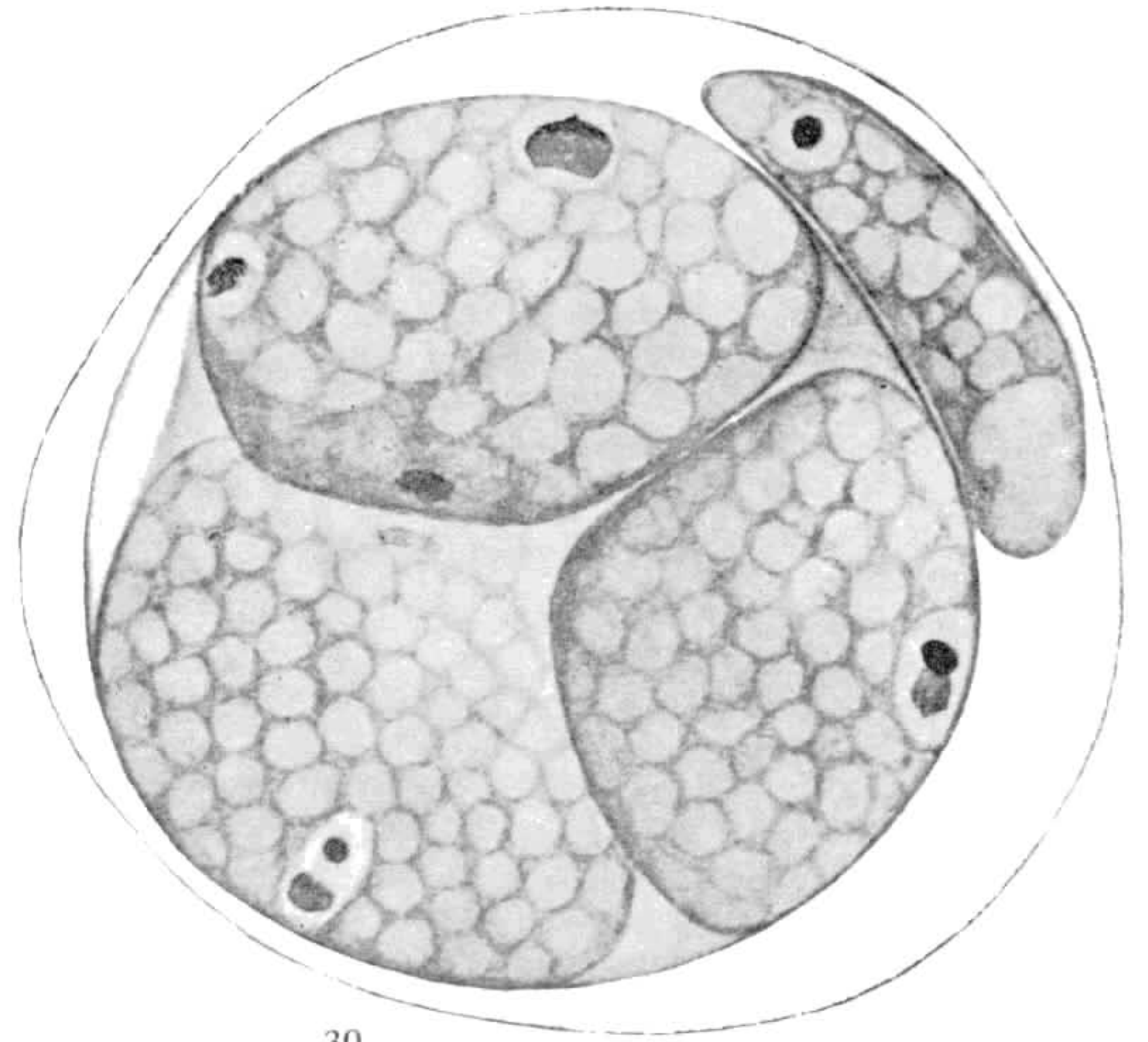
27



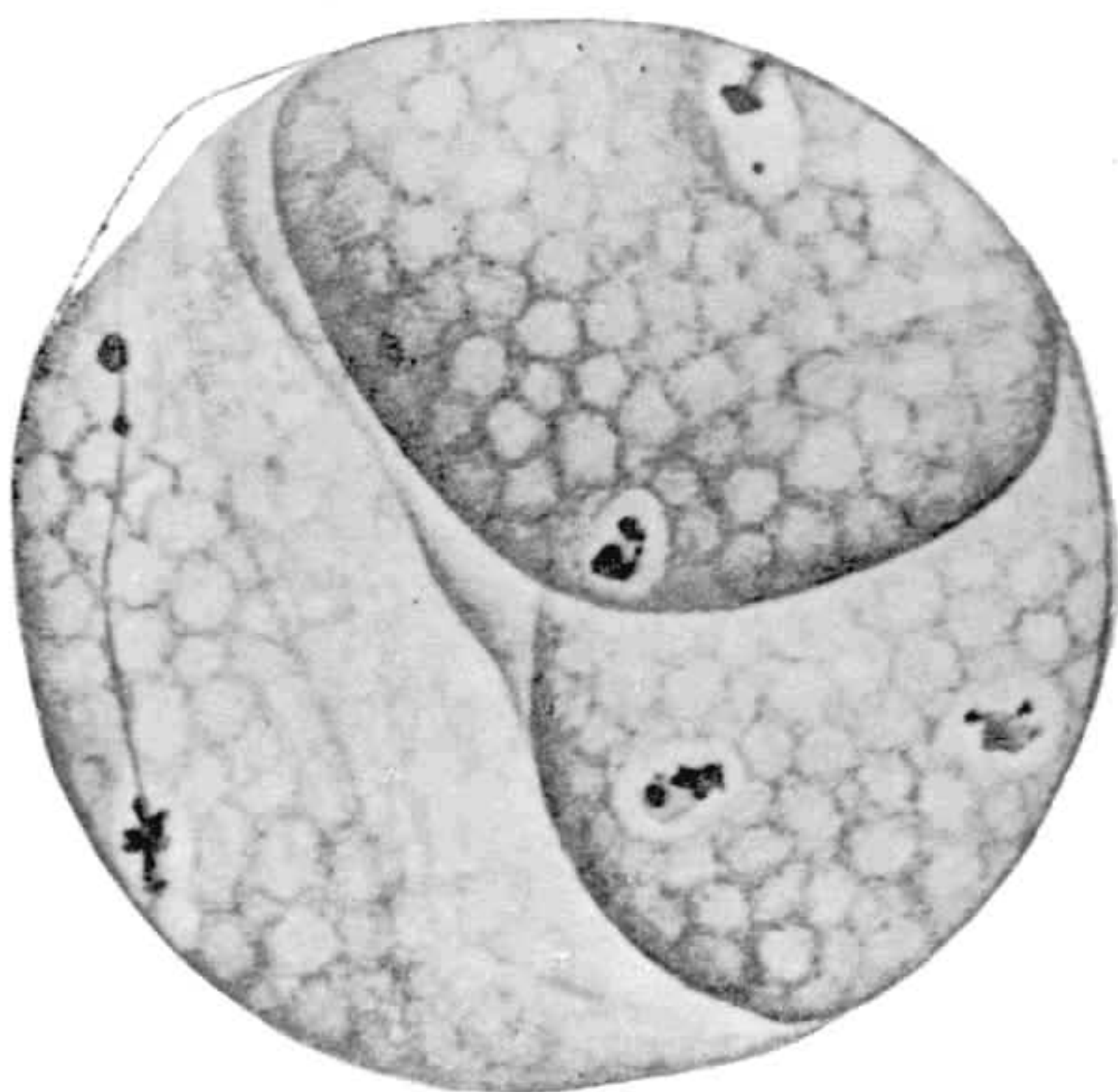
28



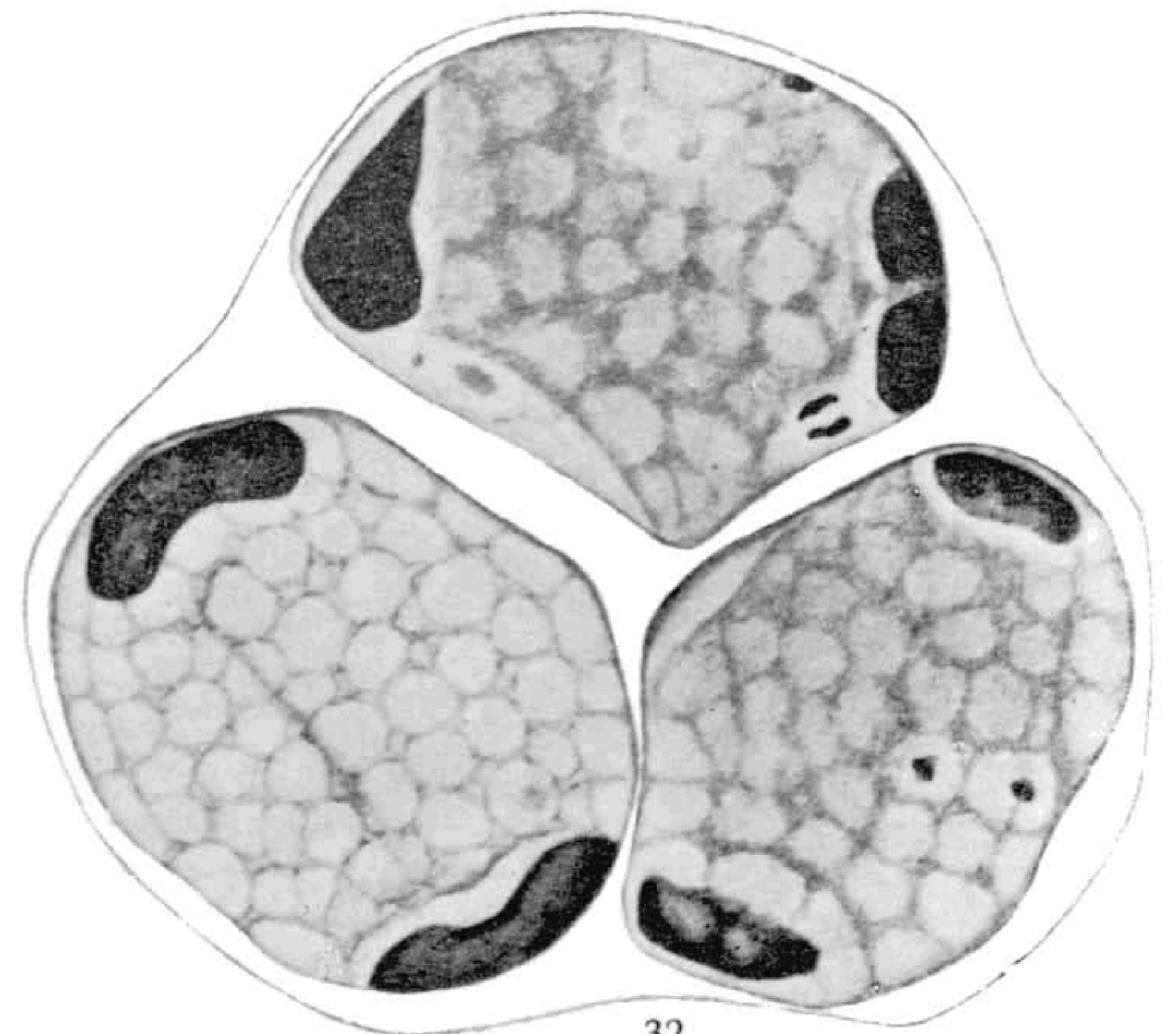
29



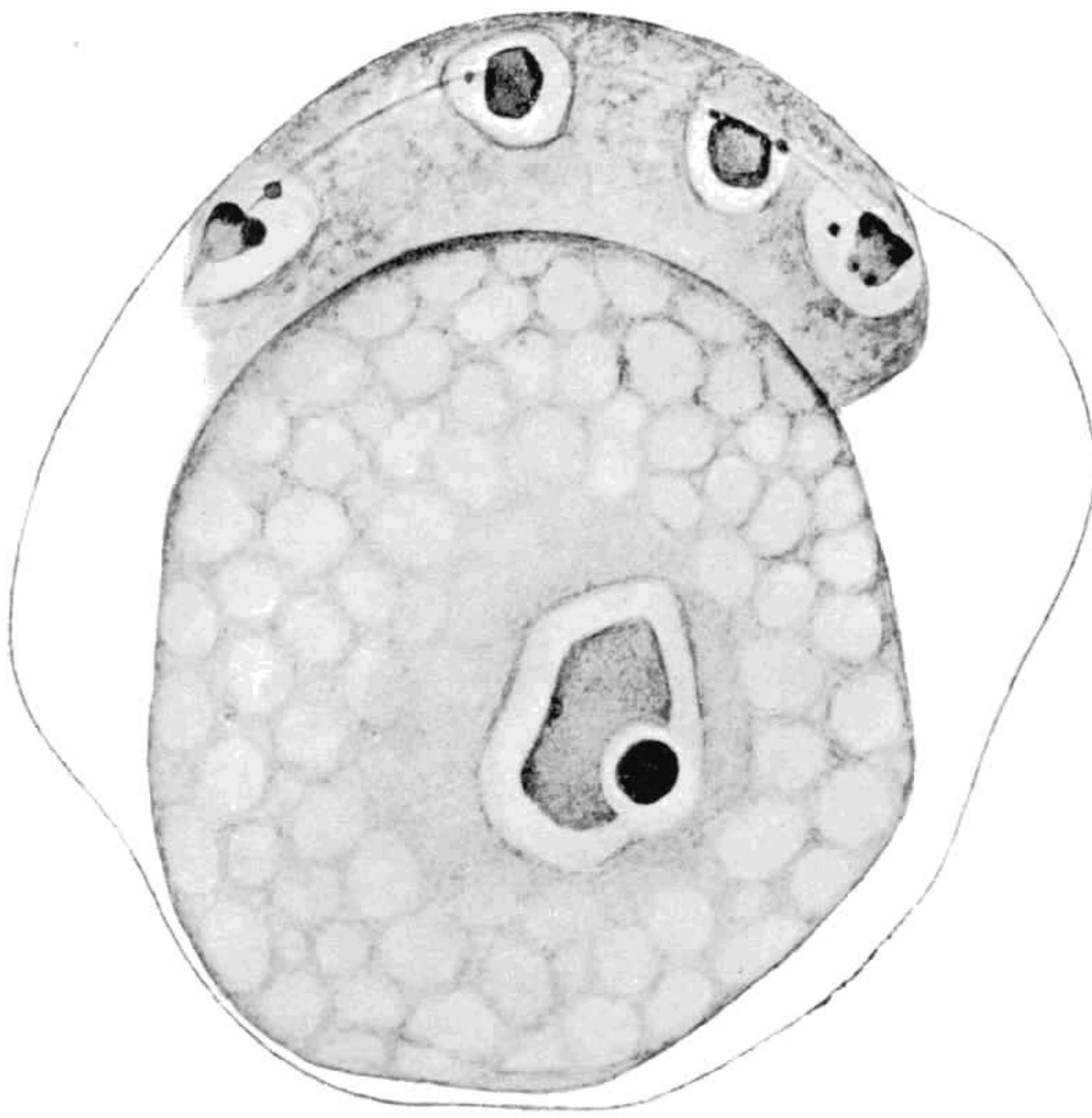
30



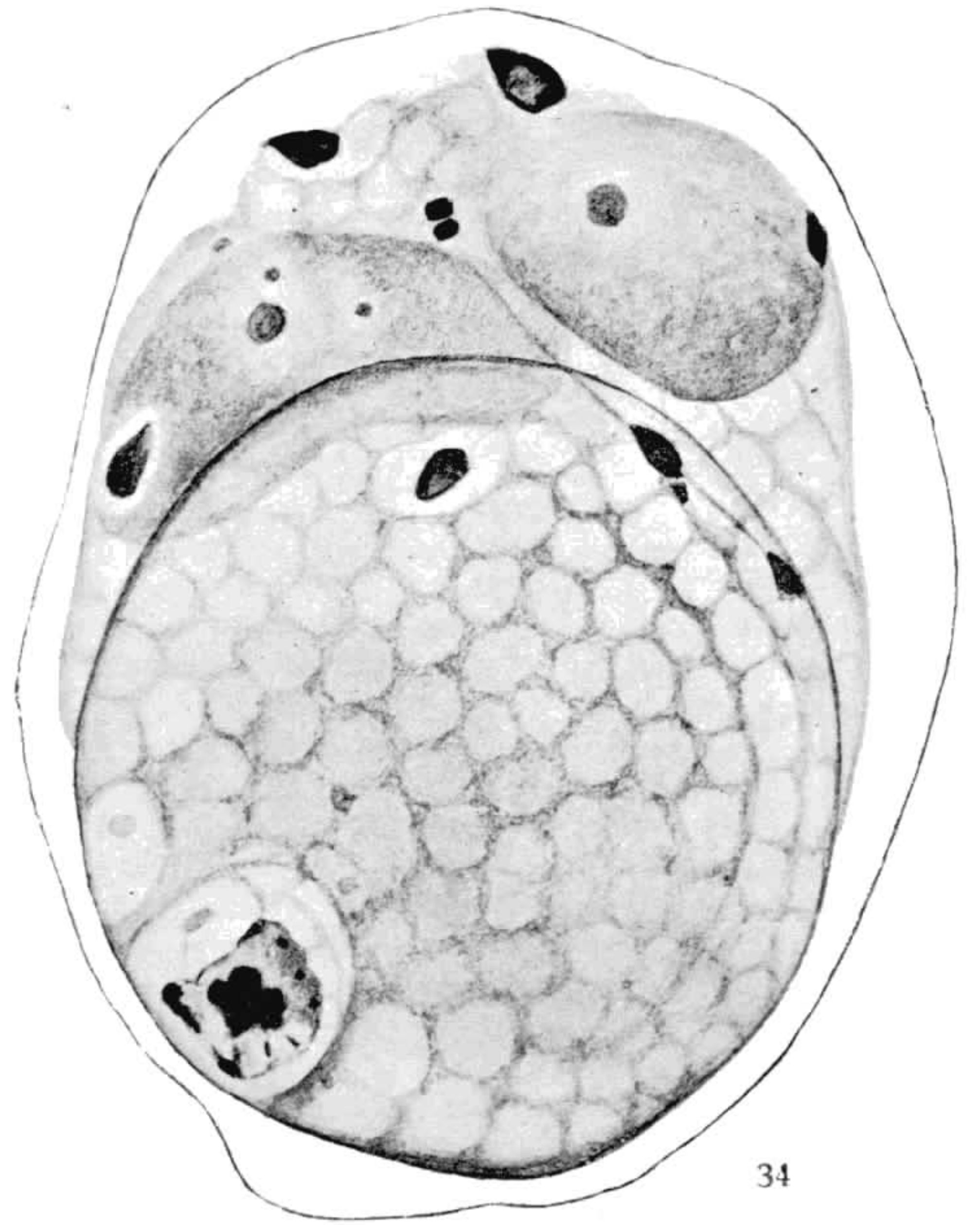
31



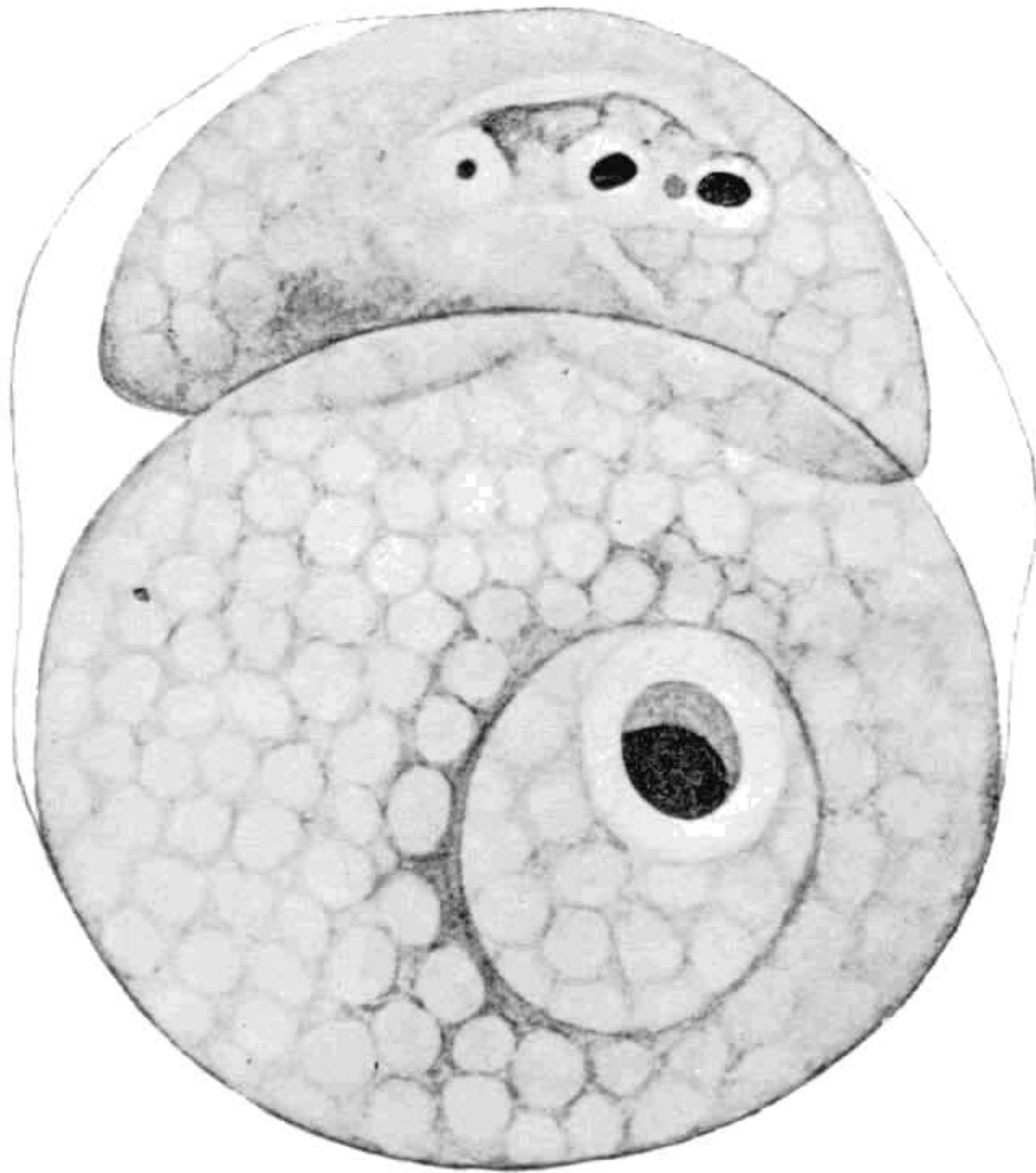
32



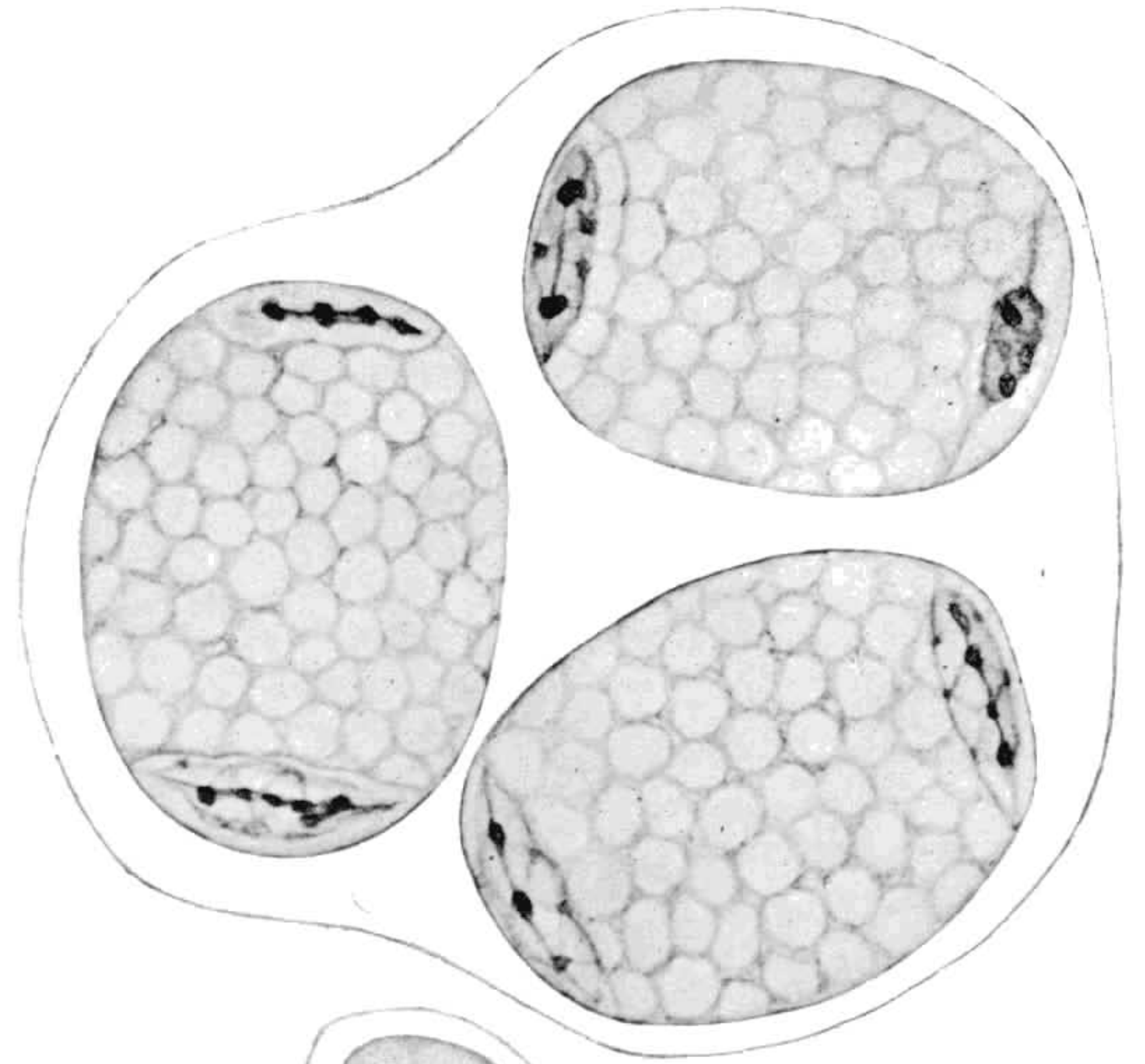
33



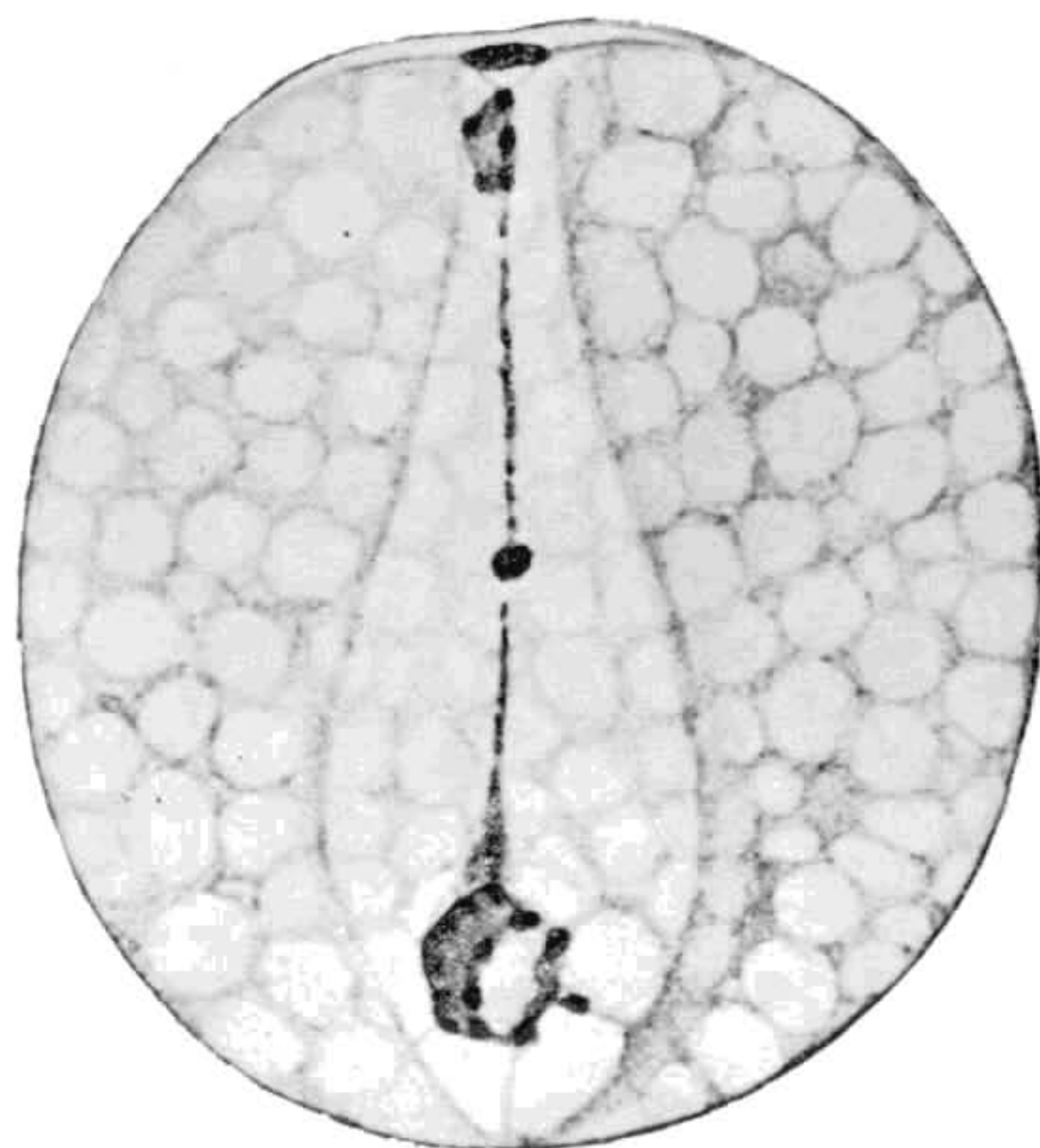
34



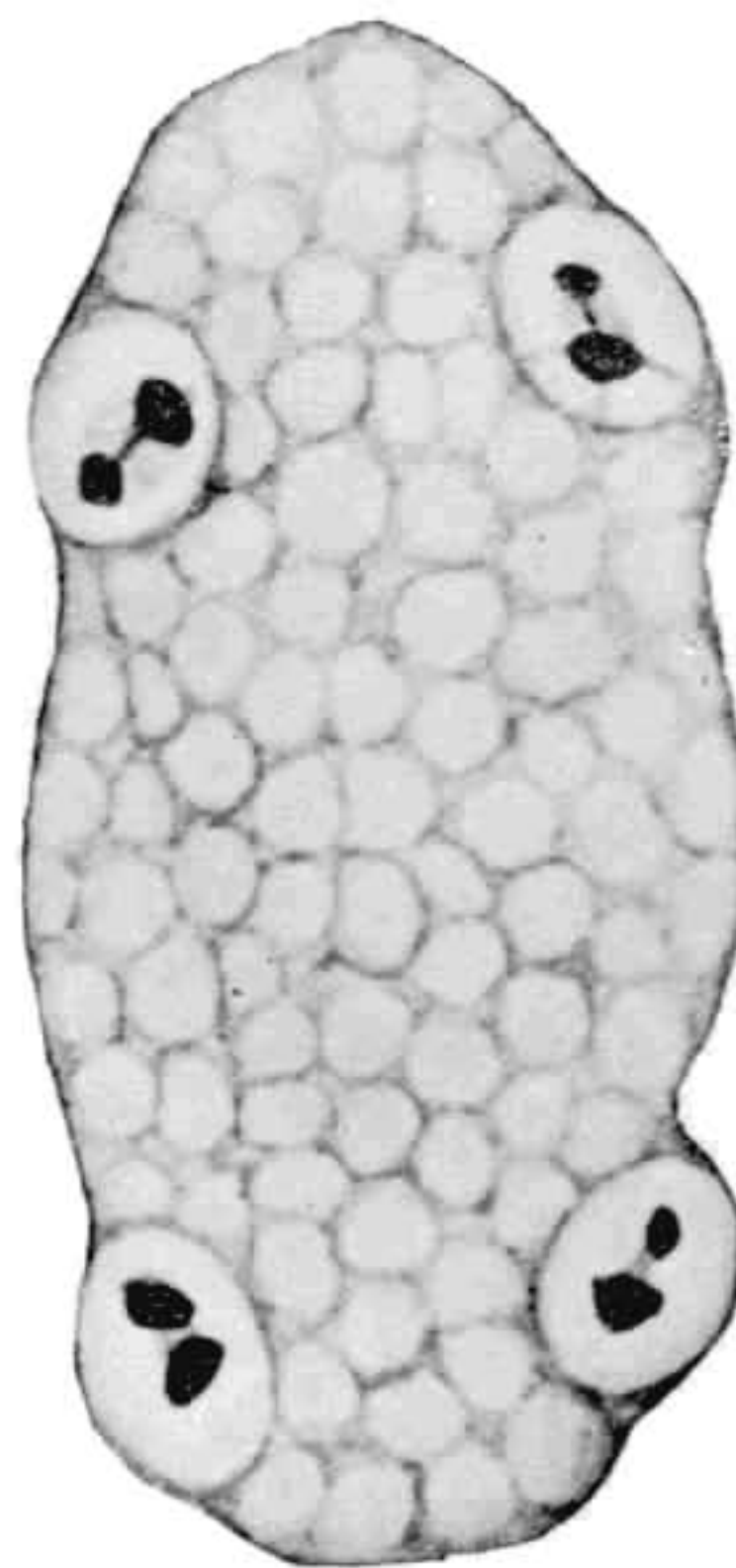
35



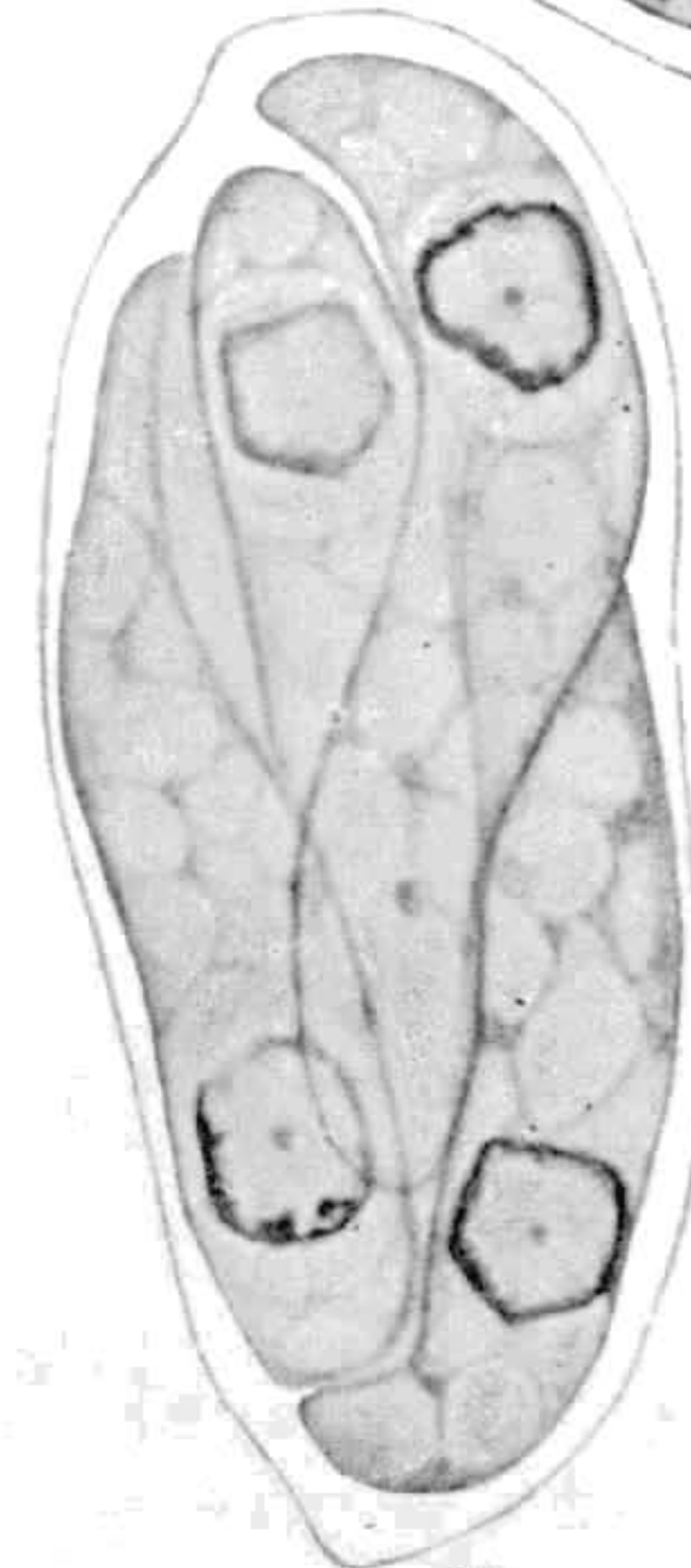
36



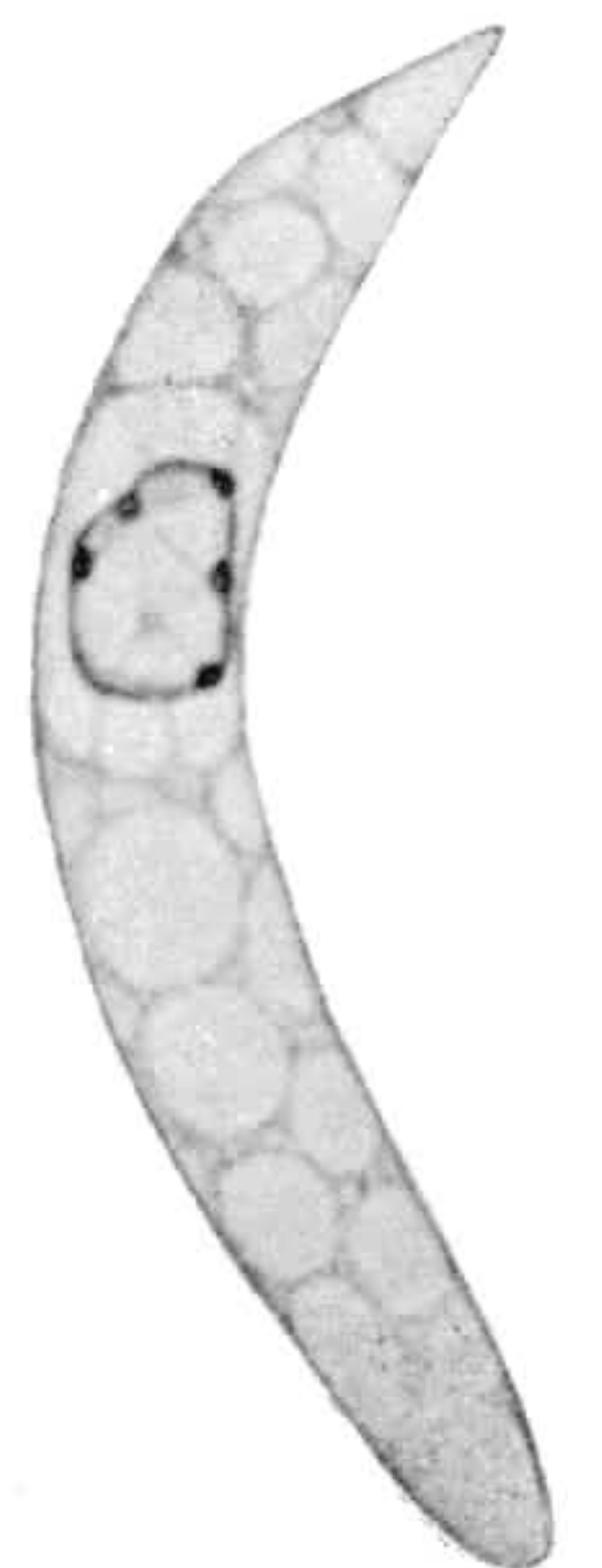
37



38



39



40

Fig. 31.	Divisão do nucleo do esporoblasta.	» 31.	Kernteilung des Sporoblasten.
Fig. 32.	Esporoblastas com duas massas cromaticas nos pólos.	» 32.	Sporoblasten mit zwei Chromatinmassen an den Polen.
Fig. 33.	Microgametócito com quatro nucleos (ou melhor quatro cariozomas).	» 33.	Mikrogametocyt mit vier Kernen (oder besser vier Caryosomen).
Fig. 34.	Fórma dos microgâmetas.	» 34.	Mikrogametenformen.
Fig. 35.	Microgametócito com poliocario.	» 35.	Mikrogametocyt mit Polycaryon.
Fig. 36.	Segunda divisão dos nucleos dos esporoblastas.	» 36.	Zweite Teilung der Sporoblastenkerne.
Fig. 37.	Fuzo de copulação do nucleo de macrogâmeta livre.	» 37.	Kopulationsspindel des Kernes des freien Makrogameten.
Fig. 38.	Esporoblastas escapados do cisto, cada um delles com quatro nucleos.	» 38.	Aus der Cyste ausgetretene Sporoblasten, jeder derselben mit vier Kernen.
Fig. 39.	Esporio com quatro esporozoitas.	» 39.	Spore mit vier Sporozoiten.
Fig. 40.	Esporozoita livre.	» 40.	Freier Sporozoit.

BIBLIOGRAFIA.

- DOBELL, C. C. — Observations on the life and history of *Adelea ovata* — with a note on a new Gregarine f. the gut of *Lithobius forficatus*.
Proceed. Royal Soc. B. Vol. 79.
- JOLLOS, V. 1909 Multiple Teilung und Reduktion bei *Adelea ovata*.
Arch. f. Prot. Bd. XV.
- LÉGER, L. 1898 Sur la morphologie et le développement des microgamètes des coccidies.
Arch. de Zool. exp. et gén. Notes et Revue. Vol. 6.
- LÉGER, L. 1904 Sporozoaires parasites de l'*Embia soliezi*, RAMBUR.
Arch. f. Protistenkunde. Vol. 3.
- MINCHIN, E. A. 1903 Sporozoa.
In Lankester's Treatise on Zoology.
- MOROFF, TH. 1907 Untersuchungen über Coccidien. *Adelea zonula* nov. sp.
Arch. f. Protistenkunde. Bd. 8.
- NAEGLER, K. 1909 Entwicklungsgeschichtliche Studien über Amöben.
Arch. f. Protistenkunde. Bd. 15.
- PÉREZ, C. 1903 Le cycle évolutif de l'*Adelea mesnili*, coccidie coelomique, parasite d'un lepidoptère.
Arch. f. Protistenkunde. Vol. 2.
- SCHAUDINN, F. 1900 Untersuchungen über den Generationswechsel bei Coccidien.
Zool. Jahrb. Abth. f. Anat. Vol. 13.
- SIEDLECKI, M. 1898 Étude cytologique et cycle évolutif de la coccidie de la Seiche.
Ann. de l'Inst. Pasteur. Vol. 12.
- SIEDLECKI, M. 1899 Étude cytologique et cycle évolutif de *Adelea ovata*, Schneider.
Ann. de l'Inst. Pasteur. Vol. 13.

