

(Aus dem physiologischen Institut der zoologischen Station zu Neapel.)

Zur Physiologie der Befruchtung, Parthenogenese und Entwicklung.

Von

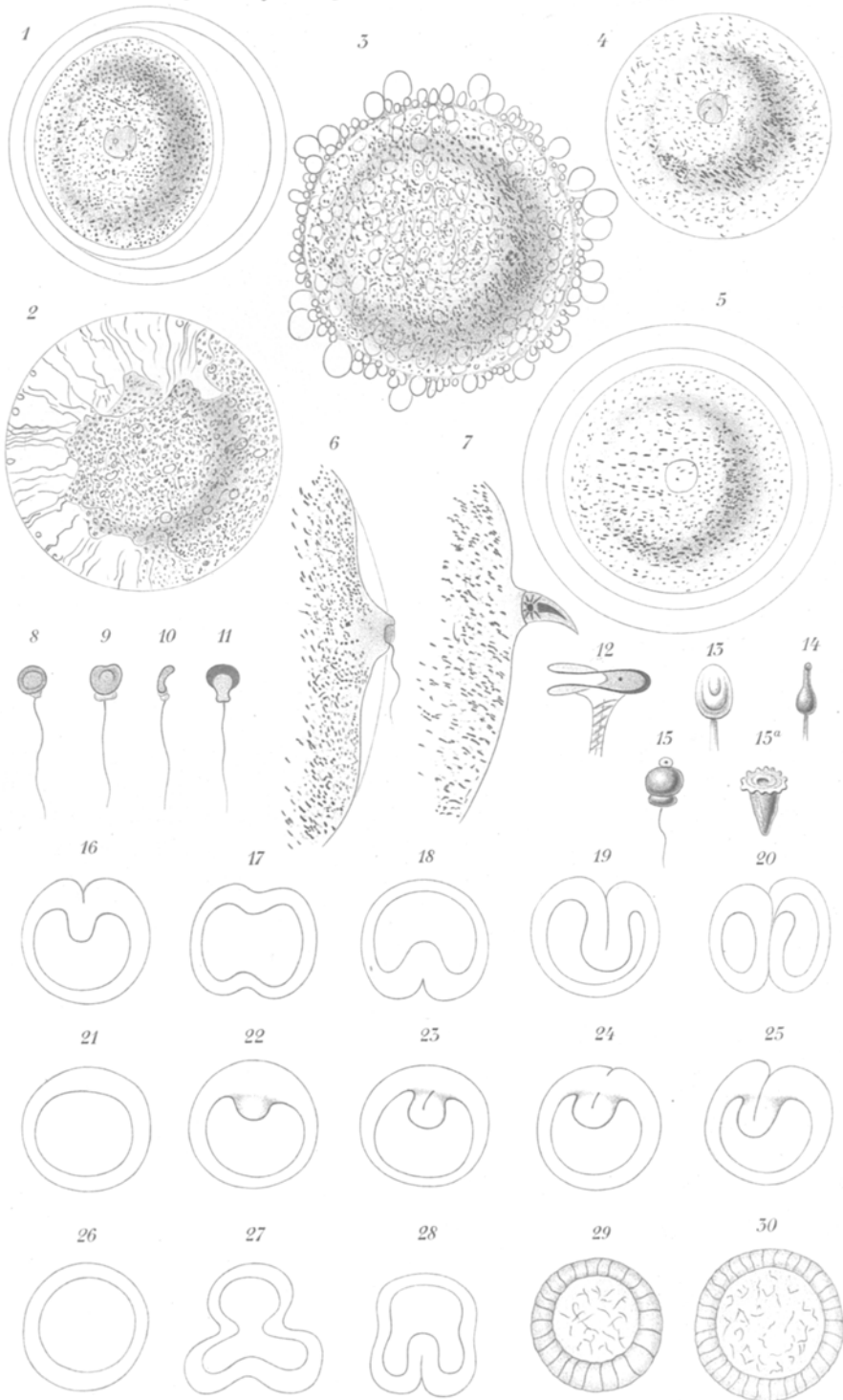
A. Schücking.

(Hierzu Tafel I.)

Die Untersuchungen, auf welche sich die nachstehenden Mittheilungen beziehen, wurden in den Wintern 1901/1902 und 1902/1903 angestellt. Die Arbeiten hatten ihren Ausgang von der Untersuchung der auf die Spermien anziehend wirkenden Substanzen des Eis genommen. Gewisse neue Befunde in dem durch die Ueberschrift bezeichneten Gebiet bestimmten die Ausdehnung der Untersuchungen auf die im Nachstehenden aufgeführten Abschnitte.

Die Eissubstanz. Ihre Reaction und Einwirkung auf die Spermien.

Ich hatte gefunden, dass die Schleimhüllen und auch die mit den Schleimhüllen zerriebenen Eier von *Asterias glacialis*, *Strongylocentrotus lividus* und *Arbacia pustulosa* deutlich saure Reaction zeigten, und dass die zerriebene Eimasse sowohl die Samenfäden der eigenen Art als auch fremder Echinodermen abzutöden vermochte. In der unverdünnten Eissubstanz und in einer Seewassermischung, die noch sauer reagirte, wurden die Spermien sofort bewegungslos. Wenn die Masse der Eissubstanz die des Spermas um das Mehrfache übertraf, so fielen nach Ablauf einer Stunde die Schwanzfäden der Spermien ab, lösten sich auf, und der Kopf quoll auf. Wenn die erwähnte Mischung oder die reine Eissubstanz nur kurze Zeit eingewirkt hatte, so konnte man die gelähmten Spermien durch Zusatz von Seewasser wieder beweglich machen. Steigerung der Alkalescenz des Seewassers durch geringen Zusatz von Na_2CO_3 beschleunigte



diese Wiederherstellung. Wenn einer grösseren Spermienmenge ein geringes Quantum Eisubstanz zugesetzt war, so dass die Samenfäden nur gelähmt wurden, so konnten die Spermien noch nach 12 Stunden durch Zusatz von Seewasser wieder beweglich und befruchtungsfähig gemacht werden, während die in Seewasser gebrachten Spermien je nach der Temperatur nach fünf bis acht Stunden abgestorben waren. Bei diesen Versuchen musste selbstverständlich der deletär wirkende Schleim, namentlich der sehr giftige Hautschleim von *Asterias* und die Perivisceralflüssigkeit der betreffenden Echinodermen von Eiern und Sperma ferngehalten werden. Von *Dungern* hat auf die Wirkungen aufmerksam gemacht, welche noch kleinste Spuren dieser Flüssigkeiten auf die Samenfäden ausüben. Die Samenfäden von *Asterias glacialis* bleiben im unverdünnten Sperma mit wenigen Ausnahmen bewegungslos und können die betreffenden Versuche daher nur bei einiger Verdünnung des Spermas mit Seewasser angestellt werden.

Extracte der Eisubstanz.

Als ich die zerriebenen Eier aller drei Arten 12 Stunden in destillirtes Wasser (1:8) gebracht, die Flüssigkeit eingekocht und durch Filtration von den geronnenen Eiweisskörpern befreit hatte, erhielt ich leicht getrübt saure Lösungen, welche nach Zusatz einer Spur von NaCl unterschiedslos auf die Spermien der genannten Echinodermenarten in folgender Weise einwirkten: In stärkerer Concentration und Menge lähmten sie erst die Spermien und brachten sie nach kurzer Zeit zum Absterben, bei grösserer Verdünnung wirkten sie agglutinirend und erregend und bei noch schwächerer Concentration nur erregend. Ohne NaCl-Zusatz trat keine Agglutination beim Sperma ein.

Durch Dialysirung dieser Flüssigkeit erhielt ich eine nach dem Einkochen auf dem Wasserbade stark sauer reagirende Substanz in klarer Lösung, welche deutlich erregend, aber nicht agglutinirend auf die Spermien einwirkte. Der Rückstand bei der Dialyse war schwach sauer, fast neutral. Dieser Rückstand hatte alle oben erwähnten Eigenschaften der Eisubstanz gegenüber den Spermien, je nach der Concentration stark erregend, agglutinirend und lähmend. Diese rückständige Flüssigkeit zeigte grosse Krystalle, die mit den Formen der bekannten *Böttcher'schen* Spermakrystalle des menschlichen Spermas Aehnlichkeit hatten.

Durch die von Dr. Straub und mir vorgenommene Destillation der in einem geringen Quantum von destillirtem Wasser aufgequollenen Eier wurde eine eigenthümlich riechende flüchtige Substanz in geringen Mengen erhalten, die schwach sauer reagirte.

Der Geruch dieser flüchtigen Säure, der identisch mit dem Geruch zu sein schien, den auch die zerriebene Eissubstanz verbreitete, war bei jedem Echinoderm verschieden. Auf die Spermien wirkte die flüchtige Säure erregend, aber nicht agglutinirend oder lähmend ein.

Die gewonnenen Resultate rechtfertigen das eingeschlagene Verfahren, die gesammte Eissubstanz nebst Schleimhüllen zu untersuchen und das Resultat den Untersuchungen über die bei Einleitung der Befruchtung wirksamen chemischen Factoren zu Grunde zu legen. Die Randzone des Eies kam in ihren Wirkungen für die Aufklärung der betreffenden Phänomene ebenso in Betracht wie die Schleimhülle des Eies, und war es überhaupt nicht möglich letztere anders als auf ihre Reaction gesondert zu untersuchen.

Die von Prof. Karl Arnold, Hannover, vorgenommene Untersuchung der dialysirten Flüssigkeit ergab einen durch die dreifache Menge absoluten Alkohol fällbaren weisslichen Niederschlag. Dieser durch Filtration abgeschiedene Niederschlag war bis auf einen geringen aus Calciumphosphat bestehenden Rückstand in Wasser löslich und ergab neutrale Reaction. Neben Spuren von Kaliumsalzen enthielt er die Natriumsalze folgender anorganischen Säuren: Phosphorsäure und Schwefelsäure in grösserer Menge, Salzsäure in geringerer Menge.

Nach dem Verdunsten des Alkohols und eines Theils des Wassers besass der durch Alkohol nicht gefällte Theil der Flüssigkeit eine stark saure Reaction und enthielt viel primäres Kaliumphosphat neben primärem Natriumphosphat, ausserdem erhebliche Mengen Kaliumsulfat neben Natriumsulfat.

Die in der dialysirten Gesamtmflüssigkeit enthaltene grössere Menge von primärem Kalium und Natriumphosphat bedingte die saure Reaction der Flüssigkeit. Ausserdem wurde also Kalium und Natriumsulfat, Spuren von Natriumchlorid und Calciumsulfat oder Phosphat in der Flüssigkeit nachgewiesen. Eine organische Säure war nicht nachweisbar, denn der Aether, welcher mit einem Theil der stark sauren Flüssigkeit geschüttelt wurde, behielt seine neutrale Reaction.

Die bei der Dialyse zurückgebliebene Flüssigkeit wurde ab-

gedampft und die darin enthaltene organische Substanz bestimmt. Dieselbe betrug 2 % des Rückstandes. Im Uebrigen bestand die Flüssigkeit aus denselben Stoffen, wie sie in der dialysirten Flüssigkeit nachgewiesen waren. Es ist oben erwähnt, dass die im Rückstand des Dialysats beobachteten Krystalle den Böttcher'schen Spermakrystallen sehr ähnlich sahen. Es sind sehr grosse convexflächige Prismen und Spindeln im monoklinen System. Bekanntlich sind bei den Böttcher'schen Krystallen der Prostata die organischen Basen der phosphorsauren Salze zugleich Träger des Spermageruchs. Auch hier handelt es sich zweifellos um phosphorsaure Salze, und konnte ich die Zahl der Krystalle vermehren, wenn ich dem Dialysatrückstand Ammoniumphosphat zusetzte. Der durch Destillation gewonnene flüchtige Bestandtheil der Lösung konnte wegen des geringen vorhandenen Quantums noch nicht näher bestimmt werden.

Versuche mit den erhaltenen Lösungen.

Wenn man einem Tropfen des Rückstandes des Dialysats fünf Tropfen Seewasser zusetzte und in diese Mischung einen Tropfen Spermaflüssigkeit brachte, so erhielt man dieselben Bilder wie bei der Befruchtung der betreffenden Echinodermen-Eier. Bei künstlicher Befruchtung der Echinodermen-Eier sahen wir bei Zusatz grösserer Spermamengen die Eier von einem dichten schwärzlichen Ring bewegungslos erscheinender Spermien umgeben. Diesen folgte ein dichter Kranz meist mit den Köpfen agglutinirter Spermien, die das Ei durch die schraubenförmige Bewegung ihrer Schwanzfäden in Rotation versetzten. Weiter auswärts folgte ein Gewimmel von stark erregten Spermien, die ausser schraubenförmigen auch Stoss- und Drehbewegungen ausführten. Wir sehen also bei der Befruchtung die Reihenfolge der Lähmung, der Agglutination, der Erregung und der Anlockung. Auch hier ballten sich die Spermien bei Zusatz eines Tropfens vom Rückstand des Dialysats in einzelnen kleinen Haufen zusammen, die ringsum von einem dichten Kranz in stärkster Erregung befindlicher Spermien umgeben waren. Dieser Zustand hielt eine gewisse Zeit an, nach welcher die agglutinirten Samenfäden sich von einander lösten. Zwei Tropfen des nicht dialysirten sauren Extracts oder ein bis zwei Tropfen des Rückstandes vom Dialysat, mit einem Tropfen 3 %iger Na_2CO_3 -Lösung und fünf Tropfen destillirten Wassers agglutinirten das Sperma noch, obgleich

sie neutrale Reaction zeigten. Ein Tropfen, der 0,0005 vom Dialysat-Rückstand enthielt, zeigte noch agglutinirende Wirkung auf das Sperma von Arbacia. Bei der reinen Eisubstanz von Asterias beobachtete ich, dass Zusatz von Na_2CO_3 die tödtliche Wirkung abschwächte.

Capillarröhrchen wurden mit dem Rückstand gefüllt und in Seewasser, das reichlich Sperma derselben Art enthielt, gelegt. Wenn die Lösung in den Capillarröhrchen unverdünnt war, so erhielt man beim Uebergang zum Seewasser eine weissliche Zone, die von innen nach aussen zuerst eine Schicht gelähmter, dann eine Schicht agglutirter, noch beweglicher Samenfäden und dann eine Schicht stark erregter Spermien zeigte.

Wenn die Flüssigkeit im Capillarröhrchen so weit verdünnt wurde, dass das Agglutinationsphänomen nicht mehr eintrat, so sammelten sich noch Spermien in grösserer Zahl in der Uebergangszone und in der Flüssigkeit selbst als in den Controlgefässen. Zahl und Beweglichkeit der Spermien wurden gesteigert, wenn der Lösung von der stark sauren dialysirten Flüssigkeit einige Tropfen zugesetzt waren. Wenn der Inhalt des Capillarröhrchens noch die erwähnte flüchtige, aromatisch riechende Säure enthielt, so schienen sich die Spermien schneller an den Uebergangszonen dieser Röhrchen als an den Controlröhrchen zu versammeln und schien auch die Beweglichkeit der Spermien in weiterem Umkreise gesteigert zu sein.

O. Hertwig beobachtete, dass die Echiniden nur dann ihre Geschlechtsprodukte ablegten, wenn gerade geschlechtsreife Exemplare des anderen Geschlechts vorhanden waren. Vogt und Yung beobachteten, dass die Echiniden bei Ei und Samenablage sich mit ihrem Porus einander nähern. Wenn also nach Vorstehendem die Eier Substanzen enthalten, die noch auf einige Entfernung auf die Spermien einwirken, so ist es möglich, dass nur sehr wenig Samenfäden des entleerten Spermas an das Seewasser verloren gehen.

Wenn wir nun die Wirkungen der einzelnen Bestandtheile der Eiextracte mit den Vorgängen bei der künstlichen Befruchtung vergleichen, so sehen wir Folgendes:

Die Lähmung der Spermien, wie sie bei längerem Verweilen derselben an der Eiperipherie eintritt, wird, ganz abgesehen von specifischen Einflüssen, schon durch die Säurewirkung der Schleimhüllen auf die sehr Säure-empfindlichen Spermien erklärt werden können. Auch der Agglutinationsvorgang, der eine dicht zusammen-

geklebte Schicht von Spermien erzeugt, muss in dieser Zone die Beweglichkeit der Schwanzfäden aufheben. Diese saure Reaction der Schleimhüllen ist auf die Anwesenheit der sauren Phosphate, Mononatriumphosphat und Monokaliumphosphat zurückzuführen. Zum Zustandekommen der Agglutinationserscheinungen bedarf es der im Dialyserückstand enthaltenen agglutinirenden Substanz. Es zeigte sich, dass diese nur beim Vorhandensein einer gewissen Menge Na Cl wirksam ist. Joos und Friedberger haben bekanntlich auf die Bedeutung der anorganischen Salze für die Agglutination aufmerksam gemacht. Der Agglutinirungsprocess ist indess, wie weiterhin näher mitgetheilt wird, nur von beschränkter Dauer.

Die Spermien der untersuchten Echinodermen waren am beweglichsten in neutraler oder nur schwach alkalischer Flüssigkeit. Lösungen von deutlich saurer Reaction wirkten lähmend. Bei dem Zusammentreffen der sauren Phosphate des Schleimes und des stark alkalischen Seewassers wird die Reaction der Flüssigkeit in der Peripherie der Schleimhüllen, wie ein Versuch mit Lackmuspapier zeigte zu einer nur schwach alkalischen resp. amphoteren. Wir haben hier bezügl. der Reaction Verhältnisse vor uns, wie sie nach Miescher in den Eiweissstoffen der lebenden Zelle vorliegen, die ziemlich starke Säuren und Basen sein sollen, die nur deshalb neutral reagiren, weil sie Beides zugleich sind. Welchen Einfluss die Herabsetzung der Alkaleszenz des Seewassers auf die Spermien ausübt, liess sich demonstrieren, wenn man eine Nadelspitze in verdünnte Essigsäure tauchte und dann die Spitze in Sperma hin und her bewegte. Man erhielt dann ähnliche Bilder wie beim Zusatz der sauren Phosphate. Die Bewegungen der Spermien werden nach obigen Versuchen somit in der Richtung zum Ei verstärkt, in der entgegengesetzten Richtung vermindert. Die Bewegungen selbst dürften nach den Untersuchungen von Jennings u. A. als Reflexerscheinungen bezeichnet werden. Das Wort Chemotaxis rückt den Vorgang unserm Verständniss nicht näher. Die flüchtige Säure scheint nach dem oben mitgetheilten Versuch in weiterem Abstand auf die Spermien zu wirken.

Vorstehende Feststellungen erklären die weiteren Beobachtungen, die ich bezüglich des Einflusses machte, den die Zahl der zugesetzten Spermien bei der künstlichen Befruchtung hatte.

Wenn ich den Eiern der untersuchten drei Echinodermenarten zum Zweck künstlicher Befruchtung nur wenige Samenfäden derselben

Art zusetzte, so drangen die einzelnen Spermien später durch die Schleimhülle zur Eiperipherie hindurch, als wenn ich eine grössere Menge zugesetzt hätte. Die Spermien selbst führten weniger kräftige Bewegungen aus als solche, die in grösserer Anzahl vorhanden waren.

Schliesslich trafen die an die Eiperipherie gelangten Spermien nicht in radiärer Stellung zum Ei, sondern in den verschiedensten Winkeln auf und blieben, nachdem sie häufig eine Zeit lang periodisch schraubenförmige und hin und her gleitende Bewegungen ausgeführt hatten, endlich unbeweglich mit dem Kopf an der Eiperipherie liegen. Hierbei lag der Kopf häufiger seitlich an, als dass er radiär aufstand. Wenn nicht mehr als eine bis drei Spermien vorhanden waren, so trat in der Regel keine Befruchtung ein. Ich hatte in den Versuchen mit Eisubstanz und Eiextracten festgestellt, dass die lähmende Säurewirkung der Ei-Schleimhüllen durch den Zusatz einer grösseren Menge des alkalisch reagirenden Spermas herabgesetzt wird, und dass die Agglutination bei einer relativ grösseren Spermamenge weniger intensiv und anhaltend ist. Diese Beobachtung gibt uns die Erklärung für die grössere Beweglichkeit und den besseren Befruchtungserfolg bei einer grösseren Spermamenge. Hinzu tritt noch ein mehr mechanisches Moment, das weiter unten gewürdigt werden soll. Der bisher nur ganz allgemein als Schutzschicht bezeichneten Schleimhülle würden somit sehr wichtige Aufgaben zufallen. Sie ist Trägerin einer starken vorwiegend aus Phosphaten bestehenden Säure und lässt diese Phosphate nur langsam in die Umgebung diffundiren. Welche Bedeutung diese Säure für die Befruchtung hat, ist oben gezeigt worden. Die Schleimschicht bildet nach meinen Beobachtungen auch einen Schutz gegen die Bakterieninvasion.

Ich stellte fest, dass, während die von einer grösseren gemeinschaftlichen Schleimschicht umgebenen Eier noch völlig frisch waren, die isolirten und wiederholt abgespülten, daher auf ihren eigenen Schleimmantel beschränkten Controleier bereits abgestorben und in Fäulniss übergegangen waren. Diesem Process konnte ich dadurch vorbeugen, dass ich den Eiern nach Abspülen der gemeinschaftlichen Schleimschicht sterilisirtes Seewasser zusetzte. Auch unreife Eier von *Asterias gl.* gingen, wenn sie derartig isolirt waren, bei entsprechender Temperatur ohne zu reifen rasch durch Fäulniss zu Grunde. Diese Fäulniss war durch das schwärzliche Aussehen der Eier charakterisirt.

Die agglutinirende Substanz der Eier und die agglutinierte Substanz der Spermaköpfe.

Es wurde bereits bemerkt, dass die Agglutinationserscheinung nur eine beschränkte Zeit dauere. Wenn zum Zweck der Untersuchung dieses Processes Sperma und Eisubstanz zu gleichen Theilen innig verrührt wurden, so entstand (besonders deutlich und schön bei *Arbacia pustulosa*) eine zähe, im Seewasser zusammenhaftende Masse, deren Geruch von dem stark ausgesprochenen Geruch der zerriebenen Eisubstanz mir etwas different erschien. Die Reaction dieser Masse war trotz des Zusatzes von Sperma deutlich sauer. Wenn diese Masse durch weiteres Umrühren im Seewasser suspendirt wurde, so fehlte ihr das Agglutinationsvermögen und bei einem grösseren Spermazusatze auch die erregende Eigenschaft der Eisubstanz in Bezug auf frisches Sperma. Die agglutinierten Spermaköpfe lösten sich nach einiger Zeit von einander. Bei dem Agglutinationsprocess scheinen also die agglutinirende Substanz der Eier und agglutinierte Substanz der Spermaköpfe eine Verbindung einzugehen, die sich im Wasser nach gewisser Zeit löst und nicht wieder ersetzt wird. Dieser Beobachtung entsprechend sehen wir, dass Spermien nach einer gewissen Zeit sowohl von unbefruchteten wie befruchteten, von unreifen wie von reifen Eiern ablassen, weil eben die agglutinirende und zugleich erregende Substanz schliesslich verbraucht ist. Auch die sauren Salze, welche die Alkaleszenz des Seewassers herabsetzen, diffundiren schliesslich mehr oder minder in ihre Umgebung, ebenso wie die flüchtige Säure. Diese allmähliche Herabsetzung des Säuregehaltes ist durch die Reaction mit den gebräuchlichen Reagentien direct nachweisbar. Vielleicht hängt es mit diesem Umstand zusammen, dass bei älteren Eiern Kreuzungen leichter zu erzielen sind als bei frischen. Einer Beobachtung, die erklären dürfte, warum die Spermien eher von befruchteten als unbefruchteten Eiern ablassen, werden wir später Erwähnung thun. Wenn ich solche Eier, die keinerlei specifische Wirkung auf die Samenfäden mehr ausübten, in eine Lösung der verschiedenen durch Kochen, Dialysiren und Destilliren aus dem Eisaft erhaltenen Substanzen und dann wieder in Seewasser gebracht hatte, so wirkten diese Eier auf frisches Sperma genau so ein, als ob es sich um frische Eier handelte. Genau ebenso wie bei frischen Eiern verhält sich das Sperma beliebigen

indifferenten Partikeln gegenüber, die in diese Lösungen gebracht waren. Wenn ich aber Eier, die keine anziehende Wirkung auf Sperma ausübten, in eine Mischung von Eisubstanz, die mit Sperma verrieben war, gebracht hatte, so blieben bei diesen Eiern die anziehenden Wirkungen auf das Sperma aus.

Weiteres Verhalten der Samenfäden bei der Befruchtung.

Wie schon erwähnt, legen sich nach Zusatz einer geringeren Anzahl von Spermien zum Ei die Samenfäden der Eiperipherie schräg an; seltener stehen sie mehr radiär auf. Ihre Bewegungen werden dann allmählich schwächer, ihr Kopf ist meist mit der Eiwand verklebt und die kurzen Zuckungen, die sie mit dem an der Eiperipherie anliegenden Kopf ausführen, stellen auch bei mikroskopischer Vergrösserung nur minimale Excursionen dar. Die weitere genaue Beobachtung des sog. Eindringens des Samenfadens in das Ei ist immer ein Glücksfall, weil, wie erwähnt, bei geringer Spermienzahl die Befruchtung häufig ausbleibt und die schliesslich befruchtende Spermie dann meist an einer für das Auge des Beobachters ungünstig gelegenen Stelle der Eiperipherie eindringt. Eine grössere Anhäufung von Spermien lässt aber den betreffenden Vorgang nicht mehr übersehen. Bei grösserer Spermienzahl lagert sich, wie ebenfalls schon erwähnt wurde, ein dichter schwärzlicher Kreis derselben um die Eiperipherie, so dass sie nicht andere als zuckende hin und her gleitende Bewegungen ausführen können. Die aussen befindlichen Spermien treffen in ihren Stossbewegungen auf die festliegenden Samenfäden. Wenn wir berücksichtigen, dass das Ei durch die nur mit dem Kopf festliegenden, mit dem Schwanz beweglichen Spermien in Rotation versetzt wird, so haben wir hier eine dreifache Art der Bewegung, die zu einer verstärkten Reibung der Protoplasmafäden des Eies führt.

Zum starken mechanischen Reiz würde noch der chemische Reiz hinzutreten, den das alkalisch reagierende Sperma auf das bis dahin von saurer Flüssigkeit umgebene Ei ausüben dürfte. In diesen der Verschmelzung der beiderseitigen Geschlechtszellen vorhergehenden Reizwirkungen finde ich die Erklärung für die von mir beobachtete Thatsache, dass bei Zusatz vieler Spermien die Befruchtung immer erheblich rascher vor sich geht, als wenn nur wenige Spermien zugelassen wurden. Auch die ungeheure, ohne Kenntniss dieser Vor-

gänge überflüssig erscheinende Menge von Spermien findet hierdurch möglicher Weise ihre Erklärung. Auf 1 cbmm ejaculirter Samenflüssigkeit des Menschen zählte Lode 60 876 Spermien und berechnete auf das Gesamtjaculat, das im Mittel 3373 cbmm beträgt, über 200 bis 300 Millionen Spermien. Damit würde von einem einzelnen Samenejaculat eine Anzahl Eier befruchtet werden können, die ca. drei Viertel der Bevölkerung von Europa entspricht, während thatsächlich im günstigsten Fall nur ein Ei befruchtet wird. Ein Mann würde in seinen zeugungsfähigen Jahren rund über 240 Billionen Samenfäden hervorbringen.

Erscheinungen, welche für eine Auslese sprechen, habe ich nur dahin beobachtet, dass von vornherein eine grössere Anzahl von Spermien ausscheidet, die sich nicht genügend beweglich erweisen. Häufig wird ein Ei von vier bis fünf Spermien ohne Erfolg belagert, bis eine neu hinzukommende Spermie die Befruchtung bewirkt.

Bezüglich des Befruchtungsakts gelang es mir, bei *Asterias glacialis* und *Strongylocentrotus lividus* wiederholt Folgendes zu beobachten. An der Stelle, an der der Kopf des befruchtenden, jetzt bewegungslosen Samenfadens haftet, sieht man ein hyalines Plasma von der Eiperipherie aus sich vorwölben, zugleich erscheint häufig das ganze Eiplasma an mehreren Stellen wie gerunzelt. Rings um die Stelle, der der Spermakopf aufliegt, war die Dotterhaut zuerst sichtbar. Während das hyaline Plasma sich zuerst um den meist schräg oder ganz seitlich anliegenden Kopf zu wölben scheint, sinkt dieser nunmehr rasch in den hyalinen Zapfen ein resp. wird in diesen hineingezogen. Der Schwanzfaden fällt dabei ab oder ist schon abgefallen. Die bisherige Annahme, dass sich der Kopf, getrieben von den Bewegungen des Schwanzfadens, in das Ei einbohre, steht daher mit den thatsächlichen Verhältnissen in Widerspruch. Sobald der Kopf noch immer mehr oder minder seitlich aufliegend innerhalb der Eiperipherie sich befindet, löst sich das Protoplasma an der Stelle des Spermieintritts von der Dotterhaut ab, und es bildet sich ein Raum, der nach aussen von der Dotterhaut, nach innen vom Protoplasma begrenzt scheint.

Die „Abhebung“ der Dotterhaut.

Der bisher als Abhebung der Dotterhaut geschilderte Vorgang soll dazu bestimmt sein, weiteren Spermien den Eintritt zu wehren.

Es wird angenommen, dass das contrahirte Eiplasma hierbei in die entstehende Höhlung Flüssigkeit hineinpresse. Der Vorgang selbst und seine Bedeutung sind indess wesentlich andere. Befruchtung und Entwicklung sind bekanntlich zwei Vorgänge, die aus Zweckmässigkeitsgründen mit einander gepaart sind, indess völlig unabhängig von einander verlaufen können. Es gibt Befruchtungen, denen keine Entwicklung folgt, wie z. B. bei den Paramaecien, und Entwicklungen ohne Befruchtungen, wie bei vielen einzelligen Organismen. Es war anzunehmen, dass dasselbe Moment, welches die Entwicklung bei der Befruchtung auslöst, auch die ungeschlechtliche Entwicklung auszulösen bestimmt ist. Die sog. Abhebung der Dotterhaut ist bei den Echinodermen eine so ständige Begleiterscheinung bei der Einleitung der Befruchtung, dass es nahe liegt, sich zunächst mit der Entstehung dieser Haut und ferner mit der Frage zu beschäftigen, ob die Bildung dieser Haut auch bei der ungeschlechtlichen Entwicklung beobachtet wird. Die von mir untersuchten Echinodermen-Eier besaßen im befruchteten und unbefruchteten, im unreifen und reifen Zustand stets eine Dotterhaut. Falls dieselbe nicht bei entsprechender Vergrößerung nachzuweisen ist, gelingt es durch rasche Zerstörung, Zerreiben, Zerschneiden, Aufquellen im destillirten Wasser die Dotterhaut zu isoliren.

Wenn ich die schonendste Präparierungsmethode, den Zusatz von verdünntem Seewasser oder von destillirtem Wasser anwandte, so sah ich beim Eindringen von Wasser in das Innere feinste Protoplasmafäden vom Eicentrum nach der Dotterhaut sich spannen. Wenn diese Fäden abrissen, so schnellten sie mit ihrem peripheren Ende nach der Dotterhaut zurück und blieben als feinste Kügelchen an der Innenfläche derselben haften.

Bei Essigsäurezusatz ist bei Asterias-Eiern eine radiäre Streifung der Dotterhaut wahrzunehmen. Es würde somit hier eine ähnliche Structur vorliegen, wie sie Retzius bei der Zona pellucida der Säugethiere beobachtet hat. Auch diese ist radiär gestreift und wird von zahlreichen Porenkanälchen durchsetzt, in welche, solange das Ei im Graaf'schen Follikel verweilt, feinste Fortsätze der Follikelzellen eindringen und mit dem Eiplasma verschmelzen. Feine radiäre Streifung hat Théel auch in der Dottermembran von *Echinocyamus pusillus* beobachtet und nimmt an, dass dieselbe vorhandenen Pseudopodien entsprechen.

Falls bei Zusatz von destillirtem Wasser dieses nicht in das

Innere des Dotterplasmas eindringt, kommt der Vorgang der Dotterhautspaltung zu Stande, wie wir ihn stets bei der Befruchtung beobachten. Nicht ein Abheben der Dotterhaut vom Protoplasma tritt bei der Befruchtung ein, sondern eine Spaltung dieser Haut. Diese kommt dadurch zu Stande, dass das contrahirte Protoplasma sich aus den feinsten Maschen der äusseren Schicht der Dotterhaut ablöst und die innere Schicht, an der es mit den Plasmafäden haftet, mit sich zurückzieht. Diese Ablösung führt an der Stelle, an der die Befruchtung eingetreten ist, und zwar zunächst rings um den hyalinen Befruchtungszapfen, dann an der Ablösungsstelle desselben, später zuweilen in der ganzen Peripherie des Eis zu Bildung eines mit Flüssigkeit gefülltem Hohlraums und zum Aufquellen der Lamellen. Die sich stets vollziehende vollständige Trennung beider Lamellen ist an einer feinen Kreislinie dicht innerhalb der äusseren Peripherie nachweisbar.

Wasseraufnahme bei der Befruchtung.

Die aufgenommene Flüssigkeitsmenge ist eine verhältnissmässig beträchtliche. Bei *Strongylocentrotus l.* beträgt sie nach meinen Beobachtungen nicht selten ein Drittel des Gesamtvolumens des Eis. Das Volumen des Protoplasma verändert sich hierbei nicht. Das Protoplasma nimmt also bei der interlamellären Spaltung der Dotterhaut weder nachweisbar sofort Flüssigkeit auf noch gibt es solche ab.

Aus vorstehend mitgetheilten Thatsachen geht mit Sicherheit hervor, dass diese Flüssigkeit aus dem Wasser der Umgebung stammt. Die erhebliche Volumzunahme des Gesamteis, das Constantbleiben des Volumens des Protoplasmas beweisen, dass das Ei während des Zeitpunkts der Befruchtung aus seiner äusseren Umgebung Wasser aufnimmt. Wie kommt diese Wasseraufnahme bei der Befruchtung zu Stande?

Bei der Geschwindigkeit des Eintritts der Flüssigkeit und dem Einströmen derselben in das Ei-Innere können nur mechanische Ursachen in Frage kommen und scheint die Annahme eines geringeren Binnendrucks, einer Ansaugung des Wassers durch das sich retrahirende Protoplasma allein übrig zu bleiben. Da die aufgesogene Wassermenge uns in allen Fällen zu gross erscheint, um durch eine einmalige Retraction in das Ei befördert zu werden, so

liegt die Deutung nahe, dass in Folge des Baus der Dotterhaut ein Rücktritt des Wassers nicht möglich ist und durch Wiederholung der Retraction ein immer grösseres Quantum Flüssigkeit aufgesogen wird. Beim Wiederausdehnen des Protoplasmas muss die interlamelläre Spaltung an der ganzen Eiperipherie zu Stande kommen. Ob und in welcher Weise die Verhältnisse an der Eintrittsstelle der Spermien die Wasseraufnahme begünstigen, wird bei Besprechung des Baues der Spermien berücksichtigt werden.

Man könnte die äussere Eischicht, solange das Protoplasma aus ihr sich noch nicht zurückgezogen hat und sie daher noch nicht sichtbar geworden ist, als membranogene Schicht bezeichnen. Alle Beobachtungen deuten darauf hin, dass diese Schicht von der äusseren Umgebung in ihrer Structur abhängt. Ihre Widerstandsfähigkeit erleidet bei älteren Eiern sichtlich Einbusse. Morgan beobachtete bei *Sphaerechinus*, dass überreife Eier leichter zerschüttelt werden konnten, was bei dieser Art sonst nur nach der Besamung eintritt. Die von O. Hertwig gemachte Beobachtung, dass Kreuzungen bei den Echiniden am leichtesten dann zu bewirken sind, wenn eine Ueberreife der Eier eingetreten, könnte ebenfalls auf dieses Moment oder auch auf die zunehmende Diffusion der Säure der Schleimhülle in das umgebende Seewasser event. auf ein Zusammenwirken beider Umstände zurückgeführt werden. Bei der ersten Furchung kann man häufig eine von der äusseren Membran durch das aufgenommene Wasser abgetrennte innere Membran unterscheiden, welche letztere sich als eine die beiden Furchungskugeln verbindende Achterfigur abzeichnet. Zwischen beiden befindet sich der interlamelläre Raum, ausserdem sind noch die beiden membranogenen Schichten der beiden Furchungskugeln vorhanden. Es gelingt an den durch Schütteln isolirten Blastomeren des Eis eine äussere Membran durch Zusatz von destillirtem Wasser nachzuweisen. Fast überall dort, wo das Cytoplasma der Blastomeren mit einem äusseren Medium in Berührung geräth, kann man die Bildung einer derartigen Membran beobachten. Nach den Versuchen von Pouchet und Chabry, die bei Echinidenlarven in kalkfreiem Seewasser ein Ausbleiben der Kalknadelbildung beobachtet hatten, war von Herbst, Driesch und Morgan gefunden, dass der Verband membranlos geschüttelter Eier, falls kein Calcium im Seewasser vorhanden, aufgelockert wird. Ich wiederholte diesen Versuch bei Eiern von *Strongylocentrotus l.*, die ich einige Minuten nach Besamung durch

Schütteln ihrer Membran beraubt und, einem ähnlichen Versuch von Herbst folgend, in eine Mischung von 3% NaCl, 0,1% RCl, 0,5% MgSO₄ und MgHPO₄ gebracht hatte. Als die Furchungszellen aufgelockerten Verband zeigten, setzte ich ihnen destillirtes Wasser zu und beobachtete sie unter dem Mikroskop. An dem zum Theil durch deutliche Zwischenräume getrennten Blastomeren konnte ich vermittelst dieser einfachen Methode ohne Färbung feststellen, dass feinste Protoplasmafäden von der einen Blastomere zur anderen sich spannten. Durch Neutralrothfärbung gelang es, diese Fäden deutlicher darzustellen.

Die Kalksalze fehlen bei diesen Versuchen übrigens nur in der äusseren Umgebung, da, wie oben gezeigt wurde, das Ei selbst Kalksalze enthält. Bei Extraovabildung habe ich beobachtet, dass das Extraovum im Contact mit dem Seewasser eine Membran bildete, und dass durch diese Membran eine neue Dotterblase sich ausstülpte, welche wiederum durch eine Membran vom Seewasser abgegrenzt war. Diese Membranen waren durch Fältelungen, die sie zeigten, deutlich erkennbar. Auch nach Verletzungen des Eies oder der Blastomeren sehen wir Membranbildung eintreten. Die Erscheinung, dass vom Blastulastadium ab die einzelnen Zellen leichter mit einander verschmelzen, weist auf Verschiedenheiten in der Structur der Zellenperipherie vor und nach dem Blastulastadium und Abnahme der Widerstandsfähigkeit hin. Am resistantesten erscheint die Dotterhaut. Die Annahme einer Kittsubstanz zwischen den einzelnen Blastomeren wird durch keine Wahrnehmungen gestützt und widerspricht der ungememen Wandlungsfähigkeit der Blastomeren und der Möglichkeit, ohne Weiteres mit einander zu verschmelzen. Die plastischen Kräfte kümmern sich um keine Zellengrenzen, wie Whitman bemerkte; Hammar glaubte eine protoplasmatische Verbindung zwischen den einzelnen Zellen bei Echinodermen, Klaatsch bei Amphioxus, beobachtet zu haben. Im Abschnitt über die Form der Spermien habe ich darauf hingewiesen, dass schon die so verschiedenartigen Gestaltungen der Samenfäden für verschiedene Structuren der Eimembranen sprechen.

Eine Abspaltung der membranösen von der membranogenen Schicht gleichzeitig mit der Aufnahme eines grösseren Quantums Flüssigkeit, die eine Quellung des ganzen Eies bedingt, fand ich zuweilen auch vor dem Beginn der parthenogenetischen Entwicklung bei *Asterias gl.*; im Uebrigen beobachtete ich in diesem Zeitabschnitt

bei allen drei Echinodermen nur ein mässiges Aufquellen oder anscheinendes Fehlen der Dottermembran. H. Przi Bram, H. G. Brown's Classen und Ordnung des Thierreichs. 54—57. Lieferung S. 1222, bemerkt, dass bei parthenogenetisch sich entwickelnden Eiern die dicke Dotterhaut fehle. Das Gebilde, das bei der Befruchtung als abgehobene Dotterhaut bezeichnet wurde, ist, wie erwähnt, die wasser-aufnehmende Schicht. Dieses Wasser wird bei der interlamellären Spaltung auf einmal aufgenommen — es dient als Reserve, während es bei der parthenogenetischen Entwicklung allmählich aufgenommen wird. Auch möchte es scheinen, als ob die parthenogenetisch sich entwickelnden Eier weniger Wasser aufnahmen als die befruchteten Eier. Die parthenogenetisch entwickelten Larven schwimmen am Grunde, bleiben also specifisch schwerer, auch entwickeln sie sich langsamer und erscheinen im Durchschnitt etwas kleiner als die durch Befruchtung entstandenen Larven. Die Wasseraufnahme ist somit ein deutlich erkennbares gemeinschaftliches Moment, das Befruchtung und Parthenogenese mit einander verbindet, und halte ich mich auf Grund dieser Befunde bei den untersuchten Echinodermen zum Aussprechen des Satzes berechtigt:

Die Entwicklung des reifen Eies wird durch Wasseraufnahme ausgelöst.

Sperma und Conjugation.

Die Frage nach der Herkunft und Structur der Dotterhaut musste der weiteren Erörterung über den äusseren Befruchtungsvorgang vorausgeschickt werden. Es war im Eingang ausgeführt worden, durch welche Vorgänge die Spermien an das Ei herangebracht und dort festgehalten werden, bis eine Verschmelzung des beiderseitigen Plasmas eintritt; ferner wie Kopf und Mittelstück der gelähmten und ihrer Bewegungsapparate beraubten Spermien in das Innere des Eies hineingebracht werden. Bisher ist nur von der Verschmelzung des Cytoplasmas des Eies mit dem Kopf der Spermien die Rede gewesen.

Die Frage blieb offen, welcher Antheil des Spermakopfes in die Verschmelzung eintritt. Bekanntlich entstammen die Spermazellen bei den Echinodermen den grosskernigen Urkeimzellen oder Spermatogonen, welche die sphärischen Endverzweigungen der Hodenschläuche auskleiden. Die Spermatogonen theilen sich zu den sog. Sperma-

tocyten, aus welchen durch weitere Bildung die Spermien resp. Spermatazoën entstehen. Der Nucleus weist bei *Strongylocentrotus lividus* 4μ , der Nebenkern 2μ auf, die Schwanzlänge beträgt 60μ . Nach Field ist der Kopf und das Mittelstück der Echinodermenspermien von einer Hülle umgeben, die ebenso wie das Schwanzstück von Cytoplasma der Spermatischen abstammt. In der vom Cytoplasma abstammenden Spitze des Spermakopfes ist ein Centrankörperchen wahrzunehmen, das auch in den sog. Perforatorien vieler anderen Spermaköpfe, nach Retzius auch denen des Menschen festgestellt wurde. Ich konnte mir dies Centrosoma bei *Asterias gl.*, das im Durchmesser $1,3 \mu$ gross ist, durch die von Field empfohlenen Dablia-Methylgrünfärbung immer deutlich sichtbar machen. Centrosoma der Spitze und Mitosoma werden violett, der Nucleus grün. Jodzusatzen zum Seewasser färbt alle diese Theile deutlich gelb. Durch verschiedene Behandlungsmethoden ist der directe Zusammenhang des vorderen mit dem hinteren Centrosoma nachgewiesen. Field sagt hierüber: „In the case of spermatozoon killed by osmic vapor the nucleus after a time swells and bursts leaving the spherical highly refringent centrosome and also the „Nebenkern“ intact.“ Das Centrosoma an der Basis des Kegels hängt mit dem Centrosoma der Spitze durch eine kontinuierliche dem Cytoplasma angehörende Schicht zusammen und ist vom Kern abzutrennen.

Wenn auch der Dimorphismus der Geschlechtszellen zu einer ganz verschiedenen Ausbildung des jeweiligen protoplasmatischen Antheils geführt hat, so sind doch die kinetischen Centren des Protoplasma vorhanden, und auch der Schwanzfaden hat protoplasmatischen Charakter. Dem Spermatozoon kann man auf Grund seiner Entstehung und seiner Structur die Bezeichnung einer Zelle mit Kern, Protoplasma und Centrosoma nicht verweigern. Field hatte angenommen, dass das Centrosoma der Spermie, welches die Bildung der ersten Astrosphäre im Protoplasma des Eies hervorruft, dieses an der Spitze der Spermie befindliche Centrankörperchen sei. Nach Boveri, Wilson und Matthews liegt indess dieses Centrosoma an der Basis des Kegels, und dreht sich der Spermakopf nach dem Eintritt in das Ei derart, dass seine Basis centralwärts zu liegen kommt. Nach den von mir beobachteten Verschmelzungsvorgängen, an denen der Kern nicht unmittelbar, sondern zunächst nur die Kernhülle Theil nimmt, ist eine Betheiligung des Centrankörperchens an der Spitze des Sperma bei dieser Verschmelzung

unabweisbar. Nachdem der Samenkopf vom Protoplasmazapfen des Eies aufgenommen worden war, konnte ich in einem Fall bei *Strongylocentrotus* deutlich feststellen, dass das Centrosoma an der Spitze des Spermakopfes verschwunden war. Erst später entsteht rings um das Centrosoma der Basis des Kerns die erste Astrosphäre. Ich glaube hiernach dem vorderen Centralkörperchen die Bedeutung zuschreiben zu dürfen, dass es bei der Verschmelzung die Vorgänge im Cytoplasma der beiden Geschlechtszellen auslöst, welche den Spermakopf in den hyalinen Befruchtungszapfen hineinbefördern. Die Formen der Spermaköpfe vieler Thierclassen, wie sie in den Arbeiten von Jensen, Ballowitz, v. Bardeleben, Field, Retzius und Waldeyer wiedergegeben sind, zeigen häufig Spitzen, Spiesse auch Widerhaken, und hat man daraus den meines Erachtens zu weitgehenden Schluss gezogen, dass die Köpfe mittelst dieser Spitzen sich einen Weg in das Innere des Eies bahnen. Nach meinen Beobachtungen dürfte es sich wenigstens für eine grosse Anzahl von Thierarten nur darum handeln, den Spermakopf in enge Verbindung mit dem Eiplasma zu bringen, den Kopf zunächst an der Eiwand zu fixiren oder anzuhaken. Die Krümmungen und Widerhaken des Spermakopfs erscheinen im anderen Fall zwecklos. Eine Kraft, die das Ei wieder nach rückwärts aus dem Ei hinausbefördern könnte, ist ja nicht gegeben. Nach der Festlegung in die feinen Lücken der Eimembran würde der Austausch und die Verschmelzung zwischen dem an der Spitze befindlichen kinetischen Apparat des Samenfadens und dem Protoplasma des Eies eintreten. Beobachtungen von Field machen es wahrscheinlich, dass letzterem Vorgang die Auflösung der äusseren Hülle des agglutinirten Spermakopfes vorausgeht. Darum können auch die „Perforatorien“ (Waldeyer) bei vielen Arten äusserst feine und schwache, bewegliche Fäden an der Spitze des breiten Kopfes oder feine Knöpfchen, auch wohl stumpfe Stäbchen sein und doch ihren Zweck erfüllen. Beim Pferdespulwurm stellt die Spermie sogar eine mit der breiten Basis nach vorn gerichtete Pyramide dar. Bei *Asterias* z. B. stellen die betreffenden Spermien eine verhältnissmässig grosse Doppelkugel dar. Der Schwanzfaden ist bei den Spermien im Verhältniss zum Kopf fast immer enorm lang und dünn und wohl geeignet, den verhältnissmässig dicken Kopf in einer Flüssigkeit vorwärts zu schrauben, nicht aber denselben durch die resistente Eiwand hindurch zu treiben. Manche Spermien tragen statt einer Spitze vorn nur ein rundes Knöpfchen, das ebenfalls mit einer zum Ein-

dringen bestimmten Waffe, einem Perforatorium, keine Eigenschaft gemein hat. Bei den Wirbelthierspermien sehen wir eine ganze Anzahl von Bildungen, bei denen von einem Bohr- oder Schneideapparat nicht die Rede sein kann, so, um einige Beispiele aus den verschiedensten Thierclassen herauszugreifen, bei *Perca fluviatilis*, bei *Vanellus cristatus*, *bos taurus*, vor Allem bei *Metachirus quica*. Auch das Kopfstück der menschlichen Spermie erscheint wenig zweckmässig für ein Bohr- oder Schneideinstrument gebaut zu sein. Sehr häufig sind die Köpfe stark abgeplattet, so z. B. beim Stier, auch concav = convex wie bei *Perca fluviatilis* und beim Menschen, so dass sie zum Anschmiegen an eine Kugelfläche wie vorbestimmt erscheinen. — Die kugeligen Wimperzellen aus der Leibeshöhlenflüssigkeit der Echiniden zeigen fast dieselbe Form, wie sie die Spermien derselben Art aufweisen, so dass sie anfänglich für diese gehalten wurden. Erstere sind nur zur Fortbewegung, keinen Falls zum Eindringen in ein Gewebe bestimmt, und wäre es auffallend, wenn eine so abweichende Bestimmung wie die des gewaltsamen Eindringens in den Eikörper jedes morphologischen Ausdrucks gegenüber den Wimperzellen entbehren sollte.

Diese für ein gewaltsames Eindringen ungeeigneten Formen lassen sich indess sehr wohl aus den Functionen des Sperma erklären, wie sie während der Befruchtungsvorgänge bei den Echinodermen oben wiedergegeben wurden. Sie erscheinen durchaus geeignet zum Anlegen an die Eiwand, wobei sie dem Eiprotoplasma eine möglichst breite Fläche zuzuwenden im Stande sind. Wir wissen aus den Untersuchungen O. Hertwig's, dass die feinste Protoplasma-Brücke zwischen zwei Zellen genügt, um diese als ein durchaus einheitlich geleitetes Gebilde erscheinen zu lassen. Boveri und Driesch beobachteten, wie zwei Zweifurchungszellen, die nur durch einen dünnen Plasmafaden mit einander verbunden waren, sich durchaus als einheitliche Zelle verhielten. Sobald zwischen den feinen Protoplasmafäden der Eihülle und dem Spermakopf der Contact hergestellt ist, ist damit die Verschmelzung der beiden Geschlechtszellen entschieden. Wir würden daher die Befruchtung auch verhältnissmässig so hoch differenzirter Arten wie die der Echinodermen als eine mit dem Vorgang der Conjugation oder Copulation wesensgleiche Vereinigung der beiderseitigen Geschlechtszellen bezeichnen dürfen. Es ist generell genommen derselbe Vorgang, den wir bei den Urformen der geschlechtlichen Zeugung, den niederen Algen, wie bei den Geschlechts-

zellen der Infusorien, der Phanerogamen und der Thiere verfolgen — Annäherung, Berührung und Verschmelzung des beiderseitigen Protoplasmas und der Kernsubstanzen. Die auf ein oder beide Individuen sich erstreckende Reducirung der Kernsubstanzen und der kinetischen Centren des Protoplasmas lässt die Grundlage des Vorgangs unberührt. Die Auffassung, als ob das eine Individuum sich in das andere hineinbohre, sich von ihm bis auf die typische Kernvereinigung gleichsam verdauen lasse, ist meines Erachtens eine irrige, die nur den vorhandenen, oft enormen Grössendifferenzen ihre Entstehung verdankt. Wenn im Spermakopf das Protoplasma häufig fast ausschliesslich auf die Centrosomen reducirt erscheint, so könnten wir aus diesem Vorgang eben die Consequenz ziehen, dass die Centrosomen den wesentlichen Bestandtheil des Protoplasmas fortzupflanzen befähigt sind.

In Bezug auf die Conjugation der Algen möchte ich eine Beobachtung von Sachs erwähnen, der von den Samenfäden von *Eudorina elegans* einer Volvocinee bemerkt: „Sie kriechen bis zu den Eizellen vor und legen sich oft in Mehrzahl, nachdem sie an denselben tastend herumgekrochen sind, an sie an.“ Diese „tastendem Herumkriechen“ ähnlichen Bewegungen beobachteten wir auch bei der Befruchtung der Echinodermen-Eier. Das Bild, das Strasburger von der Befruchtung von *Fucus platycarpus* gibt, zeigt in der Art und Weise, wie sich die Spermatozoiden an die weibliche Zelle anlegen, grosse Aehnlichkeit mit einem von wenigen Spermien belagerten Echinodermen-Ei.

Nach Boveri kann bei Echinodermen die Vereinigung zweier Geschlechtszellen erfolgen, ohne dass sich der Spermakern mit dem Eikern vereinigt. Die Vereinigung beider Kerne trat erst im Achtzellenstadium ein. Beobachtungen wie diese, ebenso die bekannten Experimente, die die Gebr. Hertwig und Boveri über die Befruchtungs- und Entwicklungsfähigkeit kernloser Eifragmente angestellt, können über die führende Rolle, welche die protoplasmatische Vereinigung bei der Zellenvereinigung spielt, kaum im Zweifel lassen. Wenn nach meinen Beobachtungen die Spitze des Samenkopfes dazu dient, die erste Verschmelzung zu vermitteln, so liegt die Vermuthung nahe, dass die wechselnden Formen des Kopfes mit der wechselnden Form der Eihautstructur, sowie mit der Aufgabe der Spermien in Verbindung stehen, Flüssigkeitsaufnahme seitens des Eies zu vermitteln. Dort, wo eine Mikropyle im Ei vorhanden ist, würde bereits ein Weg für den Wassereintritt vorge-

zeichnet sein, wo eine solche nicht existirt oder wo die Mikropyle, wie bei *Strongylocentrotus lividus* nicht immer vom Samenfaden aufgesucht wird, würde der Spermakopf genügenden Zugang in das Innere zu schaffen bestimmt sein. Der Grund, warum die Spermien vom befruchteten Ei eher ablassen als vom unbefruchteten, finde ich in der plötzlichen Ausdehnung des Eies. Wie die Intravitalfärbung mit Methylenblau zeigte, schafft diese Ausdehnung in dem umgebenden Schleimmantel zahlreiche Zugänge für das Seewasser. Mit dem eindringenden alkalischen Seewasser nimmt auch die saure Reaction der unmittelbaren Umgebung des Eies rasch ab.

Polyspermie.

Die sogen. Abhebung der Dotterhaut, d. h. die interlamelläre Spaltung im Ei als Folge des Wassereintritts findet bei Polyspermie ebenso statt wie bei der Befruchtung durch ein Spermium. Diese Abhebung kann also nicht vor Polyspermie schützen, wie bisher angenommen wurde. Würde es sich bei „der Befruchtung um ein Eindringen der Samenfäden handeln“, so könnten wir uns schwer vorstellen, wie ein gleichzeitiges Eindringen mehrerer Samenfäden auszuschiessen wäre. Nachdem gezeigt wurde, dass Ei und Sperma bei der äusseren Befruchtung gleichmässig mitwirken, so ist zu verstehen, warum normaler Weise Polyspermie nicht eintritt, und warum durch Schädigung des Protoplasmas, insbesondere durch lähmende Agentien, wie sie O. und R. Hertwig u. A. anwandten, Polyspermie künstlich zu erzeugen war. O. Hertwig beobachtete, dass die vor der Besamung auf 2—3° C. abgekühlten Eier nach 1/2 Minute nur unvollkommen Abhebung der Dotterhaut und weit vorragende Befruchtungshügel zeigten und oft 2—4 Samenfäden enthielten. Nach zwei Stunden trat nach gelinder Erwärmung Polyspermie und Abhebung der Dotterhaut ein. Diese Beobachtung ist dahin zu deuten, dass die unter der Norm bleibende Contraction des geschädigten Cytoplasma zu geringe Zufuhr von Wasser und daher unvollkommene Abhebung der Dotterhaut bewirkt. Die Gebrüder Hertwig fanden ferner, dass nach 0,2 %—0,5 % Chloralhydrat, nach Nicotinextract 1:200 bis 1:1000, nach Cocaïn 0,025 %—0,05 %—0,1 % bei verschieden langer Dauer der Einwirkung stets Abhebung und Polyspermie eintrat. Morphium in 0,0 % und 4 1/2 Stunden Dauer bewirkte keine regelmässige Abhebung, aber schliesslich

doch überall Polyspermie, die indess nicht zur Weiterentwicklung führte.

Diese Beobachtung findet ihre Erklärung in meinen Ausführungen über die Ursache der Entwicklung des Eies. Das Ausbleiben einer interlamellären Spaltung beweist, dass das Protoplasma unter dem Einfluss des Morphiums während der Verschmelzung mit den Spermien sich ungenügend contrahirt und daher zu wenig Flüssigkeit aufgenommen hatte. Die von einer ausreichenden Flüssigkeitszufuhr abhängende Entwicklung des Eies musste daher trotz der Aufnahme der Spermien ausbleiben. Bei Morphiumlösung 0,0075 % und 10 bis 20 Minuten Dauer erscheinen fast alle polyspermen Befruchtungshügel hoch hervorragend. Bei 0,025 % und 11 Minuten Dauer wurde die Eihaut etwas verlangsamt abgehoben; am folgenden Tage fanden sich am Boden liegende Blastulae. Bei 20 Minuten Dauer waren von den entwickelten Blastulae nur wenige im Stande, die Eihaut zu verlassen, und starben rasch ab. Letztere Erscheinungen weisen ebenfalls auf eine zu geringe Flüssigkeitsaufnahme hin.

Kreuzungen.

Aeltere Asteriaseier, denen ich Arbaciasamen in frischem Zustande zusetzte, zeigten keine Entwicklung. Als ich aber unter dem Gesichtspunkt, dass die Befruchtung nicht durch ein actives Eindringen der Spermie in das Eiinnere, sondern durch innigen Contact eingeleitet wird — die gleich näher zu beschreibende Methode anwandte und zwei Tage alte Asteriaseier mit frischem Arbaciasamen verrieb, erhielt ich Entwicklungen bis zum Blastulastadium und auch einzelne freischwimmende Gastrulae. Asterias-eier und Strongylocentrotussamen auf dieselbe Weise mit einander in Berührung gebracht, ergaben einige erste Furchungen, die aber auf Rechnung des mechanischen Reizes geschoben werden konnten. Wenn Strongylocentrotuseier mit Asteriasamen verrieben wurden, erhielt ich sehr viel positive Resultate bis zur Bildung von Gastrulae, die indess in der Mehrzahl der Fälle nicht frei, sondern am Boden schwammen. Dass es sich nicht um eine aus mechanischen Ursachen entwickelte Parthenogenese handelte, zeigte die rasche Entwicklung der Larven bei den befruchteten Eiern, die der parthenogenetischen nahezu um 24 Stunden vorausziehen pflegt.

Befruchtung durch bewegungsloses Sperma.

Wenn ich den Eiern der mehrerwähnten Echinodermen Sperma zusetzte, das vor 6—8 Stunden in Seewasser entleert war, und dessen Spermien anscheinend ihre Beweglichkeit ganz oder fast ganz eingebüsst hatten, so trat keine Befruchtung ein, wenn auch ein dichter Schwarm von Spermien alle Zwischenräume zwischen den Eiern ausfüllte. Wenn ich aber dieses Sperma unter sanftem Druck mit den Eiern derselben Art verrieb, so trat bei allen Echinodermenarten reichliche Befruchtung ein. Bei dem Verreiben oder Verrühren durften die Eier nicht geschädigt werden. Als ich den Versuch dahin ausdehnte, dass ich 16 Stunden alte Spermien von *Arbacia* unter Zusatz einer geringen Menge Pepsin centrifugirte und jetzt die von dem Schwanz befreiten Köpfe mit frischen Eiern verrieb, erhielt ich wiederum eine grössere Anzahl positiver Befruchtungsergebnisse, dabei auch viele Missbildungen. Unter starkem Druck zerriebenes Sperma starb ab. Als ich ältere Spermamasse von *Arbacia*, in der die Spermien völlig unbeweglich waren, mit frischen Eiern verrieb, wurden dieselben sämmtlich befruchtet. Blosser Zusatz des betr. Sperma hatte keine Befruchtung zur Folge. Sperma von *Arbacia*, das ich am 23. Januar 1903 Abends gewonnen und centrifugirt hatte, wurde am 24. eingerieben und erfolgte am 25. allgemeine Entwicklung. Als ich ältere Eier von *Arbacia pustulosa* mit einem verhältnissmässig sehr grossen Quantum von reinem, frischem Sperma derart verrieb, dass die Eier nicht geschädigt erschienen und das Sperma noch völlig beweglich war, trat keine Befruchtung ein. Erneute Untersuchungen dieser Thatsache konnte ich leider nicht mehr anstellen. Die Deutung, dass das alkalisch reagirende, im Uebermaass verriebene Sperma die saure Reaction der Eier beseitigen würde, würde, falls die Eier überhaupt noch befruchtungsfähig gewesen, Vieles für sich haben. Nachdem gezeigt worden ist, dass die Bewegung des Schwanzfadens nur dazu dient, den Spermakopf unmittelbar an das Protoplasma des Eies heranzubringen, wahrscheinlich auch noch durch Hin- und Herreiben des Kopfes das Zustandekommen der protoplasmatischen Conjugation zu unterstützen, hat die Befruchtung durch Spermaköpfe allein nichts Unerklärliches mehr. Wenn die isolirten Köpfe mit dem Ei verrieben wurden, so fand ein ähnlicher Vorgang statt, wie wir ihn bei der Befruchtung festgestellt haben.

Ich machte die Beobachtung, dass an den auf diese Weise befruchteten Eiern die Interlamellarräume und auch die innere Lamelle besonders deutlich und schön ausgeprägt war. Auch die Larven überschritten die normale Grösse. Diese Befunde würden mit der bei dieser Methode unausbleiblichen stärkeren Reizung des Plasmas, also des mechanischen und Befruchtungsreizes, im Einklang stehen. Der grösseren Wassermenge, die bei der Befruchtung in das Ei eintritt, würden wiederum grössere Larven entsprechen.

Vernon beobachtete, dass die Befruchtung frischer Eier mit nicht frischem Sperma grössere Eier ergab als das umgekehrte Verfahren. Er fand ferner, dass Befruchtung bei 17°—22° C. und Befruchtung in concentrirten Lösungen zur Entwicklung grösserer Larven, dagegen Befruchtung bei einer Temperatur von 8° C. kleinere Larven als normale erzielen lässt. Frische Eier sind eben erregbarer auf den Befruchtungsreiz als ältere Eier; bei 17°—20° C. und in concentrirteren Lösungen sind sie ebenfalls erregbarer, während das Umgekehrte bei niedrigeren Temperaturen stattfindet. Die Erregbarkeit des Protoplasmas dürfte aber die Grösse der Wasseraufnahme bestimmen.

Zur Intravitalfärbung der Eier.

In einer Mittheilung über Methylenblaufärbung hatte ich darauf aufmerksam gemacht, dass die Anwesenheit von Haloidsalzen bei bestimmten Temperaturen die Auflösung des Farbstoffes verhindert, und dass sich noch ausserordentlich kleine Mengen von Haloidsalzen durch diese Reaction nachweisen lassen. Methylenblau (chemisch rein und chlorzinkfrei) und Neutralroth reagiren in derselben Weise den betreffenden Salzen gegenüber. Bismarckbraun und Thionin färben schon weniger scharf. Ich schüttelte eine Quantität Methylenblau wiederholt mit Seewasser, das durch Essigsäurezusatz neutralisirt war, und erneute das Seewasser so lange, bis sich der Farbstoff nicht mehr auflöste. In einem Uhrgläschen mit Seewasser, das auf 10° C. abgekühlt war, befanden sich die Echinodermeneier. Nunmehr schichtete ich einige Körnchen Methylenblau am Rande der Flüssigkeit auf. Ich konnte jetzt feststellen, dass zunächst nur lebende Eier und Larven Farbstoff aufnahmen und sich leicht grünblau färbten, und zwar wurde der Farbstoff zunächst den reifen Eiern zugeführt. Unreife Eier färben sich schwächer. Todte Eier und

totde Larven blieben ungefärbt. Die Zufuhr des Farbstoffs muss auf einer Strömung beruhen, die die feinsten Farbstoffpartikelchen, die im Seewasser nicht oder kaum sichtbar werden, zu den Eiern hinführt. Wenn ich einen löslichen Stoff, ein Körnchen Gummi arabicum z. B., in das Seewasser legte, so entstand rings um das Gummikörnchen eine centrifugale Strömung, die es verhinderte, dass der Farbstoff zu den Eiern gelangte. Die lebenden Eier erschienen in der Gegend des Kerns nicht dunkler, sondern heller. Die Färbung des lebenden Eies beschränkt sich zunächst auf die Granula. Auch frei schwimmende Gastrulae färben sich, während abgestorbene sich nicht färben. Das Methylenblau färbt bei der angewandten Körnchenfärbmethode nur alkalisch oder neutral reagierende, nicht sauer reagierende Substanz. Die Folgerung, dass die Granula alkalisch oder neutral, der Dottersaft sauer reagiert, dürfte somit viel Wahrscheinlichkeit für sich haben. Ist im Seewasser bereits mehr Farbstoff angehäuft, so findet man, dass verletzte Eier sich rasch intensiv färben. Wenn wir aber einige Zeit verstreichen lassen, und das Wasser sich erwärmt, so dass grössere Mengen von Methylenblau das Seewasser färben, so bemerken wir, dass jetzt der Vorgang langsam umkehrt und der Farbstoff sich am meisten in den abgestorbenen Eiern, ferner in Eiern, die dem Absterben nahe sind, und auch in den lebenden Eiern nicht in der Peripherie, sondern im Centrum anhäuft. Reife und unreife Eier unterscheiden sich jetzt kaum wesentlich in der Färbung. Todte Eier und todte Larven färben sich tiefblau. Die Schleimschicht nimmt immer nur die Färbung des umgebenden Wassers an. O. Hertwig beobachtete, dass diejenigen Eier bei der Fortentwicklung am meisten geschädigt erschienen, die am intensivsten gefärbt waren. Vielleicht nehmen die weniger lebensfähigen Eier auch grössere Mengen von Farbstoff auf. Die Aufnahme des Farbstoffes geht mit der Aufnahme des Seewassers parallel.

Während bei der Untersuchung mit gewaschenen Farbstoffkörnchen die protoplasmatischen Strömungen die Farbstoffansammlung zu Stande kommen lassen, scheint später für die Aufnahme des genannten Farbstoffs die Reaction des Objekts das wichtigste Moment zu sein. Wenn ich die Eier auf irgend eine Weise reizte, gleichgültig, ob auf galvanischem oder chemischem Wege, so dass eine Contraction des Eiprotoplasmas eintrat, so beobachtete ich bei dem Zusatz von Methylenblau in Form gewaschener Körnchen, dass die gereizten Eier noch keine Färbung angenommen hatten, während die zuerst

gereizten Eier bereits eine Färbung erkennen liessen. Methylenblau wirkte lähmend auf die Spermien ein. Als ich aber bei *Strongylocentrotus* unter den oben angegebenen Verhältnissen den Eiern von der einen Seite Spermien, von der anderen Seite Methylenblaukörnchen zusetzte, gelang es wiederholt, dort, wo die Befruchtung nicht gestört wurde, eine deutliche, nur auf den Interlamellärraum beschränkte, grünblaue Färbung festzustellen.

Entwicklung bei der Parthenogenese und lebenserhaltende Reize.

Auch die parthenogenetische Entwicklung kommt nachweisbar nur durch Flüssigkeitsaufnahme zu Stande. Es ist schon wiederholt die Vermuthung ausgesprochen worden, dass die Parthenogenese durch Reizwirkungen zu Stande kommt, ohne dass man in das Wesen des Vorgangs näher eingedrungen wäre. Einige Forscher, Loeb und Morgan, suchten den Grund zur Auslösung der parthenogenetischen Entwicklung sogar in der Wasserabgabe. Eine Beobachtung, die ich bei der Behandlung von reifen Eiern von *Asterias glacialis* mit destillirtem Wasser machte, gibt den Schlüssel zur Lösung dieses Problems. Eier, die vorher durch äussere Agentien (mechanische, chemische, elektrische, thermische und Lichtwirkungen) gereizt waren, blieben bei Zusatz von destillirtem Wasser mehrere Minuten und länger erhalten und zeigten sich, in Seewasser gebracht, lebens- und befruchtungsfähig, während die nicht gereizten Eier aufgequollen und zerfallen waren. Ich erhielt also bei der Eizelle dasselbe Resultat, das ich bei der *Aplysia in toto* nach Entfernung des Basalganglions erhalten hatte. Zu diesen lebenserhaltenden Reizen gehörte auch die Befruchtung. Befruchtete Eier wurden von destillirtem Wasser später zerstört als unbefruchtete. Man könnte diese Thatsache durch den Umstand erklären wollen, dass die veränderte Beschaffenheit der Dotterhaut die Ursache dieses verschiedenen Verhaltens wäre. Diesem Einwurf ist entgegenzuhalten, dass auch Eier, deren Membranen durch Schütteln beseitigt wurden, sich ebenso dem destillirten Wasser gegenüber verhielten, und dass die Befruchtungsfähigkeit der unbefruchteten Eier in Folge des Einflusses der erwähnten Agentien sich nicht änderte. Ferner beweisen dies meine Versuche an Erythrocyten und Leukocyten. Ich möchte bezüglich des Aufquellens der Eier noch erwähnen, dass die nicht ge-

reizten Eier bei destillirtem Wasser sich vorwiegend von einem bestimmten Punkt aus auflösen, während die gereizten Eier sich von der ganzen Peripherie aus auflösten. Als lebensverlängernde Reize erzeigen sich alle Arten von Agentien, die auch für die Erzeugung der Parthenogenese wirksam waren. Bei den Eiern von *Arbacia p.* war nach einer halben Minute Galvanisirung der Reizzustand, nach zwei Minuten die Erschlaffung festzustellen. Bei *Strongylocentrotus l.* trat der Reizzustand schon nach etwa einer Drittelminute ein. Bei Eiern von *Asterias gl.* und auch bei Larven derselben Art dagegen musste ich etwa zwei Minuten lang den galvanischen Strom einwirken lassen, um einen deutlichen Reizzustand zu erzielen, und war die Erschlaffung des Eies erst nach sechs Stunden eingetreten. Diese Erschlaffung, unter welcher ich den Zustand verstehe, bei welchem das destillirte Wasser rascher in das Ei eindrang als bei Controleiern, zeigte erst nach circa acht Stunden ihr Maximum. Ich legte mir die Frage vor, ob dieses verschiedene Verhalten gegenüber dem destillirtem Wasser nicht als Maassstab für den vorhandenen Reizzustand des Eiprotoplasmas verwandt werden könnte, und ob nicht Untersuchungen nach dieser Richtung weitere Aufschlüsse über das Wesen der Parthenogenese zu geben im Stande seien. Bei allen Agentien, die ich anwandte, erhielt ich immer wieder das Resultat, dass die Eier sich nur dann parthenogenetisch entwickeln, wenn sie einen bestimmten Zeitraum hindurch der Einwirkung der äusseren Agentien ausgesetzt und dann in Seewasser gebracht waren. Erst nachdem sie sich einige Zeit wieder im Seewasser befunden hatten, begann die parthenogenetische Entwicklung.

Wodurch unterscheiden sich die so behandelten Eier unmittelbar nach der betreffenden Behandlung und nachdem sie einige Zeit im Seewasser gelegen hatten, von normalen Eiern? Wenn beispielsweise nach der Behandlung mit verdünnter Essigsäure die parthenogenetische Entwicklung auch erst nach sechs bis acht Stunden Aufenthalt im Seewasser eintrat, so musste die Wirkung des chemischen Agens doch schon bei der Entfernung aus demselben vorhanden sein. Ich lasse das Protokoll eines solchen Versuchs folgen:

Asterias glacialis-Eier wurden, nachdem bei den meisten das zweite Polkörperchen ausgestossen war, bei 18° C. um 4 Uhr in 400 g Seewasser gelegt, das mit zwei Tropfen concentrirter Essigsäure deutlich angesäuert war. Um 4 Uhr 40 Minuten wurden die Eier mit Seewasser abgespült, dann ein Theil in destillirtes Wasser

gelegt. Sie quollen circa zwei Minuten später auf als Controleier. Um $6\frac{1}{6}$ Uhr trat das Aufquellen ebenfalls circa zwei Minuten später auf als bei den Normaleiern. Um 10 Uhr stellte ich fest, dass das Volumen der vorbehandelten Eier im Seewasser grösser war als das gewöhnlicher Asteriasier. Nunmehr quollen die Essigsäure-Eier gleichzeitig mit den Controleiern auf. Es traten überall in ersteren die in der membranogenen Eihülle enthaltenen Protoplasmaeinschlüsse vor. Das Ei war wie von einer Corona von unzähligen Perlchen, die rasch immer grösser wurden, eingefasst. Nach 40 Minuten hatte also der Einfluss der Essigsäure einen Reizzustand zur Folge, nach zweistündigem Aufenthalt im Seewasser war der Reizzustand noch vorhanden, nach fünfständigem Aufenthalt in Seewasser war er anscheinend verschwunden, die Wirkung der Essigsäure auf die Dotterhaut hatte indess zur Folge, dass in destillirtem Wasser die feinen Protoplasmafäden sichtbar wurden. Die protoplasmatischen Einschlüsse hatten sich imbibirt, wie der zahlreiche Austritt desselben bewies. Bei der Parthenogenese also wie bei der Befruchtung wird der Beginn der Entwicklung durch Wasseraufnahme bezeichnet. Die der Parthenogenese auslösenden Agentien bewirken ausnahmslos zuerst einen Reizzustand, der nach längerem Aufenthalt im Seewasser schwindet und zu einer Lähmung des Eiplasmas führt, das sich mit Wasser imbibirt. Beim Zusatz von destillirtem Wasser quellen die erschlafften und erweiterten Protoplasmafäden aus der Eiperipherie hervor, während das Innere des Eies dem eindringenden destillirten Wasser noch Widerstand leistet. Die Widerstandsfähigkeit der verschiedenen Eier gegenüber der Essigsäure ist eine sehr verschiedene. *Arbacia*eier, die nur eine Viertelminute in der erwähnten Flüssigkeit (1 bis 2 Tropfen Essigsäure zu 300 g Seewasser) verweilen, werden resistent gegen destillirtes Wasser. Lässt man aber die Eier eine Minute in dem angesäuerten Wasser, so lösen sie sich nach Zusatz von destillirtem Wasser sofort in demselben auf. Von besonderem Interesse ist unter diesen Umständen die Wirkung des destillirten Wassers auf die Hervorrufung der Parthenogenese. Wenn *Asterias glacialis* etwa eine Minute, *Arbacia* und *Strongylocentrotus* eine Viertel- bis eine halbe Minute in destillirtes Wasser gebracht und dann in Seewasser versetzt wurden, so folgte bei *Asterias* eine grössere Anzahl, bei den anderen Arten häufig ein kleiner Procentsatz von parthenogenetischen Entwicklungen. Bei vielen Eiern kam es nur zu dem Furchungsstadium, eine grössere Anzahl entwickelte sich stets bis zur

Blastula und freischwimmenden Gastrula. Die Entwicklung unter dem Einfluss des destillirten Wassers erscheint abweichend von der sonstigen Parthenogenese als ein Analogon der durch Befruchtung hervorgerufenen Entwicklung. Es kam hier häufig zur Bildung der Dotterhaut und Bildung eines interlamellären Raumes. Die Bedeutung der Wasseraufnahme für die Entwicklung ist damit besonders deutlich erwiesen.

Von Wichtigkeit ist es, dass dies Experiment einen gewissen Anhalt über die Beschaffenheit des Wassers gibt, das die Befruchtung auszulösen im Stande ist. Wir können aus diesem Versuche schliessen, dass der Eintritt von stark verdünnten Lösungen die Entwicklung hervorzurufen im Stande ist, und die Annahme gewinnt an Wahrscheinlichkeit, dass unter normalen Bedingungen die Salze des Seewassers mehr oder minder vom Eintritt in das Ei zurückgehalten werden. Wir müssen ferner annehmen, dass eine schwach saure Beschaffenheit des eintretenden Wassers der Entwicklung mindestens nicht schädlich ist, da das den Eiern zugesetzte destillirte Wasser unter dem Einfluss des sauren Schleims der Eihülle schwach saure Reaction zeigte. Wir können vermuthen, dass das Seewasser beim Passiren der stark sauren Schleimhülle von seiner Alkaleszenz stark einbüsst, wenn es nicht neutrale oder saure Reaction annimmt.

Künstliche Erzeugung der Parthenogenese.

Nachdem sich mir für die Erklärung parthenogenetischer Entwicklung ein einheitlicher Gesichtspunkt ergeben hatte, habe ich eine grössere Reihe von Agentien nach dieser Richtung geprüft. Ich muss die Wirkung des Temperatureinflusses auf die Parthenogenese allen anderen Versuchen vorausschicken, da alle anderen dadurch beeinflusst werden. Die Versuche wurden stets an allen drei oben genannten Echinodermen angestellt. Als ein sehr geeignetes Object für meine Versuche erwiesen sich die Eier von *Asterias glacialis*, da diese verhältnissmässig widerstandsfähig sind und bei entsprechender Temperatur zur natürlichen Parthenogenese neigen. Ich darf hier bemerken, dass ich die Angaben *Viguier's* über natürliche Parthenogenese von *Arbacia pustulosa* und *Strongylocentrotus lividus* nicht ohne Weiteres mit *Loeb* verwerfen kann. Die von *v. Uexküll* in Daar-es-Salaam angestellten sorgfältigen Untersuchungen zeigen erhebliche Abweichungen in der Lebensthätigkeit der Echinodermen gegenüber solchen an anderen Beobachtungsorten.

Welche phylogenetischen Differenzirungen bezüglich der ersten Entwicklung bei den unter den höheren Temperaturen der afrikanischen Küste beobachteten Thieren stattgefunden haben, können nur weitere Beobachtungen klarstellen. Uebergiessen von reifen Asterias-eiern in 18° C. kalten Schalen mit 34° C. warmem sterilisirtem Seewasser rief wiederholt parthenogenetische Entwicklung hervor. Ausser vielen Zerfallserscheinungen beobachtete ich wiederholt Entwicklungen bis zum Blastulastadium. In einem Fall kamen die Eier nicht über das Morulastadium hinaus, im anderen Falle sah ich ausschliesslich Zerfallserscheinungen. Die in Wasser von 34° C. gebrachten Eier zeigten Reizerscheinungen, sie lösten sich später in destillirtem Wasser auf als die Controleier. Bei *Strongylocentrotus* und *Arbacia* erhielt ich negative Resultate. Dreistündige Abkühlung bis auf 3 und 4° C. rief mehrere Stunden nach Rückversetzung bei *Asterias* und *Arbacia* regelmässig zahlreiche Entwicklung hervor, wie dies Morgan, Loeb und Greeley bereits beobachtet hatten. Von mechanisch wirksamen Mitteln erwähne ich der Rüttelversuche. Viertelstündiges Rütteln am Rüttelapparat des Neapeler Instituts tödtete sämmtliche Eier der drei Arten ab, wie man durch die Zerfallserscheinungen feststellen konnte, während die Spermien der betreffenden Arten ein einstündiges Rütteln ohne Schaden ertrugen. Schwaches Rütteln von wenigen Minuten bewirkte vereinzelte parthenogenetische Entwicklung. Die Versuche von Loeb und Morgan wurden damit bestätigt.

Bei Galvanisirung der Eier erhielt ich folgende Ergebnisse: Constanter Strom von einer Minute Dauer bei Gebrauch von zwei kleinen Chromsäure-Elementen bewirkte bei *Asterias* parthenogenetische Entwicklung zahlreicher Eier. Nach Einwirkung von zwei Minuten Dauer trat noch reichliche Parthenogenese ein, dabei zeigten sich unregelmässige Furchungen. Die meisten Eier kamen nicht über das 32 Zellenstadium hinaus. Die zwei Minuten galvanisirten Blastulae und Gastrulae blieben in der Entwicklung zurück. Galvanisirung von fünf Minuten Dauer zerstörte Eier und auch Larven. Der Inductionsstrom war anscheinend ohne Einfluss auf Eier und Larven.

Ich möchte hier gleich erwähnen, dass bei zwei Minuten galvanisirten, dann besamten Eiern wenig Befruchtung und viel Zerfall eintrat. Wenn die Eier nur eine Minute vor der Befruchtung galvanisirt waren, so folgte gute Entwicklung. Der Ein-

fluss von concentrirtem Sonnenlicht war bei Ausschaltung der Wärmestrahlen durch Alaunlösung bei *Asterias* bei einstündiger Einwirkung nur undeutlich nachweisbar. Es traten bei *Asterias* einige Furchungen auf, die nicht über die ersten Stadien hinausgingen. Bei *Arbacia* und *Strongylocentrotus* erhielt ich negative Resultate.

Versuche mit Spermia-Extractivstoffen bei *Asterias* gl., auf dessen Wirksamkeit Piéri, Dubois und Winkler aufmerksam gemacht hatten, ergaben mir dasselbe negative Resultat, das Cremer bei der Befruchtung von Forelleneiern in dieser Hinsicht erhalten hatte. Ich hatte die Versuche bei *Asterias*, *Strongylocentrotus* und *Arbacia* angestellt und mich durchaus an die Vorschriften Winkler's (sein zuerst angegebene Verfahren) gehalten. Es war mir nicht möglich, einen Anhalt für die von dem Autor supponirten Wirkungen eines Enzymes zu finden. Der Spermiaextract war wirkungslos bei *Asterias*, *Strongylocentrotus* und *Arbacia*. Nachdem ich Vorstehendes bereits festgestellt, aber noch nicht veröffentlicht hatte, hat W. F. Gies (Amer. Journ. of. Physiol. vol. 6 p. 53—76) eine eingehende Mittheilung veröffentlicht, in der er nachweist, dass kein spermatogenes Enzym im Extract vorhanden, auch kein Zymogen im Samen nachweisbar ist. — Zusatz von zerriebener Eimasse hielt die Reifung der Eier bei *Asterias* zurück.

Von chemischen Agentien haben Andere und ich von sauren wie alkalischen Lösungen, von Salzen in vermehrter und verminderter Concentration ähnliche positive Erfolge für die Hervorrufung der Parthenogenese beobachtet.

Die günstigen Resultate, die Delage von der Anwendung der Kohlensäure gesehen, veranlassten mich, den Einfluss der Essigsäure und der Citronensäure auf die Parthenogenese zu prüfen.

Es gelingt bei geeigneter Temperatur, 18—19° C., und den nöthigen Vorsichtsmaassregeln, dieselben günstigen Erfolge, die Delage von der Anwendung des Kohlendioxyd bei *Asterias* erhielt, durch eine sterilisirte, mit Essigsäure angesäuerte Seewasserlösung zu erzielen. Hierzu genügen ein bis zwei Tropfen concentrirter Essigsäure auf 200 g Seewasser. Die Dauer der Anwendung beträgt etwa 40 Minuten. Unbedingt nothwendig ist eine gründliche Abspülung der Eier, nachdem sie aus dem angesäuerten Wasser herausgenommen sind, und wiederholte Erneuerung des Seewassers. Wenn ich zu stark angesäuert hatte oder die Säure zu lange hatte wirken

lassen, so traten zahlreiche Zerfallsformen auf. Bemerkenswerth waren die zahlreichen Anomalien nach der Essig-Parthenogenese bei den Larven.

Essigsäure, die längere Zeit zugesetzt wird, hält sehr deutlich die Reifung der Asterias Eier auf. Uebrigens wirken ebenso retardirend hypertonische Kochsalzlösungen und Kalksalze. Aehnlich wie die Essigsäure war bei Asterias die Wirkung der Citronensäure auf die Parthenogenese. Ein Aufenthalt in der Dauer von einer halben Stunde in deutlich gesäuertem Seewasser rief zahlreiche Parthenogenese hervor. Wenn die Eier zu lange in den sauren Lösungen gehalten oder die Eier nicht gründlich von allen Säureresten befreit wurden, so quollen die Membrane glasig auf, und die Eier zerfielen. Herbst und Driesch lösten das Skelett von Echinidenlarven durch Einleitung von Kohlensäure ohne Tödtung der Larven auf. Es ist danach nicht ausgeschlossen, dass die Erschlaffung des Eies, als deren Folge ich das für die Entwicklung entscheidende Eindringen von Wasser in das Ei nach Ablauf des Reizzustandes desselben festgestellt hatte, mit einer Auflösung der Kalkbestandtheile der Eimembran und resultirenden erhöhten Durchlässigkeit dieser einhergeht. Zusatz von NaHCO_3 , und zwar in $1\frac{1}{2}\%$ ige Lösung bei circa $1\frac{1}{4}$ Stunde Dauer, bewirkten bei Asterias gl. allgemeine parthenogenetische Entwicklung, die wiederholt nicht hinter der durch Kohlensäure bewirkten Entwicklung zurückstand. Entwicklung fand bis zur Bipennaria statt. Bei Strongylocentrotus und Arbia erzielte Anwendung derselben Lösung in der Dauer von zehn Minuten einen positiven Erfolg. Die wenigen Entwicklungen gelangten bis zum Gastrulastadium. Auch hier ist sorgfältige Abspülung der Eier nothwendig. Von ganz besonderem Interesse waren Erscheinungen, die ich bei den NaHCO_3 -Larven von Asterias beobachtete. Am dritten Tage einer NaHCO_3 -Cultur fand ich Folgendes: Blastulae, Semigastrulae und Gastrulae waren zum Theil beweglich; nur wenige schwammen frei herum. Die am Boden sich bewegenden Larven zeigten enorme Reizbarkeit und Wandelbarkeit in der Formenbildung. Die Larven stülpten den Urmund aus und ein, entwickelten symmetrische kleinste Invaginationen am animalen Pol, bildeten aus Gastrulae Blastulae, zeigten scheinbar Auflösung aller Zellengrenzen, um dann aus diesen wieder Blastulae zu bilden. Ich beobachtete bei einer derartigen Blastula eine Viertelstunde lang, wie ganz regelmässig während etwa dreiviertel Minuten abwechselnd der

animale Pol zum vegetativen Pol wurde, indem sich hier ein Urmund spaltete, darauf der vegetative Pol zum animalen wurde und die betreffenden Blastomeren sich abplatteten. Wiederholt erhielt ich Bilder, die ganz den Doppelgastrulae von Amphioxus glichen, wie sie Wilson durch Schütteln des Eies im Stadium der Zweitheilung erhielt. Bei einer Larve, die sich noch soeben als deutliche Gastrula erwies, schwinden alle Zellgrenzen, ein unentwickeltes Ei scheint vor uns zu liegen, langsam erscheinen wieder die Formen einer Blastula, dann bildet sich an einer Stelle ein Zellknäuel, die gegenüberliegenden Zellen verkürzen und verschmälern sich. Im Knäuel erscheint eine Falte, eine Spalte von den anliegenden grossen Keimzellen schiebt sich hinein, und die Gastrula resp. Semigastrula ist fertig. Wir werden am Schluss noch einmal auf diese Erscheinungen zurückkommen.

Bei *Strongylocentrotus* l. hatte Anwendung der 1 $\frac{1}{2}$ %igen NaHCO₃-Lösung bei 10 Minuten langer Dauer wiederholt positiven Erfolg. Die Erzeugung der Parthenogenese durch Erhöhung des äusseren osmotischen Drucks die Parthenogenese durch „Tonogamie“ dürfte ebenfalls auf den Reiz zurückzuführen sein, den die concentrirte Flüssigkeit ausübt. Eine Wirkung spezifischer Ionen anzunehmen scheint nach allem Vorstehenden kein zwingender Grund vorzuliegen.

Wie schon erwähnt, erhielt ich bei *Asterias* regelmässig parthenogenetische Entwicklung einer grösseren Anzahl von Eiern bis zum zweiten Tage, aber auch bei *Arbacia* und *Strongylocentrotus* wiederholt Entwicklungen in den Anfangsstadien, wenn ich die Eier eine Minute in destillirtes Wasser gebracht hatte. Die unbefruchteten Eier starben in der Mehrzahl bald ab. Ferner beobachtete ich, dass einzelne unreife Eier, nachdem sie nur eine Minute in destillirtes Wasser gebracht waren, im Seewasser nunmehr weiter reiften und die Polzellen jetzt innerhalb der Dotterhaut austiessen. Wenn ich Eier von *Asterias*, die eine Minute in destillirtes Wasser getaucht waren, befruchten liess, so erhielt ich eine grössere Anzahl guter Entwicklungen bis zur freischwimmenden Gastrula. Alle Larven waren bedeutend grösser — um ein Fünftel bis ein Viertel — als die Controllarven. Sie zeigten dabei Lücken zwischen den Blastomeren, als hätte das zellenbildende Material zur Ausfüllung der Keimblase nicht ausgereicht.

Die Entwicklung bei der Befruchtung folgt, wie ich zeigte, durch Wassereintritt. Dieser Wassereintritt scheint auch im vorliegenden

Fall stattgefunden zu haben, indem die Dotterhaut schon eine gewisse Flüssigkeitsmenge aufgenommen hatte, die möglicher Weise zur Einleitung der Entwicklung genügt hätte. Für diese Deutung würde der auffallende Wasserreichtum der Larven sprechen.

Verzögerung der parthenogenetischen Entwicklung.

Bei den Versuchen zur künstlichen Erzeugung der Parthenogenese nahm bei *Asterias gl.* das Stadium des Reizes durchschnittlich sechs bis acht Stunden in Anspruch. Dann erst trat das Stadium der Erschlaffung und hierauf erst die Entwicklung ein. Auch im Stadium der Erschlaffung nahm der Wassereintritt längere Zeit in Anspruch als bei der Befruchtung. Diese Verhältnisse würden es erklären, warum die Entwicklung nach Befruchtung der parthenogenetischen Entwicklung fast immer viele Stunden vorseilt.

Einstülpung bei der Gastrulation?

Von den Formen, die in der organischen Entwicklung gesetzlich zu sein scheinen, hat man der Einstülpung der Keimzellen den Platz als einer Grundform aller Neugestaltung angewiesen. Jedenfalls hat man geglaubt, dass in der Regel die Gastrulation durch eine Einstülpung der Keimzellen bewirkt werde. Bei den von mir untersuchten drei Echinodermenarten konnte ich aber mit Bestimmtheit feststellen, dass die Gastrulabildung mit einer Spaltung des am vegetativen Pol angehäuften Keimzellenaggregats beginnt.

Ich war zuerst durch die Beobachtungen an den NaHCO_3 -Larven auf diese Bildungsweise aufmerksam gemacht worden. Diese Larven bildeten nicht selten, wie oben mitgeteilt wurde, in einer halben Minute aus der Blastula eine Semigastrula aus, und entstand die Spaltung in dem in das Blastocöl ragenden Zellenaggregat eher als zwischen den entsprechenden peripheren Blastomeren. Auch an anderen Stellen als am vegetativen Pol kam es bei den beobachteten Larven häufig zu einer Schlauchbildung innerhalb des Blastocöls. Immer war aber der Vorgang der, dass ein solider Zapfen, ein Zellenaggregat in das centrale Lumen hineinwuchs und sich dann spaltete, worauf die Randzellen sich palissadenförmig um das entstandene Lumen gruppirtten. Weitere Vergleiche bei anderen Thierarten bringen zu dem Schluss,

dass eine Einstülpung nur in der Minderheit der Fälle, z. B. bei *Amphioxus*, eine Gastrulabildung hervorruft. Zumeist handelt es sich um eine Anhäufung von Keimzellen am vegetativen Pol, die einer Einstülpung einen mechanischen Widerstand entgegenzusetzen würde. Thatsächlich kann man auch die Entwicklung der feinen Spaltungen an den Präparaten selbst nachweisen. Eine Einstülpung könnte entstehen, wenn in der Keimblasenhöhle ein verminderter Druck herrschte. Wenn auch ein solcher durch Flüssigkeitsaufnahme seitens der Keimzellen entstände, so müssten wir in weiterer Consequenz dieser grob mechanischen Auffassung annehmen, dass sich der am wenigsten resistente Theil der Eiwandung, der animale Pol, einstülpte, während thatsächlich die voluminösen Dotterzellen den Urdarm bilden helfen. Wenn aber durch die Urdarmbildung ohne gleichzeitige entsprechende Flüssigkeitsaufnahme in der Keimblasenhöhle ein erhöhter Druck hervorgerufen werden sollte, so würde eine Zapfenbildung weniger Raum, eine nachfolgende Spaltung weniger Energie aus ein fachstenmechanischen Principien beanspruchen, als wenn ein Theil der Zellwand sich einstülpte.

Bei den NaHCO_3 -Larven konnte ich zwei Formen der Urdarmbildung beobachten. In dem einen Fall entstand ein solcher durch Anhäufung eines Zellenaggregats und nachfolgende Spaltung; in dem anderen Fall bildeten sich zwei seitliche Falten, zwei Ausstülpungen, die durch ihren Zusammenschluss den Urdarm herstellten. Bei letzterer Bildungsweise war eine temporäre Druckerhöhung innerhalb der Keimblasenhöhle ganz ausgeschlossen.

Beim Säugethier geht bekanntlich die Form der Blastula aus einer intercellulären Spaltbildung hervor und dürfte auch hier die Gastrula aus einer Delamination von der Innenfläche des Furchungskugelrestes entstehen.

Ich möchte die wesentlichsten Resultate vorstehender Mittheilungen wiederholen.

1. Die sauer reagirende Eimasse übt bei den genannten Echinodermen eine tödtliche, bei kurzer Dauer der Einwirkung lähmende, in geringer Menge agglutinirende bezw. erregende und anlockende Wirkung auf Spermien der eigenen und fremden Art aus.

2. Die Untersuchung des Extracts der Ei- und Schleimhüllensubstanz ergibt, dass die saure Reaction von primärem Kalium- und Natriumphosphat herrührt. Im Rückstand des Dialysats bleibt die

agglutinirende Substanz zurück. Ausserdem wird aus dem Destillat eine flüchtige Säure gewonnen. Die aufgefundenen verschiedenen Flüssigkeiten entsprechen, wie experimentell nachgewiesen wurde, den festgestellten verschiedenen physiologischen Wirkungen der Ei-substanz auf die Spermien.

3. Es wurde nachgewiesen, dass die Vorbedingungen für die Befruchtung theils mechanischer, theils chemischer Art sind, und konnten die einzelnen Wirkungen näher analysirt werden.

4. Die Agglutination der Spermien kommt zu Stande durch das Zusammenwirken der an den Eiern befindlichen agglutinirenden und der am Sperma befindlichen agglutinierten Substanz.

Zum Zustandekommen der Agglutination ist eine gewisse Menge von NaCl erforderlich.

Die Agglutination dauert nur eine beschränkte Zeit, da die Verbindung der agglutinirenden und agglutinierten Substanz sich im Wasser löst und nicht wieder ersetzt wird.

5. Der Samenkopf bohrt sich nicht in das Ei ein, wie bisher angenommen wurde, sondern sein protoplasmatischer Antheil verschmilzt mit dem Eiprotoplasma zu einem hyalinen Zapfen. Von diesem Zapfen umfasst, wird das Spermium in das Ei hineingezogen.

6. Bei der sogenannten Abhebung der Dotterhaut handelt es sich nicht um Neubildung einer äusseren Membran. Die Dotterhaut ist stets auch bei anscheinend homogener protoplasmatischer Masse vorhanden. Die Dotterhaut zeigt eine maschen- oder siebförmige Structur und ist von feinsten Protoplasmafäden durchsetzt. Auch die einzelnen Blastomeren hängen durch feine Protoplasmafäden zusammen.

Bei der Befruchtung tritt eine interlamelläre Spaltung der Dotterhaut durch Wasseraufnahme ein. Die Vergrösserung durch Wasseraufnahme ist beträchtlich, nicht selten $\frac{1}{3}$ des Volumens des Eis.

7. Der Beginn der gesammten Entwicklung des reifen Eis wird durch Wasseraufnahme ausgelöst.

8. Die Spermatozoen zeigen bei den untersuchten Echinodermen, ebenso bei vielen anderen Arten, auch beim Menschen, in ihren sog. Perforatorien ein, in einzelnen Fällen auch mehrere Centralkörperchen. Dies Centralkörperchen scheint bei der Befruchtung die erste Verschmelzung des protoplasmatischen Antheils des Samenfadens mit dem Ei zu vermitteln. Schon die äusseren Formen der Spermien

machen es unwahrscheinlich, dass dieselben für ein gewaltsames Eindringen bestimmt sind. Die directen Beobachtungen zeigen dementsprechend, dass die Befruchtung ein Analogon der bei den Infusorien beobachteten Conjugation darstellt.

9. Die unter Wasseraufnahme eintretende interlamelläre Spaltung der Dotterhaut, die als Abhebung der Dotterhaut bezeichnet wird, soll bekanntlich das Ei gegen Polyspermie schützen. Sie tritt indess auch bei Polyspermie ein, wenn das Eiprotoplasma durch äussere Agentien geschädigt wurde.

10. Der Schwanzfaden der Spermien scheint nur dazu bestimmt zu sein, den Kopf an die Eiperipherie heranzubringen, die Protoplasmafäden des Eis durch die Bewegungen des Kopfes mechanisch zu reizen und damit die Verschmelzung einzuleiten. Die Befruchtung gelingt auch mit schwanzlosen Köpfen, falls diese mit den Eiern bei Schonung der Substanz derselben in innigen Contact gebracht werden. Auch Kreuzungsbefruchtungen, die auf andere Weise schwer hervorzurufen waren, gelang es durch diese Methode zu erzeugen.

11. Bei der von mir angewandten Methode der Intravitalfärbung — Waschen der Methylenblaukörnchen mit Kochsalzlösung und Zusetzen derselben bei niederer Temperatur und neutraler Reaction der Flüssigkeit — zeigt es sich, dass zunächst nur lebende Eier in Folge einer in das Innere des Eis führenden Strömung Farbstoff aufnehmen. Bei grösserer Anhäufung von Farbstoff und steigender Temperatur kehrt der Färbungsprocess um, und werden abgestorbene Theile stärker als lebende gefärbt.

12. Eier, die ich durch äussere Agentien gereizt hatte, leisteten den osmotischen Einflüssen Widerstand.

In destillirtes Wasser gebracht blieben sie bis zu mehreren Minuten länger lebens- und befruchtungsfähig als die Controleier.

Diese Beobachtung gab gleichzeitig mit der Beobachtung der Wasseraufnahme auch bei parthenogenetischer Entwicklung den Schlüsse zu dem Problem künstlicher Erzeugung parthenogenetischer Entwicklung.

13. Die verschiedenartigsten äusseren Reize (chemische, thermische, elektrische, Lichtreize) können Parthenogenese hervorrufen. Dem Stadium des Reizes folgt ein Stadium der Erschlaffung, in welchem das die Entwicklung auslösende Wasser eintreten kann. Auch directer Zusatz von Wasser derart, dass man die Eier

eine Minute in destillirtem Wasser quellen lässt, löst parthenogenetische Entwicklung aus.

14. Die besten Resultate erhielt ich durch Anwendung von Essigsäure, 1 bis 2 Tropfen auf 200 g Seewasser, bei 40 Minuten langer Einwirkung.

Auch NaHCO_3 bewirkte parthenogenetische Entwicklung.

15. Besonders interessant war die grosse Reizbarkeit und Wandelbarkeit der NaHCO_3 -Larven, die einen neuen Beweis für die Isomerie der Blastomeren gaben.

16. Wenn Eier, die eine Minute in destillirtem Wasser gequollen waren, nach Zusatz von Seewasser befruchtet wurden, so schien ausser dem Quellungswasser auch noch bei der Befruchtung Wasser eingetreten zu sein. Die Larven waren in diesem Falle bedeutend grösser als normale Larven.

17. Parthenogenetische Entwicklung bleibt häufig hinter der durch Befruchtung bewirkten in der Zeit zurück, weil das Erschlaffungsstadium, in dem die parthenogenetisch sich entwickelnden Eier Wasser aufnehmen, erst nach 6 bis 8 Stunden eintritt.

18. Die Gastrulation wird bei den untersuchten Echinodermen-Eiern nicht durch Einstülpung, sondern durch Spaltung von Zellaggregaten bewirkt.

Zum Schluss möchte ich dem Königlich Preuss. Cultusministerium für die zweimalige gütige Gewährung eines Arbeitsplatzes in Neapel, sowie Herrn Geheimrath Dohrn und den anderen Herren der Station für ihre freundliche Unterstützung meinen ergebensten Dank aussprechen.

Literaturverzeichnis.

- Boveri, Zellenstudien über das Verhalten der chromatischen Kernsubstanz u. s. w. Jen. Zeitschr. Bd. 24. 1890.
- Boveri, Ueber die Polarisation der Seeigeleier. Verhandlung der physiol.-med. Gesellsch. Würzburg Bd. 34 S. 155.
- Boveri, Zur Physiologie der Kern- und Zellsubstanzen. Verh. der physiol.-med. Gesellsch. 1897.
- Boveri, Ein geschlechtlich erzeugter Organismus ohne mütterliche Eigenschaften. Sitzungsber. für Morph. u. Physiol. München Bd. 5.
- Boveri, Ueber die Befruchtungs- und Entwicklungsfähigkeit kernloser Seeigeleier. Arch. Entw.-M. Bd. 2 S. 394.

- Buller, A. H. R., *Quart. Journ. of Microsc. Sc.* 1902, vol. XLVI, p. 145.
- Cohnheim, O., *Versuche über Resorption, Verdauung und Stoffwechsel von Echinodermen.* *Zeitschr. für physiol. Chemie* Bd. 23 S. 13. 1901.
- Cremer, M., *Ueber die Einwirkung von Forellensamenpresssaft auf Forelleneier.* *Sitzungsber. der Gesellsch. für Morph. u. Physiol. München* Bd. 16 S. 3. 1900.
- Delage, Y., *Etudes sur la Mérogonie.* *Arch. zool. exp. t. 3 (7)* p. 408.
- Delage, Y., *Einfluss der Kohlensäure auf die Parthenogenese.* *Centralbl. für Physiol.* 1902.
- Delage, Y., *Sur l'interprétation de la fécondation mérogonique.* *Arch. zool. exp. t. 3 (7)* p. 130.
- Driesch, *Ueber rein mütterl. Charakt. an Bastardlarven.* *Arch. f. Entwickl.-M.* Bd. 7 S. 65.
- Driesch, *Die isolirten Blastomeren des Echinidenkeimes.* *Arch. f. Entwickl.-M.* Bd. 10 S. 361.
- Driesch, *Entwickl.-mechanische Stud. III—VI.* *Zeitschr. f. wiss. Zool.* Bd. 55.
- v. Dungern, Frh., *Neue Beobachtungen zur Physiologie der Befruchtung.* *Centralbl. f. Physiol.* 1901.
- Engelmann, *Ueber die Flimmerbewegung.* *Jen. Zeitschrift für Med. und Naturw.* Bd. 4.
- v. Fürth, *Vergleich. chem. Physiol. d. nied. Thiere.* Jena Fischer, 1903.
- Giard, *Développ. des œufs d'Echin.* 1900.
- Greiff, R., *Ueber d. Bau u. d. Entwickl. d. Echinod.* *Sitzungsber. d. Gesellsch. f. Bef. d. g. Naturw. Marburg* 1876.
- Herbst, C., *Ueber das Auseinandergehen von Furchungs- und Gewebe-Zellen in kalkfreiem Medium.* *Arch. f. Entw.-M.* Bd. 9 S. 424.
- Herbst, C., *Ueber die zur Entwickl. d. Seeigellarven nothwendigen anorganischen Stoffe. I. u. II. Theil.* *Arch. f. Entw. Mech.*
- Hertwig, O., *Die Zelle und ihre Gewebe.* Jena 1873.
- Hertwig, O., *Experiment. Stud. a. thier. Ei vor, während u. nach d. Befrucht.* *Jen. Zeitschr.* Bd. 24. 1890.
- Hertwig, O., *Experiment. Untersuch. über die Beding. der Bastardbefruchtung.* *Jen. Zeitschr.* 1886.
- Hertwig, O., *Ueber Bastardirungsversuche an Seeigeleiern.* *Sitzungsber.* Bd. 18 S. 33 1884. und Bd. 19 S. 72. 1885.
- Hertwig, R., *Ueber Befrucht. und Conjug.* *Verhandl. d. deutsch. zool. Ges.* 1892.
- Hertwig, R., *Ueber Centrosoma und Centralspindel.* *Sitzungsber. d. Gesellsch. f. Morph. u. Physiol. München* 1895.
- Hertwig, R., *Ueber die Entwicklung der unbefruchteten Seeigeleier, ebenda.*
- Hertwig, O. u. R., *Ueber die Befruchtung und Theilung des thierischen Eis unter dem Einfluss äusserer Agentien.* *Jen. Zeitschr.* Bd. 20 S. 504. 1887.
- Klebs, *Bedingung der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen.*
- Loeb, J., *Experiment. on artif. Parthenogen.* *Am. Journ. of Physiol.* vol. 4 p. 452. Jan. 1901.
- Loeb, J., *Further experiment on art. Parth.* 1900.
- Loeb, J., *On artif. Parth. in Sea-Urch.* 1900.

- Loeb, J., On the artific. Production of Norm. Larn. Amer. Journ. of Physiol. vol. 3. 1900.
- Loeb, Fischer, Neilson, Weitere Versuche über künstliche Parthenog. 1901.
- Matthews, Zur Chemie der Spermatozoen. Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 23 S. 399. 1897.
- Morgan, Experiment Stud. on Echinoderm-Eggs. Anat. Anzeig. Bd. 9.
- Morgan, The action of salt solutions. 1899.
- Morgan, Further studies on the action &c. 1900.
- Morgan, The production of artif. Astroph. 1899.
- Nagel, W., Das menschliche Ei. Arch. f. mikrosk. Anat. Bd. 31. 1888.
- Nathanson, A., Ueber Parthenogenesis b. Marsilia u. s. w. Bericht d. deutschen Bot. Gesellsch. 18 Jahrg. Bd. 28 S. 99.
- Pouchet und Chabcy, L'eau de mer artificielle comme moyen tétatogénique. Journ. del'anat. et de la physiol. t. 3 p. 298.
- Prowazek, Zell- und Kernstudien. Zool. Anzeig. Bd. 23 S. 305. 23. Mai 1900.
- Przibram, H., Experiment. Studien über Regeneration. Arch. f. Entw.-M. Bd. 14 S. 339. 1901.
- Przibram, H., Experimentelle Biologie der Echinodermen. H. G. Brown's Arch. f. Anat. u. Physiol. 1902.
- Przibram, H., Classen und Ordnungen des Thierreiches. Leipzig, Winter.
- Rawitz, Versuche über Ephebogenesis. Arch. f. Entwickl.-M. Bd. 6. 1901.
- Roux, W., Gesammelte Abhandlungen über Entwicklungsmechanik der Organismen. 1895.
- Schücking, A., Ueber veränderliche osmotische Eigenschaften der Membranen von Seethieren. Arch. f. Anat. u. Phys. 1902. Suppl.
- Schücking, A., Eine neue mikrochemische Bestimmung von Haloïdsalzen. Centrabl. f. inn. Med. 1902, Nr. 24.
- v. Uexküll, Studien über Echiniden. Zeitschr. f. Biol. 1904.
- Varigny, H. de, Beitrag zum Studium des Einflusses des süßen Wassers auf die Seethiere. Centrabl. f. Physiol. Bd. 1. 1888.
- Vernon, The relation between the hybrida Parentforms and Cross Fertilization among Echinoids. Philosoph. trans. vol. 190 p. 465 u. Arch. f. Entw.-M. Bd. 9 S. 464.
- Wilson, E. B., The cell in Development and Inheritance. 2nd ed. 1902.
- Winkler, H., Ueber die Furchung unbefruchteter Eier unter der Einwirkung von Extractivstoffen aus dem Sperma. A. d. Nachr. d. k. Gesellsch. d. Wissensch. z. Göttingen, math.-physiol. Cl. 1900 H. 2.
- Ziegler, Exper. Studien über Zelltheilung. Arch. f. Entwickl.-M. Bd. 6 S. 275.

Bezüglich der benutzten Literatur über Sperma verweise ich auf die Literaturübersichten von W. Waldeyer in O. Hertwig's Handbuch der vergleichenden und experimentellen Entwicklungslehre der Wirbelthiere, sowie auf die Arbeiten von Field, Wilson und Matthews, Ballowitz, Jensen, v. Bardeleben, Retzius, Miescher, v. Koellicker. Einige erst kürzlich erschienene Arbeiten sind im Text angeführt.

Figurenverzeichniss.

- Fig. 1. Interlamelläre Spaltung beim Asteriasei.
Fig. 2. Protoplasmafäden beim Eindringen von dest. Wasser sichtbar geworden.
Fig. 3. Erschlaffungszustand eines Eies, das 40 Minuten in angesäuertem Seewasser, dann 8 Stunden in gewöhnlichem Seewasser gelegen, hierauf in dest. Wasser gebracht wurde.
Fig. 4. Strongylocentrotus-Ei vor der Befruchtung.
Fig. 5. Dasselbe Ei eine Minute später nach Befruchtung.
Fig. 6. Befruchtung eines Strongylocentrotus-Eies. Hyalinarzapfen unter dem Einfluss des vorderen Centrosoms entstanden.
Fig. 7. Derselbe Vorgang bei *Ascaris megalocephala bivalens* (nach O. Hertwig).
Fig. 8. Spermium v. *Perca fluviatilis*.
Fig. 9 und 10. Spermium v. *Zoarces viviparus*.
Fig. 11. Spermium v. *Cavia cobaya*.
Fig. 12. Spermium v. *Metachirus quica* (nach Karl M. Fürst).
Fig. 13. Spermium v. *Homo sapiens*.
Fig. 14. Spermium v. *Homo sapiens*.
Fig. 15. Spermium v. *Asterias glacialis*.
Fig. 15 a. Spermium v. *Ascaris megalocephala*. Die Anheftung des Eies erfolgt mit der Basis des Kegels.
Fig. 16—28. Na_2CO_3 -Larven von *Asterias gl.* Hiervon sind Uebergänge einer und derselben Larve Fig. 16—18, 19—20, 21—25, 26—28.
Fig. 29. Normale Blastula von *Asterias*.
Fig. 30. Durch „Verreiben“ mit Spermaköpfen entstandene Blastula von *Asterias*.
Die Figuren von 16—30 incl. konnten nur schematisch wiedergegeben werden.
-