

Zur Entwicklungsgeschichte der Echinodermen.

- I. Zur Mechanik der Zellteilung.
- II. Versuche mit vitaler Färbung.

Von

Alfred Fischel.

(Mit Unterstützung der Gesellschaft zur Förderung deutscher Wissenschaft,
Kunst und Literatur in Böhmen.)

Mit 10 Figuren im Text.

Eingegangen am 23. Juli 1906.

Unter dem obigen allgemeinen Titel soll hier eine Reihe von Beobachtungen mitgeteilt werden, die ich zu Ostern 1906 an der zoologischen Station in Villefranche s. m. an den Eiern und Samenzellen von *Arbacia pustulosa*, *Echinus brevispinosus* (s. *Sphaerechinus granularis*) und *Strongylocentrotus lividus* anstellen konnte.

Sie betreffen eigenartige Veränderungen der Samenzellen nach chemischen oder physikalischen Einwirkungen; die Darstellbarkeit und das Schicksal granulaartiger Elemente im Echinodermenei; Art und Rolle des Pigmentes in Echinodermenkeimen, sowie endlich die Bedeutung von Ortsveränderungen der Granula und Pigmentkörnchen für die Erkenntnis der Mechanik der Zellteilung.

Diese verschiedenartigen Beobachtungen sollen im Nachfolgenden in zwei gesonderten Abschnitten näher erörtert werden, deren Titel nur als Hinweis auf jenes Moment gelten mag, das die jeweils besprochenen Tatsachen miteinander verknüpft.

I. Zur Mechanik der Zellteilung.

Mit Hilfe der vitalen Färbung lassen sich, wie ich vor einigen Jahren mitteilte¹⁾, in den Eiern von *Echinus microtuberculatus* Granula zur Anschauung bringen, die in einer bestimmten Beziehung zum

¹⁾ A. FISCHEL, Über vitale Färbung von Echinodermeneiern während ihrer Entwicklung. Anatom. Hefte. H. 37. 1899.

Kernteilungsvorgänge stehen. Die bis dahin gleichmäßig im Zelleib verteilten Körnchen rücken nämlich beim Beginne der Kernteilung an die Kernzone heran, führen deren Gestaltänderungen entsprechende Bewegungen aus, um sich nach vollzogener Zellteilung wiederum gleichmäßig im Zelleib der neu entstandenen beiden Tochterzellen zu zerstreuen.

Diese nur mit Hilfe der vitalen Färbung sichtbar werdenden Körnchen beweisen durch ihr eigenartiges Verhalten, daß die Zellteilung mit Änderungen der physikalischen Beschaffenheit der einzelnen Zonen des Zelleibes verknüpft ist. Im Sinne seiner Anschauungen über die Mechanik der Lebenserscheinungen der Zelle erklärt RHUMBLER¹⁾ diese Bewegungen als Folgen von Druckdifferenzen im Wabenwerk des Hyaloplasmagerüstes, wie sie durch Verdichtungscentren (Attraktionssphäre der Zellen) hervorgerufen werden.

Neue, in Villefranche s. m. ausgeführte Versuche lehrten mich, daß sich die gleiche Erscheinung in besonders deutlicher Weise auch an Eiern von *Echinus brevispinosus* feststellen läßt. Es ist wohl sehr wahrscheinlich, daß alle oder alle pigmentfreien Echinodermeneier derartige Granula besitzen.

Bei den erwähnten beiden Seeigelarten schufen wir uns durch die Färbung der Granula künstliche Marken zur Ersichtlichmachung der Veränderungen im Protoplasma. Die Frage liegt nahe, ob nicht auch die natürlich gefärbten Granula, welche gewisse Seeigeleier in Gestalt von Pigmentkörnchen in sich bergen, dieselben Bewegungen ausführen und uns so, ohne Kunsthilfe, jene Konsistenzänderungen im Protoplasma zur Anschauung bringen.

Ich habe die Furchung zweier pigmentierter Eiarten daraufhin untersucht, nämlich die Eier von *Strongylocentrotus lividus* und *Arbacia pustulosa*.

Von dem ersterwähnten Ei ist es durch SELENKA²⁾ und genauer durch BOVERI³⁾ bekannt geworden, daß es Pigment, und zwar in einer ganz bestimmten Zone enthält. Eben dieses Gebundensein des Pigmentes an eine bestimmte Eizone ist wohl die Ursache, daß während der

¹⁾ L. RHUMBLER, Physikalische Analyse der Lebenserscheinungen der Zelle. II. Mechanik der Abrückung von Zelleinlagerungen aus Verdichtungscentren der Zelle (im Anschluß an FISCHELS Vitalfärbungen von Echinodermeneiern und BÜTSCHLIS Gelatinespindeln erläutert). Arch. f. Entw.-Mech. 9. 1899.

²⁾ Nach GARBOWSKI, Über die Polarität des Seeigeleies. Bullet. de l'acad. des scienc. de Cracovie. 1905. Nach ihm soll man auch statt *Strongylocentrotus* — *Paracentrotus lividus* (Lmk.) schreiben.

³⁾ TH. BOVERI, Die Polarität von Ovocyte, Ei und Larve von *Strongylocentrotus lividus*. Zoolog. Jahrb., Abt. f. Anat. u. Ontog. 14. 1901.

ersten Furchungsteilungen keine den geschilderten Bewegungen der Farbgranula analogen Stellungsänderungen der Pigmentkörnchen nachweisbar sind. Das Pigment wird später auf ganz bestimmte Blastomeren verteilt. Wenn man diese genauer untersucht, so zeigt es sich wohl, daß die Pigmentkörnchen im Ruhezustande der Zellen gleichmäßiger im Zelleib verteilt sind, doch eine Konzentration derselben um den Kern zurzeit seiner Teilung läßt sich nicht deutlich nachweisen.

Sehr reich an Pigment ist das Ei von *Arbacia pustulosa*. Es erscheint infolgedessen rotbraun gefärbt, allerdings in verschiedener Stärke. Diese reiche Einlagerung von Pigmentkörnchen ist für die Untersuchung sehr ungünstig.

In dem ruhenden *Arbacia*-Ei ist das Pigment zwar im ganzen Zelleib abgelagert, doch nicht überall gleichmäßig verteilt, insofern, als sich an der Peripherie und unmittelbar um die Kernzone mehr Körnchen vorfinden als in der Zwischenregion; die Rinde des Eies enthält am meisten Pigment.

Im Verlaufe der Furchung lassen sich nun Bewegungserscheinungen der Pigmentkörnchen, ähnlich denen der vital gefärbten Granula, nachweisen. Allerdings kann man sie nicht bei jedem Ei und nicht mit gleicher Deutlichkeit wahrnehmen; nicht bloß aus dem Grunde, weil eine entsprechende Untersuchung der reich pigmentierten Eier Schwierigkeiten bereitet, sondern auch deshalb, weil diese Bewegungen nicht bei allen Eiern in gleich ausgiebiger Weise erfolgen, ja bei vielen vielleicht überhaupt nicht stattfinden. In einzelnen Fällen lassen sich jedoch die nachfolgend geschilderten Bewegungserscheinungen mit aller Schärfe wahrnehmen.

Schon beim Durchschneiden der ersten Furche bildet sich wiederholt neben ihr ein dunkler Pigmentstreifen aus, dem ein zweiter, peripherischer entpricht; die mittlere, die Tochterkerne bergende Zone erscheint sehr hell, da sie jetzt nur wenige Pigmentkörnchen enthält. Diese Erscheinungen gehen jedoch bei der ersten Furchungsteilung sehr rasch vorüber, alsbald breitet sich das Pigment ziemlich gleichmäßig im Zelleib der neu entstandenen ersten zwei Blastomeren aus. Während der Furchungsteilungen zeichnet sich die Rinde der Blastomeren ganz besonders durch ihre dunkle Farbe aus. Schneiden die Furchen durch, so erscheinen die sie begrenzenden Ränder dunkelbraun bis tiefschwarz; an den einander zugekehrten Flächen der neu entstandenen Blastomeren findet offenbar die stärkste Konzentration von Pigment statt.

Sehr bedeutend sind die Breitenänderungen des Spaltes zwischen den neu entstehenden Blastomeren. Diese weichen nämlich nach beendeter Furchungsteilung stets weit auseinander, um sich später wieder, fast bis zur direkten Berührung zu nähern. Zwei dieser Stadien der ersten Furche sind in den beistehenden Figuren wiedergegeben. — Während der Annäherung der Blastomeren bildet sich an einer Stelle ihrer einander zugekehrten Flächen öfters eine starke

Fig. 1.

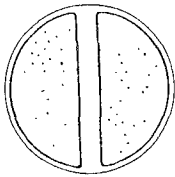
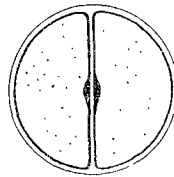


Fig. 2.



Pigmentanhäufung aus (Fig. 2), die später wieder verschwinden kann. Von dieser Stelle aus schneidet später die zweite Furche ein. —

Sehr deutlich sind die Bewegungen der Pigmentkörnchen während der zweiten Furchungsteilung wahrzunehmen. In einiger Entfernung von der ersten Furche bildet sich in den beiden ersten Blastomeren ein breiter, dunkler Pigmentstreifen aus, der parallel zur ersten Furche zieht (Fig. 3). Senkrecht zu ihm verläuft ein zweiter, ganz schmaler

Fig. 3.

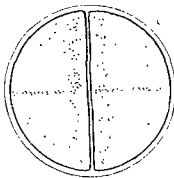
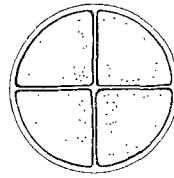


Fig. 4.

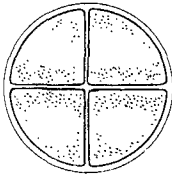


Pigmentstreifen, durch welchen alsbald die zweite Furche einschneidet, so daß das in Fig. 4 wiedergegebene Bild resultiert. Es ist wohl zu beachten, daß dieser Streif nicht durch die ganze Breite der Blastomeren hindurchzieht; in der Region der Kerne ist er vielmehr durchbrochen; die gezeichneten Bilder entsprechen also der Einstellung auf die Peripherie der Blastomeren.

Bald nach vollzogener Vierteilung des Eies wird nun die Anordnung der Pigmentstreifen geändert. Die der ersten Furche parallel verlaufenden Pigmentstreifen hellen sich zunächst in ihrer Mitte auf (Fig. 5); von ihrem centralen und peripherischen Ende aus fließen die

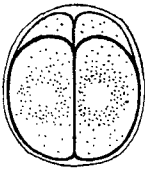
Pigmentkörnchen in die Peripherie und in die der zweiten Furche benachbarte Region der vier Blastomeren. So entsteht jetzt ein breiter Pigmentstreif, der parallel zur zweiten Furche hinzieht, ein schmaler Pigmentring an der Außenfläche und ein dichter Pigmenthaufen an einer Kuppe jeder Blastomere (Fig. 5). Man erkennt leicht, daß bei dieser Anordnung die Kernzonen von den Pigmentkörnchen umhüllt werden, während die peripherischen Teile der Blastomeren nur sehr wenige Pigmentkörnchen enthalten. Die Konzentration des Pigmentes

Fig. 5.



um den Kern kann jedoch in einzelnen Fällen einen bedeutenderen Grad erreichen als in Fig. 5; es ist das besonders deutlich bei Betrachtung der Blastomeren von der Seite her zu erkennen. Ein solches Bild ist beistehend (Fig. 6) wiedergegeben. Jeder Kern ist von einem dunklen Pigmentkörnchenhofe umgeben, um den sich nur relativ wenige Pigmentkörner im Zelleib verteilt finden. Dieses, bei *Arbacia* sehr rasch vorübergehende und einem Zustande der fast gleichmäßigen Verteilung des Pigmentes im Zellkörper Platz machende Stadium entspricht nahezu völlig einem Bilde, das man bei pigmentfreien Echinodermeneiern mit Hilfe der Granulafärbung ersichtlich machen kann (vgl. die Fig. 2, 7 u. 12 meiner oben zitierten Arbeit). Im übrigen aber entsprechen die Bewegungen der Körnchen nicht völlig denen der vital gefärbten Granula, wie aus einem Vergleiche der diesem

Fig. 6.



Aufsätze beigegebenen Figuren mit jenen meiner früheren Arbeit hervorgeht. Für die Pigmentgranula des *Arbacia*-Eies ist insbesondere der in Fig. 3 und 4 sichtbare Pigmentstreif neben den Furchen charakteristisch. Er ist auch in späteren Furchungsstadien sehr deutlich sichtbar und liefert bei ihnen allein Zeugnis von den Pigmentverschiebungen, da die übrigen Unterschiede in der Pigmentverteilung oft zu gering sind, um deutlich in die Erscheinung zu treten. Man erhält dann in diesen späten Stadien ein eigenartiges Bild: In einer bestimmten Furchungsphase enthält jede Zelle in der Nähe der Teilungsebene einen breiten Streifen dunklen Pigmentes, während in dem restlichen Teile des Zellkörpers unregelmäßig verteilte Pigmentkörnchen liegen.

Trotz des erwähnten Unterschiedes des Verhaltens des *Echinus*- und des *Arbacia*-Eies wird wohl die Ursache der Ortsveränderung der vital färbbaren Granula und der Pigmentkörnchen dieselbe sein. Stehen

doch auch beide mit dem Zellteilungsvorgange in innigster Verknüpfung. Wir können in diesen Bewegungen der Granula und des Pigmentes den sichtbaren Ausdruck von während der Zellteilung sich ausbildenden Druckdifferenzen im Zelleib erblicken; diese bedingen es, daß die in der Zelle eingeschlossenen Körnchen aus den Gegenden höheren Druckes fortrücken, wenn sie in ihnen nicht durch besondere Adhäsionskräfte festgehalten werden. Ganz analoge Erscheinungen kann man auch in Amphibieneiern beim Eindringen der Samenzelle und während ihrer Furchung nachweisen. RHUMBLER¹⁾ hat bereits auf sie hingewiesen und sie in dem obigen Sinne gedeutet.

Wie die vital färbbaren Granula im *Echinus*-Ei eine künstliche, liefern uns also die Pigmentkörner im *Arbacia*-Ei eine natürliche Marke für das Erkennen der im Zelleib sich ausbildenden Druckdifferenzen. Mit Hilfe dieser Marken wird man die Ausbildung solcher Druckdifferenzen auch bei andern Objekten ermitteln können. Selbst an Schnittbildern fixierter Objekte wird dies unter Umständen möglich sein. So bildet KOSTANECKI²⁾ in seinen Fig. 77—80 Stadien der Eiteilung von *Maetra* (Mollusce) ab, die beweisen (insbesondere Fig. 80), daß auch bei diesem Objekte eine Körnchenbewegung stattfindet, die im Prinzip der hier vom Echinodermenei beschriebenen analog ist. Da zwei so differente Eiarten das gleiche Phänomen aufweisen, so ist wohl die Vermutung nicht unberechtigt, daß hier eine allgemein vorkommende Erscheinung vorliegt, d. h. also, daß es bei der Zellteilung infolge von im Zelleibe entstehenden Druckdifferenzen zu Ortsveränderungen der in der Zelle abgelagerten Körnchen kommt. Die Art dieser Ortsveränderungen wird, wie schon aus dem verschiedenen Verhalten der hier besprochenen Fälle hervorgeht, bei den verschiedenen Eiarten und Zellen eine verschiedene, die Orte der Körnchenanhäufung werden also nicht überall die gleichen sein. Wie die Art wird auch der Grad³⁾ der bei der Zellteilung sich ausbildenden Druckdifferenzen bei verschiedenen Zellarten ein sehr verschiedener sein. —

¹⁾ L. RHUMBLER, Physikalische Analyse von Lebenserscheinungen der Zelle. III. Mechanik der Pigmentzusammenhäufungen in den Embryonalzellen der Amphibieneier. Arch. f. Entw.-Mech. 9. 1899.

²⁾ K. KOSTANECKI, Cytologische Studien an künstlich sich entwickelnden Eiern von *Maetra*. Arch. f. mikrosk. Anat. 64. 1904.

³⁾ Letzterer kann auch bei derselben Zellart — so bei *Arbacia*-Eiern — variieren und daher die Deutlichkeit der Körnchenbewegung beeinflussen.

Eigenartig ist beim *Arbacia*-Ei auch das Verhalten seiner Rindenschicht. Während der Teilungen erscheint sie breit und dunkel pigmentiert, nach beendeter Teilung dagegen ist sie in den einzelnen Blastomeren schmal und von hellerem Farbentone. Es muß also auch hier zu einer, und zwar hochgradigen Pigmentkonzentration kommen, die am mächtigsten an den Teilungsflächen der Blastomeren hervortritt. —

Bei der vierten Furchungsteilung werden an dem einen Pole des Echinodermeneies kleine Zellen, die sog. Mikromeren, abgegliedert. Beim *Arbacia*-Ei enthalten sie, im Gegensatz zu den übrigen Furchungszellen, nur wenige Pigmentkörnchen. Ihre Entstehung ist mit einer bedeutenden Verschiebung des Pigmentes verknüpft. Betrachtet man in diesem Stadium den Mikromerenpol des Eies, so sieht man, wie

Fig. 7.

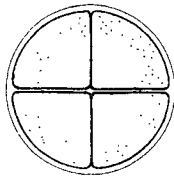
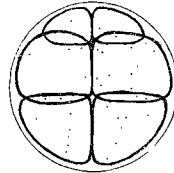


Fig. 8.



die Pigmentkörnchen von diesem Pole abrücken, bis das in Fig. 7 dargestellte Bild entsteht. Die so entstandenen, im Gegensatz zu dem übrigen Teile der Blastomeren nahezu pigmentfreien Zellkuppen werden hierauf abgeschnürt und stellen die Mikromeren dar; ihr Pigmentmangel gegenüber den übrigen Blastomeren tritt am besten bei Betrachtung des Keimes von der Seite her (Fig. 8) zutage.

Während also bei den zur Entstehung gleich großer Tochterzellen führenden Zellteilungen die Pigmentverschiebungen in der Weise erfolgen, daß jede der neu entstandenen Zellen die gleiche Menge Pigmentes erhält, werden den Mikromeren nur wenige Pigmentkörnchen zugeteilt. Die bei der Entstehung der Mikromeren sich ausbildenden Druckdifferenzen sind also lokal und graduell anders als jene der übrigen Furchungsteilungen. Die Zonen, an welchen die Mikromeren sich bilden, stellen, nach der früher erwähnten Annahme, die Orte maximalen Druckes in den Mutterzellen der Mikromeren dar, während der Druck in den übrigen Teilen dieser Mutterzellen ein relativ sehr geringer ist, weshalb auch die Pigmentkörnchen in sie abströmen. Die Bildung der Mikromeren ist also begleitet, wohl auch wesentlich verursacht durch hochgradige, zwischen ungleich

großen Abschnitten des Zelleibes sich ausbildende Druckdifferenzen¹⁾; wir können hieraus schließen; daß inäquale Teilungen, im Gegensatz zu den äqualen, durch diese Art von Druckdifferenzen charakterisiert sind.

Was das Schicksal der Pigmentkörnchen während der späteren Entwicklung des *Arbacia*-Eies betrifft, so ist hervorzuheben, daß eine Vermehrung derselben nicht stattfindet. Das Eipigment wird durch die Furchung auf die einzelnen Blastomeren verteilt und hierdurch eine Aufhellung des Keimes verursacht. Diese Aufhellung ist schon im Vierzellenstadium augenfällig, schon da lassen sich die einzelnen Regionen der Blastomeren viel besser mikroskopisch durchmustern als jene des ungeteilten Eies. In der Blastula finden sich die Pigmentkörnchen im freien (d. h. äußeren) Teile der Zellen, ihr innerer, der Blastulahöhle zugekehrter Teil erscheint hellgelb, pigmentfrei²⁾. Eine stärkere Anhäufung von Pigmentkörnchen tritt dann in der Region der Darminvaginationsstelle ein. Lebhaft gefärbt ist demgemäß auch die freie, der Darmhöhle zugekehrte Partie der Entodermzellen. Sehr wenige, oft nur ein bis zwei Pigmentkörnchen sind in den Mesenchymzellen abgelagert; sie sitzen zumeist an den Abgangsstellen der Fortsätze vom Zellkörper. — Durch die Aufteilung des Eipigmentes auf die einzelnen Zellen des Keimes erscheint dieser in den späten Stadien dem Ei gegenüber in so auffälliger Weise heller, fast pigmentlos, daß man sich der Vermutung nicht enthalten kann, es finde bei der Entwicklung nicht nur keine Vermehrung, sondern geradezu eine Verminderung des Pigmentes statt. Es ist in dieser Hinsicht besonders wichtig, daß man in späteren Stadien nicht allzu selten auf ganz albinotische Larven stößt, während man schwach pigmentierte Eier nur sehr selten findet; pigmentfreie Eier habe ich überhaupt niemals gefunden³⁾ und ich muß daher wenigstens für viele

1) Auf solche Druckdifferenzen ist vielleicht auch die sog. Ballung des Pigmentes bei Reizung der Pigmentzellen zurückzuführen. Der Reiz führt, so kann man sich vorstellen, dazu, daß in den Fortsätzen der Pigmentzelle ein höherer Druck entsteht. Infolgedessen wandern die Pigmentkörnchen aus den Fortsätzen gegen das Centrum der Zelle, um nach Ausgleich der Druckdifferenz wieder in die Fortsätze zurückzuströmen.

2) Bei Formolzusatz färben sich die Zellen, namentlich ihr innerer (basaler) Abschnitt, violett; die Pigmentkörnchen bleiben hierbei unverändert.

3) BOVERI fand einmal ein pigmentloses *Strongylocentrotus*-Ei; ich habe deren viele gesehen. Die Entwicklung verlief vollkommen normal. An der gleichen Eiart konnte GARBOWSKI normale Entwicklung trotz Verschiedenheit der Pigmentverhältnisse konstatieren. Diese Tatsachen, sowie das Vorkommen von

der albinotischen Larven die Rückbildung des Pigmentes während der Furchung für sehr wahrscheinlich halten. — Unabhängig von dem originären Pigment des Eies entwickelt sich später (etwa am dritten Tage) jenes der Chromatophoren. Diese Zellen können auch in Larven zur Ausbildung kommen, deren Ectodermzellen wenige oder keine Pigmentkörnchen enthalten; sie können auch — bei den albinotischen Keimen — gänzlich fehlen.

Auch beim *Strongylocentrotus*-Ei verhält sich das Pigment des Eies in der soeben geschilderten Weise: Es erfährt keine Vermehrung während der Entwicklung und steht zu dem der Chromatophoren in keiner direkten genetischen Beziehung. Daß es bei der Furchung bestimmten Blastomeren zugewiesen wird, hat bereits BOVERI näher geschildert. Seine Lagerstätte ist auch hier die freie Zellseite. — So reich pigmentierte Eier, wie sie BOVERI zeichnet, wird man allerdings wohl sehr selten auffinden können. Im Gastrulastadium erscheint der Keim so pigmentarm (ist übrigens in vielen Fällen direkt pigmentfrei, wie auch schon viele Eier), daß man auch hier den Eindruck erhält, als ob nicht bloß eine Verteilung des Eipigmentes auf viele Zellen, sondern direkt eine Verminderung desselben statthät.

Das Ei von *Echinus brevispinosus* ist pigmentfrei. Vom Gastrulastadium ab kann man aber in einzelnen Ectodermzellen, ganz unregelmäßig auf der Larvenoberfläche verteilt, gelblichrote Pigmentkörnchen in geringer Zahl nachweisen. Hier muß es also nachträglich zur Bildung von Pigment gekommen sein, der dann die Pigmentbildung in den Chromatophoren folgt.

Verschiebungen der Pigmentkörnchen habe ich in diesen späten Entwicklungsstadien nicht wahrnehmen können. Vielleicht deshalb nicht, weil die Zahl der Körnchen zu klein ist, oder die bei der Zellteilung sich ausbildenden Druckdifferenzen nicht so hochgradige sind, wie in den großen Zellen der ersten Furchungsstadien. Daß übrigens solche Verschiebungen auch in andersartigen und kleineren (oder pigmentreicheren) Zellen stattfinden, beweist die Beschreibung der Teilungsvorgänge an Pigmentzellen der Salamanderlarven von seiten ZIMMERMANN¹⁾ und der Ento- und Mesoblastzellen bei *Rana*-Embryonen von seiten NUSBAUMS²⁾.

Albinos bei *Arbacia*, beweisen, daß das Pigment der Echinodermencier keinen der morphogenetischen Stoffe des Eies darstellt.

¹⁾ K. W. ZIMMERMANN, Über die Teilung der Pigmentzellen, speziell der verästelten intraepithelialen. Arch. f. mikrosk. Anat. 36. 1890.

²⁾ J. NUSBAUM, Über die Verteilung der Pigmentkörnchen bei der Karyokinese. Anatom. Anz. 8. 1893.

II. Versuche mit vitaler Färbung.

Dem bereits in meiner früheren Arbeit (1899) verfolgten Ziele: Mit Hilfe der Vitalfärbung verschiedenartige Granula im Ei zu ermitteln und ihre Aufteilung im Larvenkörper zu verfolgen, waren neuerliche Versuche gewidmet. Außer dem schon früher mit Erfolg verwendeten Neutralrot, wurden hierzu zwei Farbstoffe, die sich bei Versuchen an Amphibienlarven¹⁾ sehr bewährt hatten, benutzt, nämlich Nilblausulfat und Nilblausulfatchlorhydrat.

Die mit Neutralrot gefärbten *Arbacia*-Eier lassen infolge ihres reichen Pigmentgehaltes, die Art der Granulafärbung nur undeutlich erkennen. Erst in späten Furchungsstadien und an der Blastula ist infolge der stattgefundenen Aufhellung des Keimes der Färbungseffekt sicher erkennbar. In den Blastulazellen erscheint dann nur die Kernzone ungefärbt, weil ja bei der vitalen Färbung kein Farbstoff vom Kerne aufgenommen wird. Der Zelleib dagegen erweist sich als diffus zartrot gefärbt und die in der äußeren Zellpartie gelegenen Pigmentkörner erscheinen auf diesem Hintergrunde dunkelrot. Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man im äußeren Zellabschnitt, daß die Färbung des Zelleibes durch Granula verursacht wird, die dicht nebeneinander liegen; sie haben den Farbstoff in sehr verschiedenem Grade an sich gezogen, einzelne sind überhaupt ungefärbt geblieben. Da sich dieses verschiedenartige Verhalten der Granula bei verschiedenen Kulturen und bei verschiedensten Färbungsintensitäten stets einstellt, ist zu vermuten, daß ihm eine qualitative Verschiedenheit der Granula entspricht. — Es ist übrigens, bei der Ungunst der Verhältnisse für eine mikroskopische Untersuchung des lebenden *Arbacia*-Keimes, nicht möglich, zu ermitteln, ob auch der der Blastulahöhle zugekehrte, also innere Abschnitt der Zellen Granula enthält, oder ob er, ähnlich wie bei *Sphaerechinus*, nur diffus gefärbt ist. — Am ungefärbten Keime ist es nicht möglich, die Granula zu sehen, sie treten erst durch die Vitalfärbung hervor. — Ebenso lassen sich später spärliche Granula in den Mesenchym- und Darmzellen erkennen.

Anders liegen die Verhältnisse bei den Zellen der *Strongylocentrotus*-Blastula. Hier liegen gleichfalls Granula in der äußeren Hälfte der Zellen, doch sind sie viel kleiner als die von *Arbacia*; diese Zellzone erscheint hier wie mit feinsten roten Körnchen bestäubt; der

¹⁾ A. FISCHIEL, Untersuchungen über vitale Färbung. Anatom. Hefte. H. 52/3 1901.

innere Zellabschnitt ist entweder überhaupt nicht, oder nur schwach, diffus, gefärbt. — Später treten auch in den Mesenchym- und in den Darmzellen Granula auf; in den ersteren finden sich nur wenige, oft nur ein bis zwei sehr kleine hellrote Körnchen, die zumeist an den Abgangsstellen der Fortsätze vom Zellkörper liegen. Die Darmzellen sind zumeist nur diffus gefärbt, einzelne enthalten auch feinste Granula. — Von besonderem Interesse aber ist das Verhalten der Pigmentzellen der Pluteuslarven. Während das aus der Eizelle stammende und allmählich auf die Keimzellen verteilte Pigment die vitalen Farbstoffe entweder überhaupt nicht, oder jedenfalls nicht in auffälligem Grade annimmt, zieht das erst sekundär im Keime entstandene Pigment der Chromatophoren sehr intensiv die Farbstoffe an sich, verändert infolgedessen seine (ursprünglich rötlichgelbe) Farbe, so daß diese Zellen, bei starker Tinktion, sogar tief blauschwarz erscheinen können. Färbt man die Larven nur ganz schwach und setzt sie dann in reines Seewasser, so werden die meisten Granula nach einiger Zeit farblos; die Pigmentkörner der Chromatophoren aber behalten den Farbstoff bei und erscheinen jetzt dunkelviolet, im Gegensatze zu dem lichten Gelbrot der übrigen, direkt von der Eizelle stammenden Pigmentkörnern. Diese Färbung der Chromatophoren hält an, sie werden sogar zumeist noch infolge Metachromasie des Farbstoffes dunkler, während alle andern Teile der Larven — bis auf den zartrosa gefärbt bleibenden Darm — den Farbstoff gänzlich abgegeben haben. Dieses Verhalten bekundet einen scharfen chemischen Unterschied zwischen den Pigmentkörnern der Chromatophoren einer- und den übrigen Pigment- und Zellgranulis andererseits. Solche Plutei gewähren ein ganz eigenartiges Bild: Aus dem Inneren des Larvenkörpers leuchtet der rötlich tingierte Darm hervor, während mehr nach außen hin die dunkelvioletten bis tief schwarzen Chromatophoren sich scharf von dem im übrigen ungefärbten Larvenkörper herausheben. —

Im Gegensatze zu den Blastulazellen von *Strongylocentrotus* nehmen diejenigen von *Echinus brevispinosus* gerade mit ihrer Innenpartie das Neutralrot begierig auf. Diese diffus gefärbte Zone reicht bis an den Kern, der selbst von einer Schicht feinsten rot gefärbter Granula umgeben ist, heran. In der äußeren (freien) Zellseite treten ziemlich regelmäßig gereichte, größere Neutralrotgranula zutage. — Bei den Pluteis enthalten die Mesenchymzellen entweder gar keine, oder nur sehr wenige Farbgranula; die Darmzellen besitzen solche in ihrer Außenzone. — Im Gegensatze zu den beiden andern Eiarten

nehmen die Pigmentkörnchen, die sich, unregelmäßig verstreut und in spärlicher Zahl, in den Ectodermzellen vorfinden, gleich denen der Chromatophoren, den Farbstoff an. Diese Pigmentkörner sind aber, wie diejenigen der Chromatophoren und im Gegensatze zu jenen der beiden andern Keimarten, erst sekundär im Keime entstanden, da ja das *Echinus*-Ei selbst nicht pigmentiert ist. — Während also die aus der Eizelle selbst stammenden Pigmentkörner vom Farbstoffe nicht beeinflußt werden, ziehen ihn die sekundär im Keime entstandenen an sich. Der genetischen Verschiedenheit entpricht offenbar auch eine chemische. —

Über die Natur der mit Neutralrot sichtbar werdenden Granula läßt sich zwar ein absolut sicheres Urteil nicht angeben. Bedenkt man aber, daß sie nicht nur in einer für jede Eiart spezifischen Weise ausgebildet sind und vor allem, daß sie auch bei wochenlanger ¹⁾ Beobachtung keinerlei erkennbare Veränderung aufweisen, so wird man wohl davon Abstand nehmen, sie für Zersetzungsprodukte, Excrete oder sonstige ihrem Vorkommen und ihrer Ausbildung nach variierende Bestandteile der Zellen zu halten. Ich bin vielmehr der Ansicht, daß in ihnen, wie auch noch in andern Granulaarten ²⁾, Gebilde von vitaler Bedeutung, Elementarorgane der Zelle, wenn auch keine Elementarorganismen im Sinne ALTMANN'S, vorliegen.

Bei den Echinodermen findet eine Vermehrung dieser Granula während der Eifurchung nicht, oder wenigstens nicht in erheblichem Grade statt; die in der Eizelle vorhandenen Granula werden nur auf die einzelnen Furchungszellen aufgeteilt. Später dagegen muß es zur Neubildung von Granulis kommen, da die Zahl der z. B. im Gastrulastadium vorhandenen Granula gewiß größer ist als jene in der Eizelle. —

Während, wie erwähnt, Nilblauschlorhydrat und Nilblausulfat bei Amphibienlarven gute Resultate lieferten, erwiesen sich diese beiden Farbstoffe Echinodermeneiern gegenüber als minder brauchbar. Beide Farben schädigen die Eier, allerdings in sehr verschiedener Weise.

Die Schädlichkeit des Nilblauschlorhydrates gibt sich nur in einer Verzögerung des Entwicklungsverlaufes zu erkennen, im übrigen aber können sich trotz dieser Färbung normale Plutei ent-

¹⁾ Ich habe gefärbte Larven bis zum 17. Tage beobachtet. Seeigellarven entwickeln sich bekanntlich im Aquariumwasser nach Erreichung eines gewissen Stadiums nicht weiter.

²⁾ Man vergleiche hierüber meine oben zitierte Arbeit aus dem Jahre 1901, S. 487 u. f.

wickeln. Legt man *Strongylocentrotus*-Eier sofort nach erfolgter Befruchtung in eine schwache Lösung des Farbstoffes, so treten um den Kern — und nur um ihn herum — kleine Granula in geringer Zahl auf. Diese blauen Granula umgeben auch die Kerne der Blastulazellen, finden sich aber in größerer Zahl nur an dem vegetativen Pole der Blastula vor. Im Pluteusstadium besitzen alle Zellen solche Granula, aber in ungleich geringerer Anzahl als bei Neutralrot. Sie liegen in den Ectodermzellen in deren äußerer, in den Entodermzellen in deren innerer Zone. Auch ist eine diffuse Färbung des ganzen Keimes vorhanden. Die chemische Besonderheit der Pigmentkörner der Chromatophoren gibt sich auch hier zu erkennen: Sie haben den Farbstoff gierig an sich gezogen, und erscheinen jetzt schwarz gefärbt. — Ähnlich sind die Verhältnisse bei *Sphaerechinus granularis*. Die innere Zone der vegetativen Zellen der Blastula ist bei diesen Keimen diffus blau gefärbt.

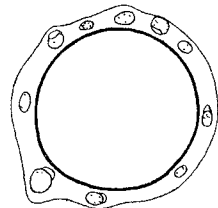
Verglichen mit den Neutralrotgranulis unterscheiden sich die mit Nilblausulfat darstellbaren Granula nach Zahl und Anordnung sehr wesentlich und stellen daher eine andre Granulaart dar. —

Während das Nilblausulfat den Entwicklungsgang der Seeigeleier nur verlangsamt, findet in Lösungen von Nilblausulfat überhaupt keine Weiterentwicklung statt. Befruchtete oder schon in Furchung begriffene Eier sinken, in diese Lösung gebracht, auf den Boden der Glasgefäße nieder, legen sich dicht an denselben an, so daß man sie nur mit Gewalt von ihm abheben kann. Kommen sie nahe aneinander zu liegen, so verkleben sie miteinander. Die alsbald eintretende Trübung der Eier zeigt ihr Absterben an. Sie können sich hierbei diffus schwach blau färben.

Sehr interessant ist nun, daß alsbald nach erfolgtem Einlegen der Eier in die Lösung die Eimembran ihr Verhalten den Samenzellen gegenüber ändert. Normalerweise dringt bekanntlich, nach Eindringen der befruchtenden Spermie in das Ei, keine weitere Samenzelle durch die vom Ei abgehobene Membran mehr ein. Nach Einwirkung von Nilblausulfat dagegen passieren alsbald zahlreiche Samenzellen die Membran, um zwischen ihr und dem Ei — in das keine weitere Spermie eindringt — liegen zu bleiben. Sowohl die Membran, wie auch die Samenzellen erfahren hierbei tiefgreifende Veränderungen. Die erstere wird, im Gegensatze zur Norm, in ganz unregelmäßiger Weise vom Ei abgehoben, ihr Kontur verläuft stellenweise wellenförmig um das Ei; in den Wellentälern liegen die besonders hochgradig veränderten Spermien (Fig. 9). — Kopf und Mittel-

stück der durch die Membran getretenen Spermien sind in abnormer Weise gequollen, so daß diese Zellen jetzt als ungewöhnlich große Körper erscheinen, die aber als veränderte Spermien teils durch die Art ihrer Bestandteile, teils durch die Übergangsformen zwischen ihnen und normalen Samenzellen zu diagnostizieren sind. Jedes der zwischen Ei und Eimembran gelegenen Elemente setzt sich nämlich aus einem größeren, unregelmäßig geformten bei *Strongylocentrotus* (Fig. 9) stärker als bei *Echinus* granulierten und einem kleineren, ovalen, stark lichtbrechenden, nicht granulierten Gebilde zusammen; das erstere ist der Kopf, das letztere das Mittelstück der Spermie. In der beistehenden Figur erkennt man diese beiden Elemente ganz deutlich nur an jenen Spermien, welche dem Beobachter in entsprechender Weise zugewendet waren; an einzelnen Spermien ist nur der Kopf sichtbar. Bei der gewählten Vergrößerung (180/1) würden die normalen Spermien als kaum sichtbare Pünktchen zu zeichnen sein.

Fig. 9.



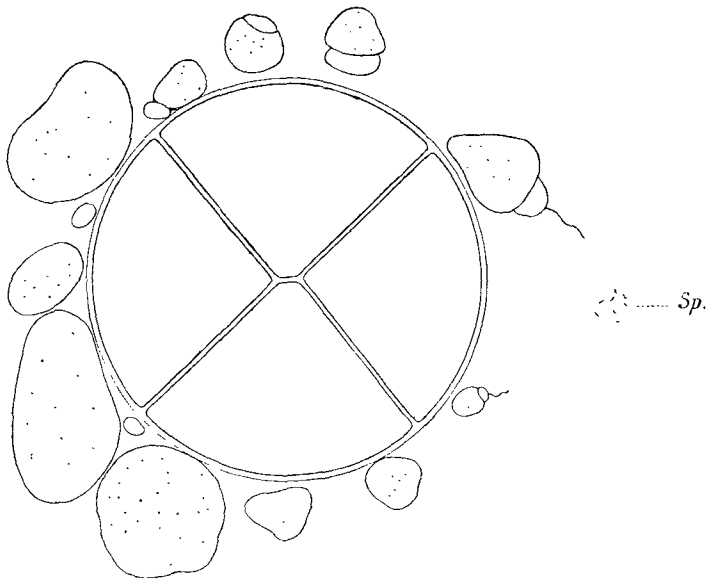
Die geschilderten Veränderungen der Eier und ihrer Membran, sowie das Durchlässigwerden der letzteren sind dem Nilblausulfat zuzuschreibende Wirkungen. Die Veränderungen der Spermien sind es nur indirekt; sie erfolgen erst nach dem Eindringen der Samenzellen unter die Eimembran, offenbar durch den Einfluß der hier vorhandenen Flüssigkeit.

Eine dem Wesen nach analoge, dem Grade nach aber erheblich bedeutendere Veränderung der Samenzellen konnte ich nun auch bei *Arbacia*, ohne Einwirkung eines fremden Agens, beobachten. Beim ersten Blick auf die umstehende Fig. 10 wird man die großen, ganz unregelmäßig gestalteten Gebilde, die um das in vier Zellen geteilte Ei liegen, gewiß nicht für Samenzellen halten, besonders wenn man die bei gleicher¹⁾ Vergrößerung (etwa 400/1) gezeichneten, in einiger Entfernung vom Ei liegenden, normalen Spermien (*Sp*) mit ihnen vergleicht. Betrachtet man aber einige dieser Gebilde näher, so kann man an ihnen sehr deutlich die eine Samenzelle charakterisierenden Bestandteile: Kopf, Mittelstück und Schwanz erkennen (in der Figur rechts). Bei entsprechender Einstellung kann man auch

¹⁾ In Wirklichkeit erscheinen diese Spermien noch etwas kleiner als in der Figur; sie wurden absichtlich ein wenig größer gezeichnet, da es sonst nicht möglich gewesen wäre, ihr charakteristisches Aussehen wiederzugeben.

an den übrigen, zum mindesten die beiden ersterwähnten Bestandteile nachweisen. Wie im früheren Falle, so erscheint auch hier der Kopf granuliert, das Mittelstück hellglänzend; gewöhnlich ist auch im Kopfe ein centraler, granulafreier, stärker lichtbrechender Abschnitt vorhanden. Diese Gebilde stellen also, trotz ihres verschiedenen Aussehens, sämtlich Spermien dar, die, wie ein Vergleich mit den unveränderten ergibt, geradezu ins Ungeheuerliche vergrößert sind, wobei namentlich ihr Kopfteil die bizarrsten Formen annimmt. Es gewährt einen eigenartigen Anblick, wie diese dicht aneinander

Fig. 10.



gepreßten, riesigen und formlosen Spermien überall das Ei umgeben (in der Figur ist nur ein kleiner Teil dieser Gebilde des betreffenden Präparates gezeichnet worden, um die Verhältnisse klarer darzustellen). An einzelnen Stellen sind sie miteinander zu unförmlichen Gebilden verschmolzen.

Es ist nun wohl zu beachten, daß sich derart veränderte Spermien nur in unmittelbarer Nachbarschaft der Eier vorfinden, während die von ihm entfernteren, wie in der Figur, unverändert bleiben. Es ist mir nicht möglich gewesen, die Ursache dieser Formveränderung der Spermien zu ermitteln. Die erste Beobachtung war eine zufällige: Normal befruchtete *Arbacia*-Eier befanden sich durch längere Zeit unter dem Deckglase auf einem Objektträger, ohne daß rechtzeitig Wasser

zugesetzt wurde; zwar befand sich im Momente der Beobachtung noch genügend Wasser unter dem Deckglase, doch mußte immerhin schon ein erheblicher Teil abgedunstet sein. In der Tat gelang es auch später einige Male — aber nicht immer — durch Wasserverlust die gleiche Erscheinung hervorzurufen. Die Deformation der Samenzellen hängt also wohl irgendwie mit diesem Wasserverluste zusammen. — Möglicherweise erklärt sich die Erscheinung damit, daß in die unmittelbar dem Ei anliegenden Samenzellen — und nur diese werden ja deformiert — eine aus dem Ei stammende Flüssigkeit dringt, die die kolossale Aufquellung derselben verursacht, ebenso wie die bei Nilblausulfatwirkung zwischen Eimembran und Ei eingedrungenen Samenzellen in der sie jetzt umgebenden Flüssigkeit eine Aufquellung erfahren. — Denkbar ist es auch, daß durch die obigen Versuchsbedingungen bloß eine Veränderung zu sichtbarem Ausdrucke gelangt, welche auch normalerweise jene Spermien erfahren, welche dem Ei unmittelbar anliegen. —

Die auffällige Erscheinung, daß das (aus derselben Quelle — GRÜBLER — bezogene) Nilblausulfat bei früheren Versuchen an Amphibienlarven sich als unschädlich erwies, bei Echinodermeneiern dagegen giftig wirkte, ließ vermuten, daß vielleicht kein genügend reines chemisches Präparat vorlag. Ein Zusatz von schwacher Salzsäure zur Farblösung änderte an der Wirkung nichts. Dagegen konnte durch Zusatz von kohlensaurem Natron Weiterentwicklung der Eier erzielt werden. Es trat aber keine Färbung ein, die Furchung verlief atypisch, und sie führte zur Entstehung von ganz unregelmäßig gestalteten Blastulis, mit vielfach gefalteter Zellwand. Die Zellen selbst erschienen normal, die Blastulae aber stellten bizarre Gebilde von verschiedenster Größe dar, die alsbald der Degeneration anheimfielen. — Weitere Versuche müssen lehren, ob sich die Giftwirkung des käuflichen Nilblausulfat neutralisieren läßt, oder ob dieser Farbstoff unter allen Umständen speziell für Echinodermeneier giftig ist.

Prag, anatomisches Institut, Juli 1906.