

Die chemische Entwicklungserregung des tierischen Eies.

(Künstliche Parthenogenese.)

Von

Jacques Loeb,

Professor der Physiologie an der University of California
in Berkeley.

Mit 56 Textfiguren.



Berlin.

Verlag von Julius Springer.

1909.

ISBN-13: 978-3-642-48481-0 e-ISBN-13: 978-3-642-48548-0
DOI: 10.1007/978-3-642-48548-0

Copyright by Professor Jacques Loeb,
Berkeley, Ca. 1909.
Softcover reprint of the hardcover 1st edition 1909

Herrn Professor Svante Arrhenius

in aufrichtiger Verehrung gewidmet

vom Verfasser.

Einleitung und Vorwort.

1. Das folgende Buch gibt die Resultate von Versuchen, deren Zweck es war, das Problem der Entwicklungserregung des tierischen Eies aus dem Gebiet der Morphologie in das der physikalischen Chemie zu übertragen.

Es ist seit ungefähr 60 Jahren sichergestellt, daß das Ei der Tiere — mit Ausnahme weniger Arten — nur dann sich zu einem Embryo zu entwickeln vermag, wenn ein Spermatozoon in dasselbe eintritt. Für den Physiker und Chemiker würde der nächste Schritt nach dieser Ermittlung darin bestanden haben, festzustellen, durch welche Kräfte das Spermatozoon die Entwicklung des Eies anregt. Da aber dieses Gebiet naturgemäß den Morphologen überlassen blieb, die der rein chemischen und physikalischen Behandlung biologischer Probleme oft fremd und zum Teil geradezu ablehnend gegenüberstehen, so wurde kein Versuch gemacht, den Prozeß der Entwicklungserregung im Sinne der Chemie und Physik zu entwirren; und man behalf sich mit morphologischen Worterklärungen und Definitionen. So behauptete O. Hertwig, daß das Wesen der Befruchtung in der Vereinigung des Spermakerns mit dem Eikern bestehe; und diese Behauptung wird von ihm als eine „Theorie der Befruchtung“ hingestellt, obwohl damit doch nicht die geringste Einsicht in die Natur der Kräfte gegeben ist, welche das Ei zwingen, sich in einen Embryo zu entwickeln. Es wurde auch bald von Boveri der Nachweis geführt, daß das Aneinanderlegen oder Verschmelzen von zwei Kernen — — des Samen- und Eikerns — gar nichts mit der Entwicklungserregung des Eies zu tun hat. Es gelang nämlich diesem Forscher zu zeigen, daß ein Ei, dessen Kern durch einen operativen Eingriff entfernt ist, sich dennoch in einen Embryo entwickelt, wenn nur ein Spermatozoon in das-

selbe eintritt. In diesem Falle ist eine Vereinigung von zwei Kernen natürlich unmöglich gemacht.

Boveri ersetzte die Hertwigsche Definition durch eine mehr sachgemäße Hypothese der Entwicklungserregung. Nach ihm soll das unbefruchtete Ei deshalb außerstande sein, sich zu entwickeln, weil ihm das „Organ“ zur Zellteilung fehle. Dieses Organ, das Zentrosom, werde erst durch das Spermatozoon in das Ei getragen. Bei der Kernteilung treten nämlich Strahlungsfiguren im Ei auf, — die sogenannten Astrosphären, — deren physikalische Natur einstweilen unbekannt ist. Gewisse, aber keineswegs alle Eier besitzen im Zentrum eines Strahlungssystems ein festes Körnchen — das Zentrosom —, und in diesem sieht Boveri das „Organ der Zellteilung“. Dem unbefruchteten Ei solle nun dieses Körnchen fehlen, und das letztere soll nach Boveri erst durch das Spermatozoon in das Ei getragen werden.

Wenn man aber bedenkt, daß die Entwicklung des Eies ein chemischer Prozeß ist, der, wie ich vor 14 Jahren zeigte, wesentlich auf Oxydationen beruht, und bei dem eine Synthese von Kernstoffen aus Bestandteilen des Zytoplasma stattfindet, so muß man doch zugeben, daß die Boverische Hypothese nicht als eine adäquate Erklärung der Entwicklungserregung angesehen werden kann. In seiner Hypothese ist dem Zentrosom und den Astrosphären eine rein mechanische Rolle zugewiesen, nämlich die Chromosomen des Kerns in zwei Massen, die zwei Tochterkerne, auseinanderzuziehen.

Die Annahme Boveris, daß die Zentrosomen oder Astrosphären nicht im unbefruchteten Ei vorhanden seien oder daselbst gebildet werden können, wurde hinfällig, als Morgan im Anschluß an meine Versuche über die Wirkung hypertotonischer Lösungen auf das Ei zeigte, daß solche Lösungen im unbefruchteten Ei Astrosphärenbildungen hervorrufen können, und daß solche Eier sogar anfangen können, sich zu furchen. Boveri paßte seine Hypothese alsbald der neuen Tatsache an, indem er zugab, daß Zentrosomen und Astrosphären auch im unbefruchteten Ei durch äußere Agenzien gebildet werden können. Aber damit fällt, wie mir scheint, wieder der Vorteil der Boverischen Hypothese; denn warum sollte das Spermatozoon nicht auch die Bildung von Astrosphären im Ei dadurch

hervorrufen, daß es chemische Änderungen im Ei veranlaßt, welche ihrerseits erst die Ursache der Astrosphärenbildung sind? Wie dem aber auch sein möge, jedenfalls ist in der Hypothese von Boveri die chemische Seite der Entwicklungs-erregung gänzlich außer acht gelassen. Diese Unvollständigkeit erhielt auch bald eine deutliche Illustration durch eine Beobachtung von Mead an den Eiern von *Chätópterus*, einem marinen Ringelwurm. Mead zeigte, daß in diesem Ei die beiden Astrosphären für die Kernteilung im Ei vorhanden sind, ehe das Spermatozoon in dasselbe eintritt, daß aber dennoch die Kernteilung nicht ablaufen kann, wenn nicht ein Spermatozoon in das Ei eintritt. Dagegen fand die Kernteilung auch ohne den Eintritt eines Spermatozoons statt, wenn er nur dem Seewasser etwas Kalium zusetzte. Es handelte sich in diesem Falle um die sogenannte Reifeteilung des Eies, und wir werden später auf Einzelheiten der Beobachtung von Mead näher eingehen. Dieselbe beweist, daß in diesem Falle das Spermatozoon sicher nicht durch das Hereintragen eines Zentrosoms in das Ei wirkt, sondern daß erstens das Ei den Teilungsapparat selbst bildet; und zweitens, daß das Spermatozoon durch das Hereintragen einer chemischen Substanz in das Ei wirkt.

2. Inzwischen hatten meine Versuche über Ionenwirkungen mich auf den Gedanken geführt, daß wir in den Ionen die wirksamsten Agenzien in den Lebenserscheinungen besitzen, und daß es mit Hilfe von Ionen gelingen müsse, die Lebenserscheinungen in viel höherem Maße zu beherrschen, als das sonst möglich sei. Der Umstand, daß die organische Chemie die Dynamik der Lebenserscheinungen so wenig aufgeklärt habe, schien seinen Grund darin zu haben, daß die aktivsten Bestandteile der lebenden Substanz, die Elektrolyte, nicht genügend berücksichtigt worden waren. Nichts schien mir geeigneter, die souveräne Rolle der Elektrolyte bei den Lebenserscheinungen in das rechte Licht zu stellen, als wenn es gelingen sollte, mit ihrer Hilfe die unbefruchteten Eier zur Entwicklung von Larven zu veranlassen. Die Ionen, mit deren Hilfe ich zuversichtlich das Gelingen meines Versuches erwartete, waren die Hydroxylionen. Ich hatte gefunden, daß die Geschwindigkeit der Entwicklung befruchteter Seeigel-

eier innerhalb gewisser Grenzen mit der Konzentration der Hydroxylionen des Seewassers zunimmt. Diesen Einfluß der Hydroxylionen bezog ich auf den fördernden Einfluß derselben auf Oxydationen. Ich hatte nämlich schon früher nachgewiesen, daß ohne Sauerstoff das befruchtete Seeigellei sich weder zu furchen noch zu entwickeln vermag.

Meine ersten Versuche, die Entwicklung unbefruchteter Seeigelleier mittels Alkali anzuregen, bestanden darin, daß die Eier mit Seewasser behandelt wurden, dessen Alkalinität durch Zusatz von Natronlauge erhöht war. Diese Versuche waren nur teilweise erfolgreich. In solchem Seewasser furchten sich die Eier nur ein- oder zweimal, ohne sich zu Larven zu entwickeln. Dagegen gelang es mir, die unbefruchteten Seeigelleier dadurch zur Entwicklung zu Larven anzuregen, daß ich dieselben zwei Stunden in hypertonesches Seewasser brachte, d. h. in Seewasser, dessen osmotischer Druck durch den Zusatz von irgendeinem Salz oder Zucker um etwa 60% erhöht war. Selbst reine (hypertone) Rohrzuckerlösungen wirkten entwicklungszerregend, nur entwickelten sich die mit dieser Lösung erzeugten Larven nicht bis zum Pluteusstadium. Erst sechs Jahre später fand ich, daß diese anscheinend rein osmotische Methode der Entwicklungszerregung sich in Wirklichkeit aus zwei Faktoren zusammensetzt, von denen der eine der durch die Erhöhung des osmotischen Druckes des Seewassers bedingte Wasserverlust des Eies ist; der zweite aber die Konzentration der Hydroxylionen der hypertonen Lösung. Es stellte sich nämlich heraus, daß innerhalb gewisser Grenzen die entwicklungszerregende Wirkung der hypertonen Lösung mit der Konzentration der Hydroxylionen zunimmt. Es wurde ferner gefunden, daß die hypertone Lösung diese entwicklungszerregende Wirksamkeit nur dann hat, wenn sie freien Sauerstoff in genügender Konzentration enthält. Verreibt man den Sauerstoff aus der hypertonen Lösung oder hemmt man die Oxydationen im Ei durch Zusatz von etwas KCN zum Seewasser, so bleibt die entwicklungszerregende Wirkung der hypertonen Lösung aus.

Kurz nach der Erzeugung von Larven aus unbefruchteten Seeigelleiern durch hypertonesches Seewasser, gelang mir die Erzeugung schwimmender Larven aus den unbefruchteten Eiern

von Chätopterus mittels Kalium und Säuren und von See-sterneiern mittels Säuren, ohne daß es nötig war, den osmotischen Druck des Seewassers zu erhöhen.

Diese Versuche waren nicht geeignet einen Einblick in die Entwicklungserregung des Eies durch ein Spermatozoon zu geben. Namentlich die Versuche über Entwicklungserregung mittels der hypertonen Lösungen gaben uns zunächst (ehe die Notwendigkeit des freien Sauerstoffs und einer gewissen Konzentration der Hydroxylionen für die Wirksamkeit dieser Lösungen erkannt war) nur neue Rätsel auf. Denn über die physiologische Rolle der hypertonen Lösung war damals nichts bekannt, und es fehlte jede Analogie, die uns hätte als Führer dienen können. Wie so oft waren es Versuchsschwierigkeiten, welche in diesem Falle auf den rechten Weg halfen. Während nämlich die erwähnte osmotische Methode der Entwicklungserregungen bei den Eiern der Seeigel in Woods Hole (Arbacia) ziemlich beständige, gute Resultate lieferte, waren die Resultate dieser Methode in Pacific Grove (an Strongylocentrotuseiern) höchst unbeständig. Oft erzielte man überhaupt keine Embryonen durch die Behandlung der Eier von Strongylocentrotus mit hypertonischem Seewasser, oft nur sehr wenige und gelegentlich eine große Zahl. Später stellte es sich heraus, daß der Unterschied wohl zum Teil darauf beruhte, daß das Seewasser in Woods Hole alkalischer war als das Seewasser in Pacific Grove. Ehe ich das aber erkannt hatte, schlug ich einen andern Weg ein, die Methode der Entwicklungserregung zu verbessern.

3. Es war jedem Biologen bekannt, daß die Eier vieler Seetiere unmittelbar nach dem Eindringen des Spermatozoons eine Veränderung erleiden; sie bilden die sogenannte Befruchtungsmembran. Dieser Prozeß besteht, wie ich finde, in der Quellung und Verflüssigung einer Substanz an der Oberfläche des Eies, wobei entweder eine schon bestehende Oberflächlamelle desselben abgehoben wird, oder eine neue Niederschlagsmembran gebildet wird. Dieser Membranbildungsprozeß war immer als etwas sehr Nebensächliches betrachtet worden. Ich legte deshalb auch kein Gewicht darauf, daß bei der osmotischen Entwicklungserregung des Eies keine Membranbildung stattfand. Ich fand nun 1905, daß eine kurze Behand-

lung der Seeigeleier mit einer einbasischen Fettsäure die Bildung einer typischen Befruchtungsmembran bei allen Eiern von *Strongylocentrotus* hervorruft; und ferner, daß alle diese Eier zur Entwicklung zu Larven veranlaßt werden können, wenn man sie nach der künstlichen Membranbildung mit Fettsäure kurze Zeit, etwa 20 bis 50 Minuten, in hypertonisches Seewasser bringt. Ruft man bloß die Membranbildung hervor, ohne die Eier hinterher in hypertonisches Seewasser zu bringen, so fangen sie zwar an, sich zu furchen, aber dann tritt ein Zerfall ein, und zwar auf einer um so früheren Stufe der Entwicklung, je höher die Temperatur ist. Ist die Temperatur sehr niedrig, so können sich die Eier zu frühen Larven entwickeln, ohne daß es nötig wäre, dieselben außerdem noch mit hypertonischem Seewasser zu behandeln. Bei Zimmertemperatur dagegen zerfallen die Eier in wenigen Stunden. Die Hervorbringung der Membranbildung setzt also die Entwicklung in den Gang, aber die Membranbildung hat auch eine schädigende Nebenwirkung, nämlich eine Tendenz zur Zytolyse. Diese schädigende Nebenwirkung wird durch eine kurze Behandlung des Eies mit einer hypertonischen Lösung beseitigt. Um diese Wirkung zu erzielen, muß die hypertonische Lösung freien Sauerstoff in genügender Menge enthalten. Ihre Wirksamkeit ist um so größer, je höher, innerhalb gewisser Grenzen, die Konzentration der Hydroxytionen ist. Wir können uns vorstellen, daß durch die hypertonische Lösung eine schädigende Substanz im Ei (durch Oxydationen?) zerstört wird.

Ich fand nun 1906 noch eine andere Methode, die schädigende Nebenwirkung, welche mit der Membranbildung verbunden ist, zu beseitigen; dieselbe besteht darin, daß man die Entwicklung der Eier etwa 2 bis 3 Stunden lang hemmt. Man tut das in der Weise, daß man dieselben nach der Membranbildung in Seewasser bringt, aus dem man den Sauerstoff durch einen Wasserstoffstrom ausgetrieben hat, oder dem man etwas KCN zugesetzt hat. In dem Falle ist die Entwicklung des Eies infolge der Unterdrückung der Oxydationen in demselben unmöglich. Bringt man die Eier dann, nach 2 oder 3 Stunden (bei 15°), in normales sauerstoffhaltiges Seewasser zurück, so entwickeln sie sich meistens alle unter völlig normaler Furchung. Es tritt also während dieser Zeit eine Änderung

im Ei ein, welche ihm erlaubt, sich normal zu entwickeln. Um unsere Ideen zu fixieren, wollen wir annehmen, daß während der Entwicklungshemmung das Ei einen schädlichen Stoff durch Hydrolyse zerstört und damit die schädlichen Nebenwirkungen der Membranbildung beseitigt.

Daß nun in der Tat die Membranbildung der wesentliche Schritt bei der Entwicklungserregung ist, kann ferner dadurch gezeigt werden, daß dieselbe bei den Eiern vieler Formen ausreicht, um die Entwicklung derselben zu normalen Larven auch bei Zimmertemperatur zu erlauben. Ich habe gefunden, daß wenn man bei den Eiern eines Seesterns, *Asterina*, die Membranbildung durch Fettsäure hervorruft, ein Teil dieser Eier sich zu normalen Larven entwickeln kann; das gleiche fand ich später bei den Eiern eines marinen Ringelwurms, *Polynoë*, und Lefevre stellte dasselbe für die Eier des marinen Wurmes *Thalassema* fest. Diese Eier unterscheiden sich von den Eiern des Seeigels nur dadurch, daß die durch die Membranbildung bedingten schädlichen Nebenwirkungen geringer sind, oder daß die Eier dieser Formen sich rascher von denselben erholen können als die Eier des Seeigels. Wir werden später sehen, daß nur ein quantitativer, aber kein prinzipieller Unterschied zwischen den Eiern verschiedener Formen in dieser Hinsicht besteht.

Daß nun die Membranbildung und nicht eine andere Wirkung der Fettsäure die Entwicklung des Eies anregt, geht daraus hervor, daß die Membranbildung, wenn sie durch irgendwelche andere Mittel herbeigeführt wird, ebenfalls die Entwicklung des Eies anregt; während die Säurewirkung an sich, wenn sie nicht zur Membranbildung führt, auch die Entwicklung nicht anregt.

4. Damit war denn der Membranbildungsprozeß, der bis dahin als etwas völlig Nebensächliches für die Entwicklung angesehen worden war, als die wesentliche Ursache der Entwicklungserregung des Eies erkannt. Der nächste Schritt bestand darin, festzustellen, welche Stoffe und Agenzien die Membranbildung im Ei bedingen. Eine erschöpfende Untersuchung dieses Gegenstandes mußte auch den Stoff einschließen, durch welchen das Spermatozoon die Entwicklung des Eies hervorruft.

Schon bei meinen ersten Versuchen über die künstliche Membranbildung war mir aufgefallen, daß dieselbe ein Durchgangsstadium bei der Zytolyse des Eies bildet, und eine genauere Untersuchung des Gegenstandes zeigte, daß alle zytolytischen Agenzien auch die Membranbildung anregen. Eine relativ kurze Einwirkung eines zytolytischen Agens ruft nur die Membranbildung hervor; wirkt das Agens aber längere Zeit ein, so bedingt es Zytolyse. Man kann daher sagen, daß die Membranbildung (und damit die Entwicklungserregung des Eies) in einer oberflächlichen (oder milden) Zytolyse desselben besteht. Gewisse Glucoside, z. B. Saponin, Solanin und Digitalin haben starke hämolytische oder zytolytische Wirkungen. Bringt man Eier kurze Zeit in eine sehr verdünnte Lösung dieser Stoffe in Seewasser, so bilden sie eine typische Befruchtungsmembran. Nimmt man sie unmittelbar nach der Bildung dieser Membran aus der Lösung, so beginnt die Entwicklung. Bei den Eiern von *Polynoë* genügt diese Behandlung, bei den Eiern von *Strongylocentrotus* ist noch eine Nachbehandlung mit hypertonischem Seewasser nötig, um die schädliche Nebenwirkung der Membranbildung zu beseitigen. Nimmt man die Eier aber nicht sofort nach der Membranbildung aus der saponinhaltigen Lösung, so tritt in wenigen Minuten Zytolyse ein. Ganz ähnliche Versuche lassen sich mit Seifen anstellen. Eine kurze Behandlung der Eier mit einer alkalischen Seifenlösung in NaCl führt zur Membranbildung und zur Entwicklung (falls man sie hinterher kurze Zeit mit einer hypertonen Lösung behandelt). Eine längere Behandlung der Eier mit einer Seifenlösung führt zur Zytolyse.

Dasselbe Verhalten konnte ich für alle zytolytischen Agenzien zeigen, selbst für zytolytisch wirkende Agenzien physikalischer Natur, wie beispielsweise die Temperaturerhöhung. Eine hinreichende Temperaturerhöhung verursacht die Membranbildung beim unbefruchteten Seeigellei, und eine länger andauernde Temperaturerhöhung veranlaßt Zytolyse. Lillie hat gefunden, daß die Eier des Seesterns sich nach der Membranbildung durch Temperaturerhöhung zu Larven entwickeln können. Die Seeigelleier werden durch die zur Membranbildung nötige Temperaturerhöhung schon zu sehr geschädigt, um sich entwickeln zu können.

Wir wissen, daß die Blutkörperchen einer Tierart durch die Körpersäfte einer entfernten Art oft zur Zytolyse gebracht werden. Ich habe nun vor zwei Jahren gefunden, daß das Blut gewisser Würmer, nämlich der Gephyreen, in sehr starker Verdünnung die Membranbildung beim Seeigelei hervorruft. Auch das Blut anderer Formen, insbesondere der Säugetiere, hat diese Wirkung. Diese Erscheinung läßt sich aber nicht bei den Eiern jedes Weibchens hervorrufen, es handelt sich, wie ich glaube, um Unterschiede in der Durchlässigkeit der Eier verschiedener Weibchen. Nur diejenigen Eier, welche für die Kolloide des artfremden Blutes durchgängig sind, bilden unter dem Einfluß desselben Membranen. Behandelt man solche Eier nach der Membranbildung durch Blut kurze Zeit mit hypertonischem Seewasser, so entwickeln sie sich zu Larven. Dagegen gelingt es nicht oder nur sehr langsam, die Zytolyse dieser Eier mit dem artfremden Blut hervorzurufen, weil, wie ich glaube, die Befruchtungsmembran das weitere Diffundieren der Kolloide des Blutes in das Ei hindert.

5. Man kann danach die Frage aufwerfen, ob auch das Spermatozoon die Membranbildung durch ein Lysin bewirkt, und ob in diesem Falle außer dem Lysin noch eine zweite Substanz durch das Spermatozoon in das Ei getragen werden muß, deren Aufgabe es ist, die schädliche Nebenwirkung der Membranbildung zu hemmen. Das scheint in der Tat der Fall zu sein. Ich habe vor sechs Jahren eine Methode gefunden, welche es gestattet, die Eier des Seeigels mit dem Samen weit entfernter Arten, z. B. des Seesterns, zu befruchten. Wendet man diese Methode an, so sieht man, daß nicht alle Seeigeleier, welche bei der Behandlung mit (lebenden) Seesternsamen Membranen bilden, sich entwickeln. Ein Teil der Eier fängt an, sich nach der Membranbildung zu entwickeln, beginnt aber dann zu zerfallen; genau in der Weise, wie die Eier nach der Membranbildung mit einer Fettsäure anfangen sich zu entwickeln, aber dann zerfallen, wenn sie nicht durch eine weitere Manipulation von den schädlichen Nebenwirkungen der Membranbildung befreit werden. Es benimmt sich also ein Teil der mit Seesternsamen behandelten Eier so, als ob dieser Same nur durch eine hämolytische Substanz die Membranbildung im Seeigelei hervorgerufen habe. Behandelt man diese Eier nach der Membranbildung

durch Seesternsamen kurze Zeit mit hypertonischem Seewasser, so entwickeln sie sich zu Larven. Die andern Seeigeleier aber, welche unter dem Einfluß des Seesternsamens Membranen bildeten, entwickeln sich ohne weitere Behandlung mit hypertonischem Seewasser oder mit Sauerstoffmangel. Die Seesternspermatozoen wirken also auf zwei Weisen auf die Seeigeleier; bei einem Teil der Eier kommt es nur zur Membranbildung, aber nicht zur Hemmung der schädlichen Nebenwirkungen dieses Vorganges. Bei den andern Eiern bewirkt das Spermatozoon beide Erscheinungen, die Membranbildung sowohl, wie die Hemmung der schädlichen Nebenwirkungen.

Ich vermute, daß im ersteren Falle nur eine an der Oberfläche des Spermatozoons existierende zytolytische Substanz in das Ei eindringt, während im letzteren Falle das ganze Spermatozoon in das Ei gelangt. Versuche, mit denen mein Assistent, Herr Elder, zurzeit beschäftigt ist, machen eine solche Annahme wahrscheinlich.

Diese Beobachtungen über die Wirkung des Seesternsamens auf das Seeigelei führen zu einem interessanten Problem, nämlich wie es kommt, daß die Behandlung der Seeigeleier mit dem eigenen Samen niemals zur bloßen Membranbildung (ohne darauffolgende vollständige Entwicklung) führt. Befruchtet man nämlich die Eier des Seeigels mit Seeigelsamen, so entwickeln sich stets alle Eier, welche eine Membran bilden; und man findet nicht, daß ein Teil derselben zwar anfängt sich zu entwickeln, aber hinterher zerfällt. Die Antwort lautet, daß die Lysine fremder Spermatozoen auf zwei Weisen in das Ei gelangen können, nämlich durch Diffusion und durch Transport mittels des Spermatozoons; daß aber die Lysine der Spermatozoen der eigenen Art nicht durch Diffusion in das Ei gelangen können, sondern nur durch Transport mittels eines Spermatozoons. Dringt aber ein Spermatozoon in das Ei, so bringt es außer dem Lysin noch eine zweite Substanz in das Ei, welche die schädliche Nebenwirkung der Membranbildung hemmt.

Diese Tatsachen werfen auch ein Licht auf die Frage, wie es kommt, daß die Zellen des Körpers, insbesondere die Blutkörperchen, nicht durch die im eigenen Blute enthaltenen Lysine geschädigt werden. Die letzteren können offenbar

nicht in die Zellen der eigenen Art eindringen, während sie sehr wohl imstande sind, in die Zellen vieler fremden Arten zu diffundieren.

6. Die Frage, wie die zytolytischen Agenzien die Membranbildung bewirken, fällt mit der Frage nach dem Wesen der Zytolyse zusammen. Auf die Beantwortung dieser Frage wollen wir in dieser Schrift nicht eingehen, wir dürfen aber wohl, um unsere Anschauungen zu fixieren, vorläufig annehmen, daß die Oberfläche des Eies aus einer Emulsion besteht, deren Haltbarkeit durch die zytolytischen Agenzien vernichtet wird, möglicherweise dadurch, daß die Oberflächenspannung zwischen den zwei Phasen der Emulsion geändert oder eine Phase der Emulsion, die vorher fest war, gelöst wird. Diese Annahme gibt uns ein Verständnis für die Tatsache, daß die Eier verschiedener Tierformen alle Übergänge zwischen spontaner und künstlicher Parthenogenese erkennen lassen. Bei den Eiern, welche eine natürliche Tendenz zur Entwicklung ohne Samenbefruchtung haben, muß die Haltbarkeit der Emulsion relativ gering sein, so daß schon die HO-Ionen des Seewassers oder die durch die Eier oder Bakterien gebildete Kohlensäure ausreicht, um die Emulsion zu zerstören und die Membranbildung zu veranlassen. Diese Annahme wird durch die Beobachtungen an Seesterneiern gestützt. Die Seesterneier zeigen im Gegensatz zu den meisten Seeigeleiern eine Tendenz, sich spontan (ohne Samenzusatz) zu entwickeln. Meist findet man, daß einige Seesterneier anfangen sich nach längerem Liegen im Seewasser zu furchen, und in manchen Fällen kommt es auch zur spontanen Bildung von Larven in solchen unbefruchteten Seesterneiern, ohne daß es nötig wäre, dieselben in irgendeiner Weise künstlich zu behandeln. Mathews fand, daß man durch leichtes mechanisches Schütteln die Zahl der sich spontan entwickelnden Seesterneier vermehren kann. Ich fand dasselbe für die Eier von Amphitrite, einem marinen Wurm, die ebenfalls eine Tendenz zur spontanen Parthenogenese zeigen. Diese Tatsache, für die es bisher keine Erklärung gab, läßt sich aus der Annahme verstehen, daß die Tendenz zur spontanen Parthenogenese auf eine geringe Haltbarkeit der Emulsion an der Peripherie des Eies bei diesen Formen zurückzuführen ist. An der unteren Grenze

der Haltbarkeit der Emulsion genügt nämlich schon eine geringe Erschütterung, um dieselbe zu zerstören. Ich habe auch gefunden, daß, wenn man die Eier von *Asterias* im Eierstock drückt, dieselben unter Membranbildung zur Zytolyse gebracht werden können. Auch die Seesterneier, welche durch Schütteln zur Entwicklung veranlaßt werden, beginnen ihre Entwicklung mit einer Membranbildung. Die letztere ist die unmittelbare Wirkung der mechanischen Erschütterung. Die Eier des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus* zeigen nie eine Tendenz zur spontanen Furchung oder Entwicklung, gleichviel wie lange dieselben im Seewasser liegen. Dementsprechend finden wir, daß sie durch Schütteln nie zur Membranbildung oder Entwicklung veranlaßt werden können.

Wie aber die oberflächliche Zytolyse des Eies dasselbe zur Entwicklung anregen kann, ist eine Frage, die sich einstweilen der Beantwortung entzieht. Alles weist daraufhin, daß der Übergang des Eies aus dem ruhenden in den tätigen Zustand auf einer Beschleunigung der Oxydationen im Ei beruht. Für diese Zunahme ist das Eindringen von Sauerstoff und Hydroxylionen und möglicherweise anderer Stoffe des Seewassers nötig. Vielleicht erhöht die Zerstörung der an der Oberfläche bestehenden Emulsion die Durchgängigkeit des Eies für diese Stoffe. Eins aber können wir mit Sicherheit sagen, daß die Zunahme der Oxydationen nach der Befruchtung des Eies oder nach der bloßen Membranbildung nicht dadurch bedingt sein kann, daß das Spermatozoon ein Ferment in das Ei trägt, oder daß durch die künstliche Membranbildung die Bildung eines positiven Katalysators für die Oxydationen angeregt wird. Das habe ich durch eine Kombination von Samenbefruchtung und künstlicher Parthenogenese im selben Ei zeigen können. Bestünde nämlich die Entwicklungserregung in dem Hineintragen resp. in der Neuschaffung eines Katalysators im Ei, so müßte eine Kombination von Samenbefruchtung und künstlicher Parthenogenese im selben Ei die Geschwindigkeit der Entwicklung desselben vergrößern. Die Versuche ergaben aber, daß die Geschwindigkeit der Entwicklung in diesem Falle entweder unverändert blieb oder verringert wurde. Es handelt sich deshalb bei der Entwicklungserregung um die Beseitigung eines Hindernisses oder eines Widerstands,

der einer gewissen chemischen Reaktion im Ei und damit der Entwicklung im Wege steht.

7. Diese Bemerkungen dürften genügen, um dem Leser eine Übersicht über den Zusammenhang der Ideen zu gewähren, welche in diesem Buche entwickelt werden. Es erübrigt sich, noch kurz darauf hinzuweisen, daß die Versuche über künstliche Parthenogenese vielfach Berührungspunkte mit anderen Fragen der Biologie haben. Die hier entwickelte Lysintheorie der Entwicklungserregung zeigt schon die engen Beziehungen zwischen dem Gebiet der Entwicklungserregung und der Pathologie an. Es ist auch schon von E. Schwalbe darauf hingewiesen worden, daß die hier mitgeteilten Versuche für die Ätiologie der Tumoren von Bedeutung sind. Die Pathologie wird darüber Rechenschaft ablegen müssen, was das plötzliche Wachsen eines Gewebes veranlaßt und wie ein Parasit wie der Tuberkelbazillus oder der vermutete Krebs-erreger diese Veranlassung liefert. Es scheint mir nun, daß der hier geführte Nachweis, daß eine oberflächliche Zytolyse die Entwicklung des Eies veranlaßt, und daß artfremde Körpersäfte diese Wirkung auszuüben imstande sind, für die weitere Tumorenforschung von Interesse sein dürfte. Denn es ist anzunehmen, daß Parasiten die Bildung von Gallen und Tumoren nur durch Vermittlung ihrer Körpersäfte oder gasförmigen Ausscheidungen bedingen können, die sie entweder während des Lebens sezernieren, oder welche nach ihrem Tode aus ihrem Körper austreten.

Die Periodizität der Lebenserscheinungen beruht zum Teil darauf, daß Zellen abwechselnd in den Zustand der Ruhe und des Wachstums geraten. Die Geschichte des Eies bei Tieren, welche sich geschlechtlich fortpflanzen, ist ein bekanntes Beispiel hierfür. Ein anderes Beispiel sind die verschiedenen Wachstumsperioden in demselben Organismus. Die Lysintheorie der Entwicklungserregung gibt uns zum erstenmal einen Wink, in welchen Veränderungen der Zelle wir den Anlaß für den Übergang aus dem Ruhestadium in das des Wachstums und der Entwicklung zu suchen haben. Wir können nun anfangen zu verstehen, wie es kommt, daß das Sekret der Schilddrüse imstande ist, direkt oder indirekt das Wachstum anzuregen. Wenn die Lysine des artfremden Blutes eine solche Wirkung

ausüben können, so ist es auch verständlich, daß die Sekrete gewisser Organe des eigenen Körpers dasselbe bei gewissen Zellen des Körpers leisten können. Leo Loeb hat vor kurzem gezeigt, daß die Voraussetzung für die Bildung der Dezidua im schwangeren Uterus darin zu suchen ist, daß der Inhalt der Eifollikel ins Blut des Tieres gelangt. Unter solchen Bedingungen genügt die geringste Verletzung des Uterus, um die Bildung der Dezidua hervorzurufen, während sonst dieselben Verletzungen keine Deziduabildung bedingen. Es dürfte sich hier wohl um die Wirkung spezifischer Lysine handeln, die nur auf die Zellen eines oder weniger Organe wirken können.

Eine zweite Gruppe von Problemen, für welche die Versuche über künstliche Parthenogenese von Bedeutung werden dürften, sind Vererbung und Geschlechtsbestimmung. Es stellt sich mehr und mehr heraus, daß das Geschlecht im Ei vorherbestimmt ist, d. h. daß es zwei Arten von Eiern gibt, männliche und weibliche. Hagedoorn hat die Vermutung ausgesprochen, daß bei den Bienen nur die männlichen Eier sich parthogenetisch entwickeln können, während die unbefruchteten weiblichen Eier zugrunde gehen. Man könnte daran denken, daß ähnliche Verhältnisse auch bei der künstlichen Parthenogenese vorkommen können, aber ich habe die Inangriffnahme dieses und anderer Vererbungsprobleme verschoben, bis es möglich ist, Eier für diese Versuche zu gewinnen, die sich leichter und rascher aufzuchten lassen als die Eier von Echinodermen, Würmern und Mollusken.

Es ist ferner die Möglichkeit vorhanden, daß der morphologische oder physiologische Charakter des Tieres eine Modifikation erleiden könnte, je nach der Natur des Stoffes, der zur Entwicklungserregung benutzt wird. Es ist mit Rücksicht auf die hier der Lösung zugänglichen Probleme wünschenswert, daß die Versuche über künstliche Parthenogenese fortgesetzt werden.

8. Man hat wiederholt behauptet, daß es sich bei der Entwicklungserregung des Eies nur um eine „Reizung“ desselben handle. Ich habe nichts dagegen, daß man die Entwicklungserregung des Eies als eine Reizung bezeichnet; aber zwischen der bloßen Behauptung, daß die Entwicklungserregung eine „Reizung“ sei und dem Tatsachenkomplex der künstlichen

Parthenogenese besteht doch wohl ein weiter Unterschied. Aus dem Worte „Reizung“ hätte doch beispielsweise niemand die Lysintheorie der Entwicklungserregung ableiten können, und die Behauptung, daß die Entwicklungserregung nur eine „Reizung“ sei, erlaubte auch nicht die ausschlaggebende Bedeutung des Membranbildungsprozesses zu erkennen.

Gerade der Umstand, daß die Entwicklungserregung des Eies an die „Reizung“ erinnert, war mit schuld daran, daß ich so viele Arbeit an dieses Problem gewendet habe. Es war mir bei meinen Versuchen über Tropismen sowie über Gehirn-, Nerv- und Muskelphysiologie klar geworden, daß hier kein entscheidender Fortschritt zu machen sei, bis wir uns über das Wesen des Reizvorganges klar seien. Trotz mehr als hundertjähriger Forschung sind wir von diesem Ziel noch weit entfernt, und den Grund hierfür sehe ich in dem Umstand, daß wir nicht nach Wunsch direkt sehen können, was im Nerv und in seinen Endigungen bei der Reizung vorgeht. Beim Ei aber können wir die Vorgänge der Erregung direkt mit dem Auge verfolgen, und, was mehr wert ist, wir können dieselbe Tatsache gleichzeitig an Millionen von Individuen bestätigen. Das führte mich auf den Gedanken, daß gerade das Studium der Entwicklungserregung berufen sein könne, uns die bis jetzt fehlenden Analogien für die erfolgreiche Analyse der Vorgänge im Muskel und Nerven, und vielleicht in allen Zellen zu geben. Denn das Ei ist die Zelle katexochen, und eine Zellphysiologie, die auf diesen Namen Anspruch erheben darf, muß die Erforschung der Vorgänge in der Eizelle zur Grundlage haben.

9. Von den Einzelheiten, die in diesem Buche niedergelegt sind, möchte ich eine erwähnen, von der ich annehme, daß ihr eine allgemeine Bedeutung zukommt. Das ist die paradoxe Tatsache, daß es unter gewissen Bedingungen möglich ist, das Leben des Eies, und wohl von Zellen im allgemeinen, dadurch zu retten oder zu verlängern, daß wir die Oxydationen in demselben hemmen. Wenn wir die Eier des Seeigels längere Zeit in eine hypertonsche Lösung bringen, so gehen sie fast augenblicklich oder nach kurzer Zeit zugrunde, nachdem sie wieder in normales Seewasser übertragen sind. Vertreiben wir aber den Sauerstoff aus der hypertonschen

Lösung oder hemmen wir die Oxydationen im Ei, indem wir der hypertonen Lösung eine Spur KCN zusetzen, so wird die schädliche Wirkung der hypertonen Lösung unterdrückt. Diese paradoxe Beobachtung findet ihre Erklärung darin, daß die hypertone Lösung nur für das sich entwickelnde oder tätige Ei schädlich ist, während sie für das ruhende Ei relativ unschädlich ist. Den Nachweis für diese Behauptung kann man in der Weise führen, daß man die Wirkung einer hypertonen Lösung auf befruchtete und unbefruchtete Eier vergleicht. Man findet in diesem Falle, daß die befruchteten Eier viel rascher geschädigt werden, als die unbefruchteten. Daß die letzteren überhaupt in einer solchen Lösung leiden, hat seinen Grund darin, daß die hypertone Lösung die Entwicklung des ruhenden Eies anregt.

Genau das gleiche läßt sich für eine hyperalkalische Chlornatriumlösung nachweisen. Bringt man befruchtete und unbefruchtete Eier des Seeigels in eine Mischung von $50 \text{ ccm } \frac{n}{2} \text{ NaCl} + 1,0 \text{ ccm } \frac{n}{10} \text{ NaHO}$, so gehen beide Klassen von Eiern rasch zugrunde, die befruchteten aber viel früher als die unbefruchteten. Fügt man aber zu der Lösung etwas KCN (wodurch ja die Lösung noch etwas stärker alkalisch gemacht wird), so bleiben die Eier sehr lange am Leben.

Ich bin geneigt anzunehmen, daß diese Tatsachen eine weite Anwendung in der Pathologie finden werden, sobald man erst anfängt, denselben Beachtung zu schenken. Dieselben machen auch die folgende Beobachtung verständlicher, welche ich vor sieben Jahren mitteilte. Die reifen Eier des Seesterns und von Seetieren im allgemeinen gehen rasch zugrunde, wenn sie in das Seewasser entleert, aber nicht befruchtet werden. Hindert man aber die Oxydationen in denselben, so können sie tagelang am Leben bleiben. Auch hier handelt es sich darum, daß im unbefruchteten, aber reifen Ei schädliche oder falsch verlaufende Stoffwechselforgänge stattfinden, wodurch dasselbe getötet wird und daß eine Hemmung der Oxydationen auch diese falsch verlaufenden Stoffwechselforgänge zum Teil hemmt.

Die Tatsache, daß die Befruchtung oder Entwicklungs-erregung ein lebensverlängernder Akt für das Ei ist, hat noch

eine andere Bedeutung. Warburg hat gezeigt, daß mit der Befruchtung der Sauerstoffverbrauch des Eies plötzlich auf das Sechsfache erhöht wird. Wir sehen also, daß das Leben des unbefruchteten Eies durch zwei Umstände verlängert werden kann, einmal, wenn die im unbefruchteten Ei stattfindenden Oxydationen auf das Sechsfache gesteigert werden (durch die Befruchtung oder sonstige Entwicklungserregung) oder wenn dieselben ganz auf Null reduziert werden (durch KCN oder Sauerstoffentziehung). Im letzteren Falle ist natürlich die Lebensverlängerung nicht so nachhaltig wie bei der Entwicklungserregung. Diese Tatsachen weisen auf die hohe Bedeutung hin, welche der Geschwindigkeit der Oxydationsvorgänge und vielleicht aller Reaktionen in der lebenden Zelle zukommt. Ist die Geschwindigkeit einer einzigen chemischen Reaktion in der Zelle falsch gewählt, so kommt es zu Störungen. Der Grund dafür, daß eine gewisse Größenordnung der Reaktionsgeschwindigkeiten bei den Lebenserscheinungen eingehalten werden muß, liegt wohl darin, daß alle Lebenserscheinungen Kettenreaktionen sind, wobei es u. a. nötig ist, daß ein bestimmtes Verhältnis der Reaktionsprodukte der einzelnen Prozesse eingehalten wird.

Die Mehrzahl der dieser Schrift beigefügten Zeichnungen verdanke ich Herrn Elder, und die übrigen Herrn Hagedoorn. Beiden Herren spreche ich meinen verbindlichsten Dank aus.

Berkeley, 28. März 1909.

Der Verfasser.

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
I. Vorbemerkungen über die Entwicklung des Seeigeleies . . .	1
II. Zur Chemie des Befruchtungsvorganges	8
III. Die spontane Entwicklung unbefruchteter Eier (natürliche Parthenogenese)	22
IV. Zur Geschichte der ersten Versuche über künstliche Parthenogenese	26
V. Die ersten Versuche über die osmotische Entwicklungserregung des unbefruchteten Seeigeleies (Arbacia)	37
VI. Fortsetzung dieser Versuche: Die osmotische Entwicklungserregung der Eier des kalifornischen Seeigels (<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> und <i>franciscanus</i>)	44
VII. Welche chemischen Prozesse im Ei werden durch die hypertotonische Lösung modifiziert?	51
VIII. Die verbesserte Methode der künstlichen Parthenogenese beim Seeigelei	60
IX. Die Wirkung der künstlichen Membranbildung auf das Ei	66
X. Die Wirkung der hypertotonischen Lösung nach der Membranbildung	77
XI. Anhang. Über die relative osmotische Wirksamkeit der Lösungen verschiedener Stoffe	94
XII. Über chemische Konstitution und physiologische Wirksamkeit der Säuren	100
XIII. Die Rolle der Hydroxylionen bei und nach der Membranbildung durch Säure	113
XIV. Die Entwicklungserregung des Seeigeleies durch Alkalien .	118
XV. Über den Mechanismus der Entstehung der Befruchtungsmembran	125
XVI. Membranbildung und Zytolyse	132
XVII. Die Entwicklungserregung des Seeigeleies ohne Membranbildung	149
XVIII. Über die chemischen Bedingungen der Reifung der Eier .	157
XIX. Versuche an Seesterneiern	162
XX. Versuche an Annelideneiern	170

	Seite
XXI. Versuche an Molluskeneiern	179
XXII. Über die Beziehungen zwischen der Lösung des Chorions und der Entwicklungserregung des Eies	181
XXIII. Über die Entwicklungsfähigkeit der parthenogenetischen Eier	183
XXIV. Über die Hervorrufung der Membranbildung beim Seeigeli mit artfremdem Blute, insbesondere dem Blute von Säugtieren	185
XXV. Versuche über die Entwicklungserregung von Eiern durch Samenextrakt	192
XXVI. Das Keimen ölhaltiger Samen und die „natürliche“ Parthenogenese	196
XXVII. Die Superposition von künstlicher Parthenogenese und Samenbefruchtung in demselben Ei	203
Anhang. Über die sogenannte „Gerinnungstheorie“ der Entwicklungserregung	216
XXVIII. Der autokatalytische Charakter der Nukleinsynthese als Grundlage der Kontinuität der Lebewesen und der Vererbung	219
XXIX. Das Wesen des Todes und die Verlängerung des Lebens des Eies durch die Befruchtung	233
XXX. Anwendung der Lysintheorie auf die Entwicklungserregung durch das Spermatozoon	247
Namenverzeichnis	253
Sachverzeichnis	255

I. Vorbemerkungen über die Entwicklung des Seeigeleies.

Da die folgende Schrift sich nicht nur an Zoologen, sondern vielmehr in erster Linie an Physiologen, Pathologen und Chemiker wendet, so ist es nötig, eine Skizze der Entwicklung des tierischen Eies zu entwerfen. Als Beispiel soll uns das Seeigelei dienen, an dem die Mehrzahl der Versuche über chemische Entwicklungserregung angestellt worden ist. Der Grund für diesen letzteren Umstand liegt in der Tatsache, daß gerade die Eier des Seeigels fast das ganze Jahr hindurch in großer Menge zu haben sind, und daß sie das gleichmäßigste Material bilden, das man für physiologische Versuche finden kann.

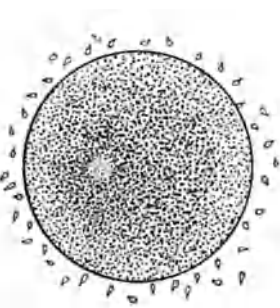


Fig. 1.
Unbefruchtetes Seeigelei
von Spermatozoen
umgeben.

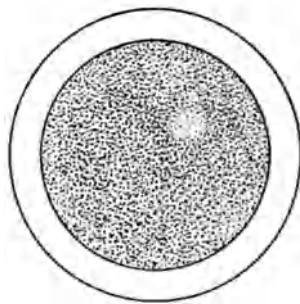


Fig. 2.
Dasselbe Ei nach dem Eindringen
des Spermatozoons und der Bildung
der Befruchtungsmembran.

Fig. 1 gibt ein Bild des unbefruchteten Eies, das von Spermatozoen umschwärmt ist. (Die Geißel der Spermatozoen ist in der Zeichnung weggelassen.) Sobald ein Spermatozoon in das Ei eingedrungen ist, tritt sofort eine sehr charakteristische

Änderung am Ei ein: dasselbe umgibt sich mit der sogenannten Befruchtungsmembran (Fig. 2). Der Mechanismus dieser Membranbildung kann dadurch deutlich gemacht werden, daß wir die Temperatur des Seewassers, in dem die Eier sich befinden, herabsetzen; dadurch wird der Membranbildungsprozeß verzögert,

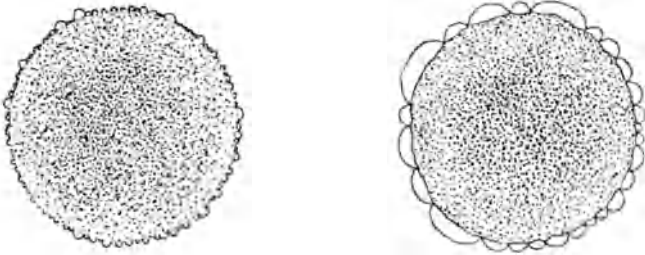


Fig. 3 und 4.

Entstehung der Befruchtungsmembran durch die Bildung kleiner Bläschen an der Oberfläche des Eies.

und er kann in seinen einzelnen Phasen beobachtet werden. Da wir später sehen werden, daß dieser Membranbildungsprozeß der wesentliche Vorgang bei der Entwicklungserregung des Eies ist, so wollen wir ihn in seinen einzelnen Etappen verfolgen.

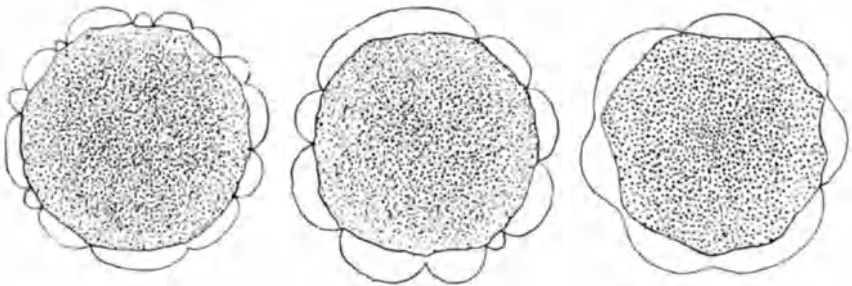


Fig. 5, 6 und 7.

Weitere Stadien im Prozeß der Membranbildung.

Der Beginn des Vorgangs zeigt sich in einem Rauwerden der vorher glatten Oberfläche des Eies (Fig. 3). Dieses Rauwerden ist dadurch bedingt, daß unzählige winzige Bläschen an der Oberfläche des Eies entstehen. Diese kleinen Bläschen

nehmen rasch an Größe zu (durch Absorption von Seewasser) und fließen zu größeren Bläschen zusammen (Fig. 4). Dieser Prozeß der Volumzunahme der Bläschen geht weiter und ebenso ihre Verschmelzung (Fig. 5, 6 u. 7), bis schließlich der Inhalt aller Bläschen zu einer kontinuierlichen Masse zusammengefloßen ist (Fig. 2). Die Oberflächenlamelle der winzigen Bläschen bildet also die spätere Befruchtungsmembran.

Bei höherer Temperatur verläuft der Prozeß der Membranbildung bei frisch herausgenommenen Eiern gewöhnlich so rasch, daß man die in Fig. 3 bis 7 gezeichneten Stadien nicht deutlich wahrnimmt und das Ei anscheinend direkt aus dem Zustand der Fig. 1 in den von Fig. 2 übergeht. Nur liegt anfangs die Membran dem Ei dicht an, und erst allmählich nimmt der Abstand zwischen dem Cytoplasma und der Membran zu.

Nach der Membranbildung setzen nun die chemischen Prozesse im Ei ein, welche der Entwicklung zugrunde liegen. Das Kernmaterial wächst, und es tritt eine Kernteilung ein; diese Kernteilung oder vielmehr die sogenannte Kernspindel ist in dem Ei, das unserer Beschreibung zugrunde liegt, (nämlich dem von *Strongylocentrotus purpuratus*), sichtbar (Fig. 8). Der in

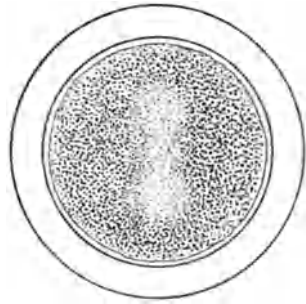


Fig. 8.
Kernteilung (Spindelbildung)
im Seeigelei.

dieser Figur sichtbaren Spindelbildung folgt alsbald die Furchung oder Zellteilung, d. h. der Zerfall des Eies in zwei Kugeln oder Zellen. Die verschiedenen einander folgenden Stadien dieses Vorgangs sind in Fig. 9 bis 12 zur Anschauung gebracht. Zuerst sehen wir, daß das Ei sich in der Richtung der Achse der Spindel etwas verlängert (Fig. 9); das beruht wohl darauf, daß das Protoplasma nach den Polen der Spindel hinfließt und vom Äquator desselben wegfließt. Dann beginnt eine Durchschnürung des Protoplasmas in der Äquatorialebene (Fig. 11 und 12), und nun besteht das Ei aus zwei Zellen, von denen jede einen Kern besitzt. Diesen Vorgang bezeichnet man als die Furchung des Eies.

Auf diesen Vorgang der Zelldurchschnürung oder Furchung wollen wir hier etwas näher eingehen. Wir kennen zwei Typen von Zellteilungen; der eine entspricht dem hier beschriebenen

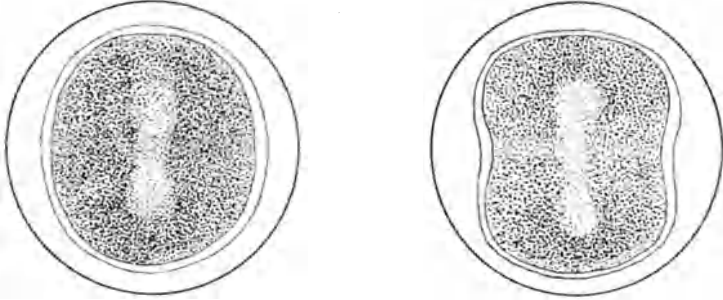


Fig. 9 und 10.
Beginn der Teilung (Furchung) des Eies.

Typus der Trennung der beiden Zellen. Der zweite kommt namentlich bei Pflanzen vor und besteht in der Bildung einer festen Membran im Äquator der Zelle, ohne daß es zu einer sonstigen Trennung der Zellen kommt. Bis zu einem gewissen

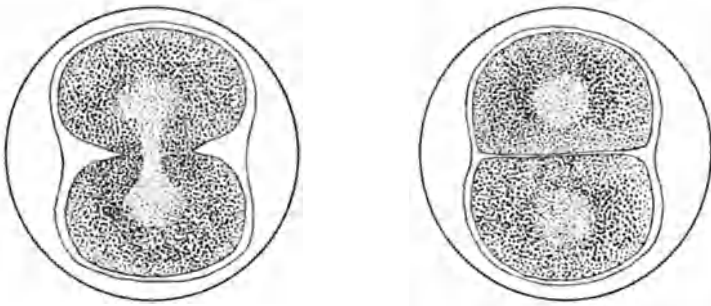


Fig. 11 und 12.
Vollendung der Zellteilung.

Stadium sind beide Typen der Zellteilung identisch, indem in beiden während des Spindelstadiums gewisse Stoffe in die Äquatorialebene der Zelle transportiert werden. Bei der Pflanze bestehen diese Stoffe aus Zellulose, welche erhärtet und eine trennende Membran bildet. Bei den Tieren bestehen diese Stoffe

aus einem Material, welches an der Oberfläche des Eies Seifen (die Quinckeschen Eiweißseifen?) bildet. Diese Seifen veranlassen Ausbreitungserscheinungen, und die Ausbreitungsvorgänge führen zur Trennung des Eis in zwei Kugeln.¹⁾

T. B. Robertson hat neuerdings eine schöne Demonstration für die Richtigkeit dieser Anschauung beigebracht.²⁾ Wenn man einen Tropfen Olivenöl auf die Oberfläche von Wasser bringt und in einen Durchmesser des Tropfens einen Faden legt, der vorher in eine alkalische Flüssigkeit getaucht war (z. B. N/10 NaHO), so teilt sich der Tropfen genau so in zwei Tropfen, wie das Seeigel-Ei in den vorhin gezeichneten Figuren. Durch passende Variation der Viskosität des Öls und anderer Nebenbedingungen kann man alle Variationen der Zeldurchschnürung, die bei der Furchung unter Zelltrennung zur Beobachtung kommen, nachahmen. Das Alkali des Fadens bildet mit der Ölsäure Seife, und diese Seife veranlaßt Ausbreitungsvorgänge, welche zur Zerreißung des Tropfens in zwei Tropfen führen.³⁾ Bei der Diskussion der Nukleinsynthese aus Lezithin wies ich darauf hin, daß Cholin bei dieser Synthese frei werden müsse.⁴⁾ Robertson nimmt an, daß dieses Cholin, welches ein Alkali ist, die Substanz sei, welche für die Seifenbildung diene und damit die Zeldurchschnürung herbeiführe. Es kann sich natürlich auch um ein anderes Alkali handeln. Vielleicht wird bei den Pflanzen ein neutraler oder saurer Stoff, nämlich Zellulose, in die Äquatorialebene geführt, und daher kommt es hier nicht zu einer Zeldurchschnürung, sondern nur zur Bildung einer festen trennenden Membran.

Diese Zellteilungsvorgänge wiederholen sich nun für jede Zelle. Aus dem Zweizellenstadium (Fig. 12) geht das Ei nacheinander in das Vierzellenstadium (Fig. 13), Achtzellenstadium (Fig. 14) usf.

Schon in frühen Furchungsstadien macht sich eine Tendenz

¹⁾ Loeb, Arch. f. Entwicklungsmechanik **1**, 468—470, 1896; **27**, 138, 1909. — Bütschli, daselbst **10**, 52, 1900.

²⁾ T. B. Robertson, Arch. f. Entwicklungsmechanik **27**, 1909.

³⁾ Loeb, Vorlesungen über die Dynamik der Lebenserscheinungen. Leipzig 1906. S. 92—96.

⁴⁾ Loeb, Über den chemischen Charakter des Befruchtungsvorgangs und seine Bedeutung für die Theorie der Lebenserscheinungen. Leipzig 1908.

der einzelnen Zellen geltend, an die Oberfläche des Eies zu kriechen; es handelt sich hier wohl um einen Tropismus, vielleicht um positiven Chemotropismus der Zellen gegen Sauer-

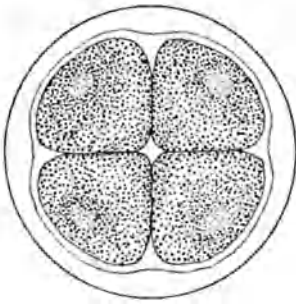


Fig. 13.
Das Ei im Vierzellenstadium.

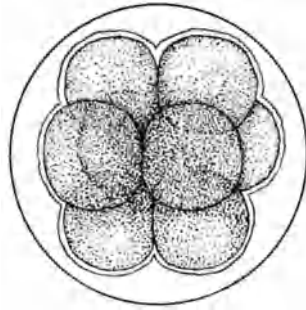


Fig. 14.
Achtzellenstadium des Seeigeleies.

stoff. Durch dieses Kriechen der Zellen an die Oberfläche wird es bedingt, daß das erste Larvenstadium des Seeigels eine Hohlkugel, die sogenannte Blastula ist (Fig. 15). In diesem Stadium entstehen an der äußeren Oberfläche der Zellen Zilien, mittelst

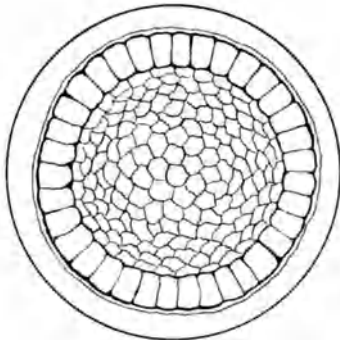


Fig. 15.
Frühes Blastulastadium
des Seeigeleies.

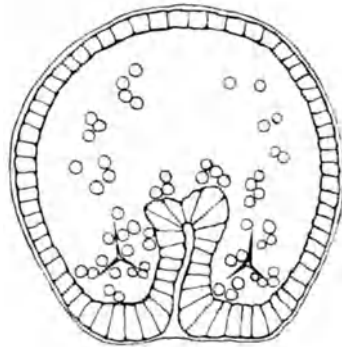


Fig. 16.
Gastrulastadium des Seeigeleies.

deren die Blastula umherschwimmt. Um diese Zeit wird die Membran durch einen noch unbekanntem Einfluß zerstört, und die Blastula, die anfangs in der Eihülle (Befruchtungsmembran)

umherschwamm, bewegt sich nun frei im Wasser. Sehr bald erhebt sie sich an die Oberfläche desselben. Der nächste Schritt in der Entwicklung ist das Gastrulastadium (Fig. 16). An einer Seite wachsen die Zellen in die Blastulahöhle, und dieser in die Höhle einwachsende Sack oder Schlauch ist die Darmanlage. Zu beiden Seiten des Darmes sieht man den Anfang der Skelettbildung in der Form von zwei Kristallen, Dreistrahlern, dargestellt. Die weiteren Entwicklungsstadien bestehen in der Gliederung des Darmes in mehrere Abschnitte und dem Auswachsen der Dreistrahler zu einem größeren Skelett. Die ursprünglich kugelförmige Larve hat jetzt eine pyramidale Form. Sie wird als Pluteus bezeichnet (Fig. 17).

Wenn man die Larven nicht füttert, so leben sie bei einer Temperatur von ungefähr 15 Grad etwa 14 bis 18 Tage. Die weitere Aufzucht ist sehr zeitraubend und schwierig, weil das richtige Futter für die Larven nicht bekannt ist. Für unsere Versuche kommt nur die Züchtung bis zum Pluteusstadium in Betracht.

Die in diesem Buche als „verbesserte Methode“ beschriebene Art der chemischen Entwicklungserregung des Eies bewirkt eine Entwicklung des unbefruchteten Seeigeleies, welche in einem großen Teil der Fälle der hier beschriebenen Form der Entwicklung des befruchteten Eies entspricht. Nur die erste Furchung zeigt gelegentlich kleine Unregelmäßigkeiten, die aber bei den späteren Furchungen verschwinden. Im ganzen kann der Leser die vorhin gegebenen Abbildungen auch der künstlichen Parthenogenese zugrunde legen.¹⁾

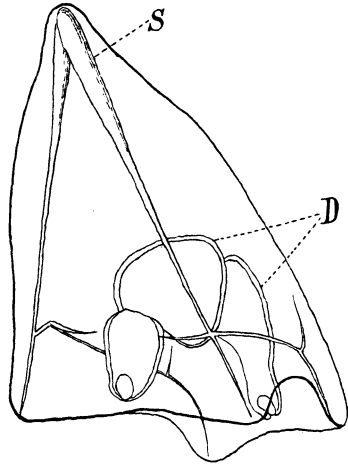


Fig. 17.
Das Pluteusstadium der Larve von *Strongylocentrotus purpuratus*.
S: Skelett. D: Darm.

¹⁾ Abbildungen von parthenogenetischen Pluteen findet der Leser außer in meinen früheren Arbeiten in der Abhandlung von A. Hagedoorn, Arch. f. Entwicklungsmechanik 27, 1909.

Die in diesem Buche beschriebenen Versuche sind an solchen Eiern angestellt, welche von den Weibchen ins Wasser abgelegt werden. Gewöhnlich findet man Weibchen und Männchen bei diesen Formen in größeren Zahlen zusammen, und an bestimmten Tagen entleeren beide Geschlechter einer Region ihre Sexualzellen gleichzeitig in den Ozean. Der letztere gleicht an solchen Tagen, an denen eine sehr verbreitete Form laicht, einer Suspension von Spermatozoen. Der enorme numerische Überschuß der Spermatozoen über die Eier bedingt, daß jedes Ei befruchtet wird. Die Behauptung, daß das Spermatozoon vom Ei chemotaktisch angelockt werde, trifft für die Befruchtung der tierischen Eier nicht zu. Ebenso wenig habe ich mich je von der Richtigkeit der Angabe überzeugen können, daß das Ei dem Spermatozoon einen Protoplasmafortsatz, den sogenannten Empfängnis-hügel, entgeschickt.

II. Zur Chemie des Befruchtungsvorganges.

Wenn wir die Frage aufwerfen, welche Erscheinung am charakteristischsten für das Leben ist, so müssen wir unbedingt die Antwort geben, daß das die Fortpflanzung und Kontinuität der Organismen ist; denn wie auch sonst die höheren und niederen Formen sich unterscheiden mögen, in diesem einen Umstand stimmen sie alle überein. Bei höheren Organismen entsteht nach der Befruchtung aus den Keimzellen ein neuer Organismus, der den Eltern gleicht, und wieder Keimzellen bildet, welche wieder befruchtet werden usf. Bei niederen Formen ist der Vorgang dahin vereinfacht, daß eine Teilung stattfindet, daß jeder Teil durch Nahrungsaufnahme wächst, und daß dann wieder eine Teilung stattfindet usf. Wenn wir uns also die Aufgabe stellen wollten, lebende Organismen künstlich herzustellen, so müßte, wie mir scheint, der Angriffspunkt für die Lösung dieses Problems in der Analyse desjenigen Vorganges liegen, welcher das ruhende Ei vom latenten zum aktiven Leben erweckt, nämlich des Befruchtungsvorganges. Tritt kein Spermatozoon in das Ei, so geht es in der Mehrzahl der Fälle rasch zugrunde; tritt ein Spermatozoon in dasselbe, so wird damit nicht nur die Anregung zur Ent-

wicklung des individuellen Eies, sondern einer unbegrenzten Reihe von Generationen gegeben, bis äußere Umstände die Art zerstören. Der Befruchtungsvorgang kann in der Tat als ein schöpferischer Akt angesehen werden.

Nun erfolgt die Befruchtung in der Natur durch einen lebenden Organismus, das Spermatozoon. Aller Mystizismus, der in der Phantasie des Laien und des Dualisten dem Worte Leben anhaftet, wird sich naturgemäß auch an die Diskussion der Befruchtung knüpfen. Die chemische Analyse des Spermatozoons ist nicht weit genug vorgeschritten, um uns einen Einblick in die Natur der Kräfte zu geben, durch welche es das Ei zur Entwicklung zwingt. Es bleibt uns daher kein anderer Weg übrig, als zu versuchen, unabhängig vom Spermatozoon, durch bekannte Kräfte die Entwicklung des Eies herbeizuführen. Auf diese Weise gewinnen wir eine Grundlage für ein physikalisch-chemisches Verständnis des Befruchtungsvorganges.

Das Spermatozoon übt zwei Arten von Wirkungen auf das Ei: erstens regt es dessen Entwicklung an, und zweitens überträgt es die väterlichen Eigenschaften auf das sich entwickelnde Ei. Es ist nun wahrscheinlich, daß die entwicklungs-erregende und die vererbende Wirkung des Spermatozoons an verschiedene Stoffe des letzteren gebunden sind. Es gelingt nämlich, die Eier des Seeigels mit dem Spermatozoon ganz fremder Arten oder Gattungen zu befruchten, z. B. von Seesternen, Schlangensterne¹⁾, Krinoiden²⁾ und selbst von Mollusken (*Mytilus*³⁾ und *Chlorostoma*⁴⁾). In allen diesen Fällen kommt es sonderbarer Weise zur Entwicklung einer typischen Seeigellarve, nämlich eines Pluteus; das Spermatozoon hat also hierbei zunächst nur eine entwicklungs-erregende, aber keine vererbende Wirkung. Gelänge es, diese Larven aufzuziehen, was nach meinen neuesten Versuchen möglich scheint, so würde sich wohl auch die vererbende Wirkung des Spermatozoons geltend machen. Jedenfalls zeigen diese Versuche aufs deutlichste,

¹⁾ Loeb, Untersuchungen zur künstlichen Parthenogenese. Leipzig 1906. S. 382—483. — Pflügers Arch. **99**, 1903; **104**, 1904.

²⁾ Godlewski, Arch. f. Entwicklungsmechanik **20**, 579, 1906.

³⁾ Kupelwieser, Biolog. Centralbl. **26**, 744, 1906.

⁴⁾ Loeb, Arch. f. Entwicklungsmechanik **26**, 476, 1908.

daß wir die entwicklungserrigende Wirkung des Spermatozoons von der vererbenden trennen müssen, und daß diese beiden Wirkungen wahrscheinlich durch verschiedene Stoffe des Spermatozoons bestimmt werden.

Wir werden nun in dieser Schrift nur die entwicklungserrigende Wirkung des Spermatozoons berücksichtigen; oder richtiger, wir werden wesentlich über Versuche berichten, durch die es gelingt, die unbefruchteten Eier wirbelloser Tiere auf chemischem Wege zur Entwicklung zu Larven zu veranlassen. Bei dieser Aufgabe aber haben wir mit einer scholastischen Schwierigkeit zu kämpfen, die durch den Einfluß der historischen Entwicklung der Physiologie entstanden ist. Alle Lebenserscheinungen sind in letzter Instanz und der Hauptsache nach chemische Vorgänge. Nun traf es sich, daß vor fünfzig Jahren die einflußreichsten Physiologen, Helmholtz, Ludwig und Du Bois, die Analyse der Lebenserscheinungen nur nach der physikalischen Seite verfolgten; sobald der Faden der Forschung in die chemische Seite führte, ließen sie ihn fallen oder schnitten sie ihn mit der Erklärung ab, daß hier eine „Reizung“ stattfinde. So lernen noch heute die Studenten, daß der Muskel, der Nerv, die Retina, die Drüsen elektrisch, thermisch, mechanisch und chemisch „reizbar“ seien. Was aber bei der elektrischen, mechanischen, thermischen Reizung im Muskel und der Retina vorgeht, wurde bis auf die neueste Zeit nicht untersucht, obwohl das gerade die wesentliche Aufgabe der Physiologie ist. Nun hat man auch die Entwicklungserregung des Eies durch ein Spermatozoon oder durch chemische Eingriffe als eine „Reizung“ des Eies bezeichnet. Man muß sich aber hüten, zu glauben, daß mit dieser Bezeichnung etwas gewonnen sei. Die wesentliche Aufgabe bleibt damit unberührt, nämlich den chemischen Charakter des Befruchtungsvorganges zu erforschen. Die Physiologie würde überhaupt gewinnen, wenn man sich entschließen wollte, das Wort Reizung temporär wenigstens aus ihrem Wortschatz fallen zu lassen und die Lebenserscheinungen ganz allgemein so zu erforschen, als ob es nur Chemie und Physik, aber keine „Reizung“ gäbe.

Die Entwicklungserregung des tierischen Eies durch chemische Mittel ist demnach der wesentliche Gegenstand dieser Schrift. Wir haben bereits einige der morphologischen Manifestationen

der Entwicklung im vorigen Abschnitt besprochen. Wir wollen nun in diesem Kapitel etwas näher auf die chemischen Vorgänge eingehen, welche diese morphologischen Erscheinungen begleiten oder bedingen. Das ist um so nötiger, als man dieses Kapitel bisher den Morphologen überlassen hat, denen natürlich die Erforschung der chemischen Seite fern liegt.

Wir müssen vorausschicken, daß die Entwicklungserregung sich etwas verschieden gestaltet, je nach dem „Reifezustand“, in dem das Ei sich befindet. Was wir unter „Reifezustand“ hier verstehen, wird klar durch die Entstehungsgeschichte des Eies. Dieselbe ist nach Boveri wie folgt. Aus einem Ur-Ei im jungen Organismus entwickeln sich durch Teilung eine größere Zahl von „Oogonien“. Diese Oogonien nehmen an Masse zu und bilden die „Oozyte“ oder das „unreife Ei“. Durch den „Reifungsprozeß“ entsteht aus dem „unreifen Ei“ das „reife“ Ei.

Dieser Reifungsprozeß besteht wesentlich darin, daß der relativ große Kern des unreifen Eies sich zweimal hintereinander teilt und daß jedesmal ein Teilstück des Kerns mit etwas Protoplasma aus dem Ei ausgestoßen wird. Die ausgestoßene kleine Masse wird als Polkörperchen bezeichnet. Der relativ große Kern des unreifen Eies wird also bei der „Reifung“ an Masse reduziert. Es versteht sich von selbst, daß das alles nur eine äußerliche Beschreibung eines Vorgangs ist, der chemisch und physikalisch kompliziert ist und noch einer besonderen Analyse bedarf. Auf die chemische Seite des Reifevorganges werden wir später noch zurückkommen.

Bei den Eiern gewisser Tiere, z. B. des Seeigels, tritt die Reifung der Eier im Eierstock ein, und dieselben verfallen nach der Reifung in einen Ruhezustand, aus dem sie erst durch Eintritt des Spermatozoons geweckt werden. Gelangt kein Spermatozoon ins Ei, so geht es relativ rasch zugrunde. Bei anderen Tieren wird das Ei im Oozytenstadium abgelegt, und das Spermatozoon dringt in das unreife Ei. Der Eintritt des Spermatozoons wird dann nicht nur die Ursache der Entwicklung, sondern auch noch die Ursache der Reifung des Eies. So verhalten sich die Eier gewisser Anneliden, beispielsweise *Thalassema*, *Polynoe* und *Chaetopterus*.

Der Umstand, daß das Spermatozoon in manchen Eiern

neben der eigentlichen Entwicklungserregung auch noch eine Wirkung auf einen anderen Vorgang, nämlich die Reifung des Eies, d. h. die Ausstoßung der Polkörperchen hat, ist von Wichtigkeit für das Verständnis der Wirkung des Spermatozoons. Bei der Reifung des Eies findet eine Kernteilung statt; bei der Entwicklung des reifen Eies finden ebenfalls Kernteilungen statt, aber an diese Kernteilungen schließt sich ein Anwachsen der Kernmasse. Diese letztere Erscheinung ist so ausgesprochen, daß man das Anwachsen der Kernmasse geradezu in den Mittelpunkt der chemischen Vorgänge stellen kann, welche durch das Spermatozoon angeregt werden.

Nach der Befruchtung hat das Ei nur einen Kern mit einer bestimmten Zahl von Chromosomen. Infolge der Befruchtung findet alsbald eine Teilung desselben in zwei Kerne statt, wobei jedes Chromosom des Mutterkerns sich der Länge nach teilt und je ein Paarling in einen der beiden Tochterkerne übergeht. Der neue Tochterkern hat also die halbe Masse der Chromatinsubstanz des Mutterkerns. Ehe diese beiden Kerne sich aber von neuem teilen, wächst die Masse jedes ihrer Chromosomen auf die Masse der ursprünglichen Mutterchromosome (Boveri¹). Es muß also jedes Chromosom inzwischen auf das Doppelte seiner Masse gewachsen sein. Dieser Vorgang der Kernteilung und Zellteilung wiederholt sich dann periodisch, so daß also der Reihe nach im Ei 2, 2², 2³, 2⁴ . . . 2ⁿ Kerne entstehen, von denen jeder, nach Boveri, genau so groß wird, wie der ursprüngliche Kern, von dem aus das Ei seine Entwicklung begann. Da das letztere nun während dieser Furchung kein Nährmaterial von außen aufnimmt — wenigstens ist das für die sich im Wasser entwickelnden Eier der Fall — so kann diese Zunahme von Kernmaterial nur auf Kosten gewisser im Zytoplasma enthaltener Bestandteile stattfinden.²) Dieser Prozeß der Kernbildung kommt zu einem vorläufigen Stillstand, wenn ein bestimmtes (chemisches) Gleichgewicht zwischen dem Protoplasma und Kernmaterial eingetreten ist. Um diese Zeit aber ist bei der tierischen Larve der Darmapparat entwickelt,

¹) Boveri, Zellenstudien, Heft 5, Jena 1905.

²) Näheres hierüber findet der Leser in meinem Buche über „Die Dynamik der Lebenserscheinungen“. Leipzig 1906. S. 98.

und die Nahrungsaufnahme von außen kann beginnen. Neues Reservematerial oder auch neues „Zytoplasma“ kann gebildet werden, neues Kernwachstum, neue Kern- und Zellteilungen können eintreten, und die Larve kann sich weiter entwickeln und an Masse und Zahl der Zellen zunehmen.

Wir sehen also, daß die Synthese von spezifischem Kernmaterial (nukleinsäuren Salzen) aus gewissen Bestandteilen des Zytoplasmas die Grundlage des Entwicklungs- und Wachstumsprozesses bildet.

Die Einleitung der Nukleinsynthese durch das Spermatozoon ist also nicht ohne weiteres identisch mit der Anregung der Kernteilung oder der Eireifung. Das ist durch die Versuche über künstliche Parthenogenese auch direkt bewiesen worden. Ich habe gezeigt, daß die Reifung des Seesterneies und des Eies von Polynoe durch eine alkalische Reaktion der Lösung begünstigt wird, daß aber eine schwach saure Reaktion die Reifung hemmt. Umgekehrt aber ist es möglich, das reife Seesternei durch Säure zur Entwicklung anzuregen.

Beide Vorgänge aber, sowohl die der Reifung und Kernteilung zugrunde liegenden, als auch diejenigen, auf denen die Nukleinsynthese beruht, erfordern freien Sauerstoff.

Ich habe nun vor zehn Jahren gezeigt, daß, wenn man dem frisch befruchteten tierischen Ei (Seeigelei und Fischei) allen Sauerstoff entzieht, keine Kern- und keine Zellteilung möglich ist.¹⁾ Godlewski²⁾ und Samassa³⁾ haben dasselbe für das Froschei gefunden, und ich habe seither mich überzeugt, daß das für alle Eier gilt. Es gilt ebenfalls auch für die Eireifung, wie wir später sehen werden.

Bei diesen Versuchen der Hemmung der Entwicklung durch Sauerstoffmangel muß man sich vor einer Fehlerquelle hüten, die darin besteht, daß es stets erst einige Zeit dauert, bis die Luft oder der Sauerstoff aus dem Gefäß, in dem das Ei sich befindet, ausgetrieben ist. Da nun bei vielen Formen, wenn

¹⁾ Loeb, Die physiologischen Wirkungen des Sauerstoffmangels, Pflügers Arch. **62**, 249, 1895.

²⁾ Godlewski, Die Einwirkung des Sauerstoffs auf die Entwicklung von Rana usw., Arch. f. Entwicklungsmechanik **11**, 585, 1901.

³⁾ Samassa, Verhdl. d. naturh.-med. Vereins zu Heidelberg **4**, 1898, u. Verhdl. d. deutsch. Zool. Gesellsch. **1896** (zitiert nach Godlewski).

die Temperatur genügend hoch ist, die erste Kernteilung in weniger als einer Stunde erfolgt, und da es oft ebenso lange oder noch länger dauert, bis aller Sauerstoff durch Wasserstoff verdrängt ist, so kann es leicht vorkommen, daß bei solchen Versuchen noch eine Kernteilung oder sogar eine Zellteilung erfolgt, nachdem das Ei dem Wasserstoffstrom ausgesetzt war.¹⁾ Ich vermied diese Fehlerquelle dadurch, daß der Raum, in dem die Eier sich befanden, so lange durch Eis auf 0° abgekühlt wurde, als nach den vorausgegangenen Versuchen nötig schien, um allen Sauerstoff durch Wasserstoff zu verdrängen. Bei dieser Temperatur war die Geschwindigkeit der chemischen Vorgänge im Ei fast auf Null reduziert. Erhöhte man dann die Temperatur wieder, so trat keine Furchung des befruchteten Eies in der Wasserstoffatmosphäre ein; ließ man aber wieder Luft in den Behälter eintreten, so traten die Kern- und Zellteilungsvorgänge ein. Vielleicht noch schlagender kann man den Nachweis führen, daß Oxydation die Voraussetzung der Nukleinsynthesen ist, wenn man die Oxydationsvorgänge durch besondere Gifte hindert. Es ist seit langer Zeit bekannt, daß die Oxydationsvorgänge in den Zellen (bei der Gegenwart von Sauerstoff) durch den Zusatz von kleinen Quantitäten von Zyankalium gehemmt werden. Ich habe gefunden, daß der Zusatz von $\frac{1}{2}$ ccm einer $\frac{1}{20}$ proz. KCN-Lösung zu 50 ccm Seewasser ausreicht, um die Wirkung des Spermatozoons im befruchteten Seeigeli fast sofort zum Stillstand zu bringen.²⁾ Sobald aber solche Eier in normales Seewasser übertragen werden und sobald für gute Durchlüftung desselben gesorgt wird, kann deren Entwicklung weitergehen, vorausgesetzt, daß die Eier nicht zu lange in der zyankaliumhaltigen Lösung verweilt hatten.

Aus diesen Tatsachen hatte ich dann den Schluß gezogen,

¹⁾ Man darf im allgemeinen nicht ohne weiteres auf die Bedeutungslosigkeit des Sauerstoffs schließen, wenn es nicht gelingt, nach kurzer Durchlüftung eines Raumes mit Wasserstoff oder Stickstoff alle Lebenserscheinungen zum Stillstand zu bringen. Man darf nicht vergessen, daß es lange dauert, bis mit diesen Methoden die letzten Spuren von Sauerstoff ausgetrieben sind, und daß oft Spuren von Sauerstoff genügen, um die betreffenden Lebenserscheinungen zu ermöglichen.

²⁾ Loeb, Über den chemischen Charakter des Befruchtungsvorganges, Biochem. Zeitschr. **1**, 183, 1906.

daß eine wesentliche Wirkung des Eindringens des Spermatozoons ins Ei in der Anregung oder Beschleunigung von Oxydationsvorgängen bestehe.¹⁾ Auch im reifen unbefruchteten Ei gehen Oxydationsvorgänge vor sich, was beispielsweise dadurch bewiesen wird, daß das reife unbefruchtete Ei von Polynoe rasch zugrunde geht, während es durch Zyankaliumvergiftung vor diesem Zerfall bewahrt bleibt. Neuerdings hat O. Warburg Messungen des Sauerstoffverbrauchs beim befruchteten und unbefruchteten Seeigeli ange stellt und gefunden, daß durch die Befruchtung der Sauerstoffverbrauch des Eies auf das 6—7fache steigt. Er bestimmte die Masse der Eier indirekt, nämlich durch Messung ihres Stickstoffgehaltes nach Kjeldahl. Er fand, daß 28 mg N pro Stunde bei 20° 0,05 bis 0,06 mg Sauerstoff verbrauchen. Nach der Befruchtung verbrauchen sie sechs- bis siebenmal soviel.²⁾

Wolfgang Ostwald hat gezeigt, daß die Froscheier und Spermatozoen Oxydasen enthalten.³⁾

Die Beobachtung, daß bei Mangel von Sauerstoff, oder bei Zusatz von Zyankalium der Kern des Eies unverändert bleibt, beweist, daß Oxydationsvorgänge nicht nur die Vorbedingung der mechanischen Vorgänge der Kern- und Zellteilung sind, sondern auch der chemischen Prozesse der Nukleinsynthese; denn sonst müßte ja bei Sauerstoffabschluß das Wachstum der Chromosomen und die Vermehrung der Kernmasse unbegrenzt weitergehen, was aber nicht der Fall ist. In Parenthese dürfen wir bemerken, daß mit der Erkennung dieser Rolle des Sauerstoffs ein altes Rätsel seine Lösung findet. Seit Lavoisier und Laplace's denkwürdigen Untersuchungen hat man die Bedeutung der Oxydationen und der Atmung für das Leben der Tiere immer dadurch zu erklären versucht, daß man die Atmung als Ursache der Wärmebildung hingestellt hat. Als Moritz Traube den Nachweis führte, daß die Samen für ihre Keimung Sauerstoff nötig haben, wies er darauf hin, daß die Notwendigkeit des Sauerstoffs für die Wärmebildung der Warmblüter nicht die allgemeine Bedeutung des Sauerstoffs für die Kaltblüter

¹⁾ Loeb, Vorrede zu „Untersuchungen über künstliche Parthenogenese“. Leipzig 1906.

²⁾ O. Warburg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 57, 6, 1908.

³⁾ Wolf. Ostwald, Biochem. Zeitschr. 6, 409, 1907.

erklärt.¹⁾ Die Tatsache, daß die Nukleinsynthese aller Entwicklung und allem Wachstum bei Tieren und Pflanzen zugrunde liegt und daß alle diese Vorgänge sowie die Kernteilung nur in Gegenwart von freiem Sauerstoff möglich sind, ergibt eine breitere Grundlage für das Verständnis der Bedeutung des Sauerstoffs für die Lebenserscheinungen, als die bloße Berücksichtigung der Wärmebildung, die ja nur für eine sehr kleine Gruppe von Organismen von Bedeutung ist. Wie es aber kommt, daß ohne freien Sauerstoff die Vorgänge der Kernteilung und der Nukleinsynthese im befruchteten Ei unmöglich sind, kann man bei dem gegenwärtigen Stand unseres Wissens nicht bestimmt angeben.

Es läßt sich nun nachweisen, daß die Oxydationsprozesse nicht die einzigen Vorgänge sind, die der Kernsynthese zugrunde liegen. Im Ei müssen vielmehr durch die Befruchtung Prozesse angeregt resp. beschleunigt werden, welche auch bei Sauerstoffabschluß vor sich gehen. Bringt man nämlich befruchtete Eier in Seewasser, das keinen freien Sauerstoff enthält, so entwickeln sie sich nicht; sie entwickeln sich aber, wenn man sie hinterher in durchlüftetes Seewasser bringt: vorausgesetzt, daß sie nicht zu lange in dem sauerstofffreien Seewasser bleiben. Eier, welche nach der Befruchtung in sauerstofffreies Seewasser gebracht wurden und hier 24 Stunden bei 15° verweilten, furchten sich zwar noch, wenn sie in sauerstoffhaltiges Seewasser zurückgebracht wurden, waren aber nicht mehr imstande, sich über das Blastulastadium hinaus zu entwickeln. Bringt man aber die unbefruchteten Eier desselben Weibchens und bei derselben Temperatur 24 Stunden lang in sauerstofffreies Seewasser und setzt man nach der Übertragung der Eier in normales Seewasser Samen zu, so entwickeln sich solche Eier zu völlig normalen Blastulen, Gastrulen und Pluteen. Die befruchteten Eier leiden übrigens schon erheblich, wenn sie nur 4 Stunden bei ungefähr 15° C in dem sauerstofffreien Seewasser bleiben. Ebenso klar sind die Resultate, wenn man die Oxydationen der Eier dadurch hemmt, daß man dem Seewasser etwas Zyankalium zusetzt. Unbefruchtete und befruchtete Eier desselben Weibchens wurden in je eine Schale mit 50 ccm Seewasser

¹⁾ Moritz Traube, Gesammelte Abhandlungen. Berlin 1899. S. 148.

+ 2 ccm $\frac{1}{20}$ proz. KCN-Lösung gebracht.¹⁾ Nach verschiedenen Intervallen wurden Proben dieser Eier in normales Seewasser zurückgebracht. Zu den unbefruchteten Eiern wurde nach dem Übertragen derselben in das normale Seewasser Samen zugesetzt. Die Eier, welche unbefruchtet in zyankaliumhaltigem Seewasser gewesen waren, entwickelten sich noch nach zweitägigem Verweilen in der Lösung in normaler Weise, während die Eier, welche vor dem Einbringen in das zyankaliumhaltige Seewasser befruchtet worden waren, bereits nach 24stündigem Aufenthalt in dieser Lösung nicht mehr imstande waren, sich über das Blastulastadium hinaus zu entwickeln. Schon ein 4—5stündiges Verweilen im zyankaliumhaltigen Seewasser schädigt die befruchteten Eier sehr merklich, was sich darin zeigte, daß solche Eier nach dem Übertragen in normales Seewasser sich zwar entwickelten, daß aber viele Larven während der ersten zwei Tage starben und daß die Larven am Boden der Gefäße schwammen, anstatt sich zur Oberfläche zu erheben.²⁾

Diese Versuche lassen keinen Zweifel daran, daß die Befruchtung Anlaß zu einer Klasse von chemischen Reaktionen im Ei gibt, die auch unabhängig von den Oxydationsprozessen weitergehen können. An anderer Stelle habe ich auseinandergesetzt³⁾, daß Spaltungsvorgänge zugleich Oxydationsvorgänge erfordern. Finden in den Zellen Spaltungsvorgänge statt, die zur Bildung von schädlichen oxydablen Stoffen, z. B. Milchsäure, führen, so kann man verstehen, warum der Sauerstoffmangel zum Tode der Zelle führen muß; ohne Sauerstoff gehen diese Hydrolysen weiter und die schädlichen Stoffe, welche bei Gegenwart von Sauerstoff rasch durch Oxydation unschädlich gemacht (oder in eliminierbare Stoffe wie CO_2 verwandelt) werden, können sich nun in der Zelle anhäufen. Nehmen wir an, daß im Ei durch die Befruchtung derartige Spaltungen angeregt werden, so können wir verstehen, warum das befruchtete Ei rascher bei Sauerstoffmangel oder Unterdrückung der Oxydationen durch Zyankalium

¹⁾ Eine solche Lösung hemmte die Nukleinsynthese und die Furchung der befruchteten Eier.

²⁾ Loeb, Versuche über den chemischen Charakter des Befruchtungsvorganges, *Biochem. Zeitschr.* **1**, 183, 1906.

³⁾ Vorlesungen über die Dynamik der Lebenserscheinungen, S. 42.

leidet als das unbefruchtete Ei, da in dem letzteren keine oder nur relativ geringe Hydrolysen stattfinden.

Wir wollen nunmehr einen Blick auf die Nukleinsynthese werfen, in der wir die wesentliche Wirkung der Entwicklungs-erregung sehen, und die Frage stellen, ob in der Tat derartige Spaltungsprozesse Vorbedingung der Nukleinsynthese sind. Die Zellkerne bestehen fast ausschließlich aus einem Salz der Nukleinsäure, wobei gewisse Eiweißstoffe, Protamine und Histone (oder ähnliche Körper) das Kation oder den basischen Bestandteil bilden. Die Nukleinsäure ist nun derjenige Körper, der unser Interesse bei der Synthese von Kernmaterial aus Bestandteilen des Zytoplasmas — oder den in letzterem enthaltenen Reservestoffen — hier besonders erweckt. Das Skelett der Nukleinsäure¹⁾ scheint eine Phosphorsäure zu sein, an die sich mindestens zwei weitere chemische Gruppen angliedern; die eine Gruppe sind Purinbasen, nämlich Adenin und Guanin, und möglicherweise andere Repräsentanten derselben Gruppe; die zweite Gruppe sind Kohlenhydrate, eine Pentose und eine Hexose. Da es uns hier nicht auf die chemische Diskussion aller Einzelheiten der Konstitution der Nukleinsäure ankommt, so möge das Erwähnte genügen; zur Ergänzung fügen wir noch eine schematische Darstellung der Konstitution nach Burian bei, von welchem Schema aber Burian selbst sagt, daß es nicht völlig zutreffend sein kann, da es 41 (statt 40) Kohlenstoffatome für das Nukleinsäuremolekül gibt.

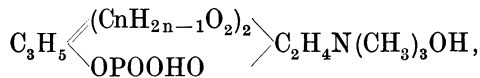


Wo kommt nun das phosphorsäurehaltige Skelett der Nukleinsäure her? Diese Frage muß bei der Diskussion der Nukleinsynthese entschieden werden. Der Kopf der Spermatozoen ist bekanntlich ebenfalls ein Zellkern und besteht wie die Kerne anderer Zellen fast gänzlich aus nukleinsäurem Protamin oder Histon. Miescher untersuchte die Entstehung des Samens beim Lachs vom chemischen Gesichtspunkte aus und fand, daß

¹⁾ Eine treffliche Zusammenstellung der Tatsachen dieses Gebietes gibt Burian, Chemie der Spermatozoen, *Ergebn. d. Physiol.*, 5. Jahrg. 1906.

der Lezithingehalt des Blutes während der Spermatogenese relativ sehr groß ist, und daß vermutlich das Lezithin das Bildungsmaterial für die Nukleinsäure der Spermatozoen-Köpfe ist.

Was nun für die Bildung der Nukleinsäure des Spermatozoons zutrifft, trifft wahrscheinlich auch für die Bildung der Nukleinsäure im Ei zu. Schon Hoppe-Seyler hat auf die Tatsache aufmerksam gemacht, daß alle jungen, rasch wachsenden Zellen relativ viel Lezithin enthalten. Das ist besonders für das Ei der Fall. Andererseits ist durch Versuche von Kossel¹⁾ am Hühnerei gezeigt worden, daß der Dotter desselben keine Nukleinsäure vorgebildet enthält, und das gleiche hat Tichomirow²⁾ für den Nahrungsdotter der Eier des Seidenspinners nachgewiesen. Da nun beim Ei nach der Befruchtung eine rasche Synthese von Kernmaterial auf Kosten gewisser Protoplasmabestandteile resp. des Nahrungsdotters entsteht, da der letztere an Lezithin reich ist, welches bei der Nukleinsynthese verschwindet, so kann man wohl daran denken, daß das Lezithin das Material für einen Teil der Nukleinsäure liefert. Dazu aber ist es nötig, daß das Lezithinmolekül erst eine Spaltung erleidet. Das Lezithin hat die Zusammensetzung



d. h. es besteht aus zwei Hauptgruppen, Cholin und Distearin- (resp. Olein- usw.) Glycerinphosphorsäure. Das Cholin ist offenbar nicht für den Aufbau der Nukleinsäure brauchbar, wohl aber ist das für die phosphorsäurehaltige Gruppe möglich. Burian erwähnt im Anschluß an eine Hypothese von Steudel die Möglichkeit, daß die Glycerinphosphorsäure des Lezithins zur Bildung der Kohlenhydratphosphorsäure des Nukleins dient. Es ist also klar, daß der Synthese der Nukleinsäure bei dieser Annahme eine Spaltung des Lezithins und eine Verseifung der Distearinglyzerinphosphorsäure voraufgehen muß. Hier ist demnach eine hinreichende Chance für das Stattfinden von hydrolytischen Prozessen im befruchteten Ei gegeben.

¹⁾ A. Kossel, Weitere Beiträge zur Chemie des Zellkerns, Zeitschr. f. physiol. Chem. **10**, 248, 1886.

²⁾ Tichomirow, Chemische Studien über die Entwicklung der Insekten-Eier, Zeitschr. f. physiol. Chem. **9**, 518, 1885.

Über die Entstehung der Puringruppen der Nukleinsäure, die, wie Kossel gezeigt hat, ebenfalls erst während der Entwicklung im Hühnerei gebildet werden, bestehen einstweilen nur Vermutungen, auf welche wir hier nicht einzugehen brauchen. Es ist ferner durchaus möglich, daß bei dem Aufbau der Nukleinsäure oxydative Synthesen stattfinden. Das könnte erklären, warum beim Fehlen des Sauerstoffs keine Nukleinsynthese im befruchteten Ei möglich ist. Es ist aber auch verständlich, daß beim Fehlen des Sauerstoffs etwaige durch die Befruchtung veranlaßte resp. beschleunigte Hydrolysen, z. B. des Lezithins, zur Bildung von schädlichen Stoffen führen, welche bei Gegenwart von freiem Sauerstoff in irgend einer Weise unschädlich gemacht werden: sei es, daß sie durch oxydative Synthese zur Bildung nützlicher Verbindungen benutzt oder sei es, daß sie zu leicht diffundierbaren Stoffen (wie CO_2) verbrannt werden.

Solche Spaltungen und Synthesen, wie sie zur Nukleinsynthese nötig sind, erfordern die Gegenwart einer Reihe von Enzymen, die wir einstweilen nicht kennen. Wohl aber kennen wir einen anderen Umstand, der vielleicht, aber nicht notwendigerweise, mit diesen Enzymwirkungen zusammenhängt. Wenn wir uns eine neutrale Lösung von NaCl , CaCl_2 und KCl herstellen, in dem Verhältnis und mit dem osmotischen Druck, in welchem diese Salze im Seewasser enthalten sind, so entwickeln sich frisch befruchtete Eier des Seeigels in einer solchen Lösung im allgemeinen nicht. Die Eier fangen an sich zu teilen, sie gehen aber meist nicht über das 2- bis 8-Zellstadium hinaus. In seltenen Fällen mögen sich auch einige Eier weiter entwickeln. Fügt man aber nur 0,1 bis 0,2 ccm $\frac{n}{100}$ NHO zu 50 ccm jener Lösung, so entwickeln sich alle Eier bis zum Blastula- oder Gastrulastadium. Die zugesetzte Alkalimenge ist ungemein klein. Das Merkwürdigste ist nun die Tatsache, daß eine so geringe Menge Alkali alsbald durch die CO_2 der Luft (und die in den Eiern gebildete CO_2) neutralisiert wird, was darauf hinweist, daß das Alkali nur für die erste Zeit der Entwicklung nötig ist.¹⁾ Die optimale Anfangs-

¹⁾ Loeb, Über die Ursachen der Giftigkeit einer reinen Chlornatriumlösung und ihrer Entgiftung durch K und Ca. Biochem. Zeitschr. 2, 81, 1906.

konzentration der HO-Ionen für die Entwicklung von *Strongylocentrotus purpuratus* ist höher als die erwähnte, nämlich nahezu $= 4 \times 10^{-4}$ normal. Es ist nötig, daß bei solchen Versuchen die Eier, ehe sie in diese Lösungen gebracht werden, vorher in neutralen Lösungen gründlich gewaschen werden, um sie von den letzten Spuren von Seewasser zu befreien, das ja leicht alkalisch ist.

Ob nun die HO-Ionen hier nur katalytisch wirken¹⁾ oder ob sie zur Neutralisation einer Säure oder sonstwie zu einer chemischen Reaktion dienen, muß durch weitere Versuche ermittelt werden.

Was nun die Chemie des Spermatozoons betrifft, so gibt sie uns einstweilen keine Daten, aus denen wir einen Schluß auf das Wesen des Befruchtungsvorganges ziehen könnten. Der Kopf des Spermatozoons ist wesentlich ein Zellkern und besteht aus denselben Stoffen wie jeder andere Zellkern, nämlich einem Nukleinsalz (mit einem protamin- oder histonähnlichen Körper als Base und einer sehr kleinen Masse eines anscheinend eisenhaltigen Eiweißkörpers). Der Schwanz des Spermatozoons enthält Lecithin, daneben wahres Fett und Cholesterin, ferner Eiweißkörper. Aber nach mündlicher Mitteilung meines Kollegen Taylor enthält auch der Kopf Fett. Es ist völlig unmöglich, aus diesen und ähnlichen Daten einen Schluß auf die durch das Eindringen des Spermatozoons in dem Ei ausgelösten oder beschleunigten Vorgänge zu ziehen. Um eine weitere Einsicht in das Wesen des Befruchtungsvorganges zu gewinnen, war es nötig, einen anderen Weg zu betreten, nämlich chemische Methoden zu finden, durch welche wir die befruchtende Wirkung des Spermatozoons in allen Einzelheiten nachahmen können. Ehe wir nun die Resultate, die auf diesem Wege gefunden worden sind, schildern, wollen wir kurz auf die Tatsache der natürlichen Parthenogenese eingehen. Die Eier gewisser Formen sind nämlich imstande, sich ohne Befruchtung zu entwickeln, und diese spontane Entwicklung wird als Parthenogenese bezeichnet. Wir wollen auf diese natürliche Parthenogenese so weit eingehen, als für das Verständnis der chemischen Entwicklungserregung nötig erscheint.

¹⁾ Z. B. zur Beschleunigung von Oxydationen, worauf beispielsweise Manchots Arbeiten hinweisen.

III. Die spontane Entwicklung unbefruchteter Eier (natürliche Parthenogenese).

Lange bevor die Bedeutung des Spermatozoons bei der Befruchtung richtig erkannt war, hatten Réaumur, Bonnet und eine Reihe anderer Autoren des 18. Jahrhunderts die Tatsache festgestellt, daß Blattläuse ohne Begattung lebendige Junge zur Welt bringen. Bei geeigneter Temperatur und Feuchtigkeit können, wie Kirby fand¹⁾, vier Jahre lang (möglicherweise beliebig lange) die parthenogenetischen Generationen bei Aphiden einander folgen, ohne daß es zur Bildung von Männchen überhaupt kommt. Nur unter besonderen Bedingungen gebären die Blattläuse beide Geschlechter, die sich dann begatten. Diese Begattung führt zur Eiablage und aus diesen Eiern entstehen ausschließlich lebendig gebärende parthenogenetische Weibchen.

Die bei den Aphiden leicht festzustellende Tatsache, daß junge Tiere ohne Befruchtung entstehen können, veranlaßte die Entomologen, sich nach weiteren Fällen von Parthenogenese umzusehen. Es stellte sich bald heraus, daß gewisse Schmetterlinge, zur Gattung *Solenobia* gehörend, unbefruchtete Eier ablegen²⁾, die sich völlig normal wieder zu Schmetterlingen entwickeln. v. Siebold, der diese Versuche wiederholte und bestätigte, fand auch parthenogenetische Fortpflanzung bei einem anderen Schmetterling, *Psyche helix*³⁾, bei dem Männchen zur Zeit von v. Siebold überhaupt nicht bekannt waren. In allen diesen Fällen waren die aus unbefruchteten Eiern entstehenden Larven nicht nur normal, sie entwickelten sich auch zu einem völlig normalen geschlechtsreifen Insekt.

Das größte Aufsehen aber erregten die Beobachtungen von Dzierzon über die Parthenogenese bei Bienen.⁴⁾ Dzierzon wurde zu dem Schlusse geführt, daß die männlichen Bienen

¹⁾ Zit. nach Ratzeburg, Die Forstinsekten, 3. Teil, 1844.

²⁾ Diese Tatsache scheint De Geer zuerst festgestellt zu haben, wie wir aus v. Siebolds Monographie entnehmen.

³⁾ v. Siebold, Wahre Parthenogenesis bei Schmetterlingen und Bienen. Leipzig 1856.

⁴⁾ Nach v. Siebold veröffentlichte Dzierzon seine Beobachtungen und Schlüsse zuerst im Jahre 1845 (in der Eichstädter Bienenzeitung).

— die Drohnen — aus unbefruchteten Eiern entstehen, die Arbeiterinnen und Königinnen dagegen aus befruchteten Eiern. Er stellte fest, daß die Königin nur einmal im Leben die Kopulation ausführt und daß dieses nie im Stock, sondern in der Luft, bei dem sogenannten Hochzeitsfluge, erfolgt. Der Same bleibt nach der Begattung in einem Bläschen, dem Rezeptakulum des Weibchens, an dessen Ausführungsgang das Ei, wenn es gelegt wird, vorbeipassiert. Wenn nun die Königin das Ei in eine Arbeiterinnenzelle legt, so wird, wenn dasselbe die Öffnung des Ausführungsganges des Rezeptakulums passiert, eine Spur Samen aus dem Rezeptakulum ausgepreßt und das Ei befruchtet. Legt die Königin aber ein Ei in eine geräumigere Drohnenzelle, so passiert das letztere den Ausführungsgang, ohne daß Samen ausgepreßt wird. v. Siebold stellt sich vor, daß die Biene wissentlich handle; es dürfte sich aber eher darum handeln, daß in der engeren Arbeiterinnenzelle reflektorisch oder mechanisch die Muskeln, welche das Rezeptakulum entleeren, in Tätigkeit gesetzt werden, während der mechanische Reiz hierzu in der weiteren Drohnenzelle ausbleibt.¹⁾ Dzierzon konnte zum Beweise seiner Ansicht eine Reihe von Beobachtungen anführen, so beispielsweise, daß Königinnen, die durch mangelhafte Flügelentwicklung am Hochzeitsflug gehindert werden, ausnahmslos Drohnen hervorbringen; daß dasselbe bei alten Königinnen der Fall ist, die fortfahren, Eier zu legen, wenn das Rezeptakulum keinen Samen mehr enthält; und daß Arbeiterinnen, die infolge rudimentärer Ausbildung der Geschlechtsorgane die Begattung nicht ausführen können, gelegentlich Eier legen, aus denen sich aber ausnahmslos Männchen entwickeln.

Dzierzons Ansichten und Beobachtungen wurden durch die Untersuchungen von v. Siebold, Leuckart und v. Berlepsch bestätigt und ergänzt.²⁾

Unter den Seidenzüchtern waren wiederholt Stimmen laut geworden, welche behaupteten, daß auch *Bombyx mori* sich aus unbefruchteten Eiern entwickeln könne, und die Beobach-

¹⁾ Nach neueren Versuchen von E. Bresslau kommen noch weitere Komplikationen in Betracht.

²⁾ Die neuerdings laut gewordenen Behauptungen über die Unrichtigkeit von Dzierzons Schlüssen scheinen sich als irrig erwiesen zu haben.

tungen, welche von v. Siebold selbst hierüber angestellt worden sind und welche andere im Anschluß an ihn angestellt haben, haben zu merkwürdigen Resultaten geführt. Schon im Jahre 1838 hatte Herold mitgeteilt, daß auch ein gewisser Prozentsatz der unbefruchteten Eier des Seidenspinners anfängt sich zu entwickeln, daß aber im Unterschied zu den befruchteten Eiern die Entwicklung der unbefruchteten auf den ersten Stadien stehen bleibt, und daß es bei solchen parthenogenetischen Eiern nie bis zur Bildung von Raupen kommt.¹⁾ v. Siebold setzte sich mit dem Herausgeber der Bienenzeitung, dem Seminarlehrer Schmid, in Verbindung, der ein erfahrener Züchter von Seidenspinnern war. Schmid und v. Siebold²⁾ beobachteten das Ausschlüpfen von Raupen aus unbefruchteten Eiern von *Bombyx mori*, und diese Raupen entwickelten sich zu geschlechtsreifen Tieren. Aber die Resultate anderer Beobachter blieben zum Teil widersprechend. Alle fanden, daß die ersten Entwicklungsstadien auch bei den unbefruchteten Eiern eintraten, aber in den meisten Fällen starben die Eier während des Winters ab. Im Jahre 1871 kam v. Siebold wieder auf die Frage der Parthenogenese von *Bombyx mori* zurück³⁾ und erwähnt die Versuche von Barthélemy. Dieser Autor fand, daß bei den unbefruchteten Eiern von *Bombyx mori* die Entwicklung sehr viel später eintritt als bei den befruchteten. „Auch die Anzahl derjenigen unbefruchteten Eier, bei denen durch parthenogenetische Entwicklung wirklich das Ausschlüpfen von Räumchen erreicht wird, zeigt sich außerordentlich schwankend, nur einmal kam unter Barthélemys Versuchen der Fall vor, daß fast alle unbefruchteten Eier einer Seidenspinner-Jungfrau zur Entwicklung gekommen sind, während jene Fälle, in welchen alle unbefruchtet gelegten Eier bei *Bombyx mori* steril bleiben, sehr häufig vorkommen. Da, wo es unter den von einem jungfräulichen Seidenspinner gelegten Eiern bis zu einer Entwicklung kommt, sind es meistens nur drei bis vier Eier, welche das letzte Entwicklungsstadium, das heißt das Ausschlüpfen eines Räumchens, zustande bringen, die übrigen

¹⁾ Nach v. Siebold.

²⁾ v. Siebold loc. cit.

³⁾ v. Siebold, Beiträge zur Parthenogenese der Arthropoden. Leipzig 1871. S. 232.

bleiben auf den verschiedenen früheren Entwicklungsstufen stehen und vertrocknen.“ Ferner bemerkte Barthélemy, daß die aus jungfräulichen Seidenspinnern hervorgegangenen Zuchten sich ebenso kräftig und wohlbeschaffen erwiesen, als die unter dem Einfluß von männlichen Spinnern erzeugten Zuchten; auch äußern diese aus jungfräulichen Spinnern entsprungenen Individuen einen ganz normalen Geschlechtstrieb. Sehr wichtig und bedeutungsvoll war Barthélemys Erfahrung, daß nur solche jungfräuliche Spinnerweibchen, welche von Sommerzuchten herrührten, parthenogenetische Brut, und zwar noch in demselben Jahre, liefern, und daß dagegen überwinterte parthenogenetische Eier weder von Sommerzuchten noch von Herbstzuchten Brut erzeugen. v. Siebold führt Beobachtungen von sich selbst und Schmid an, welche die letztere Vermutung von Barthélemy zum Teil wenigstens bestätigen.

Diese Versuche an Seidenspinnern sind für uns von besonderem Interesse, weil es sich hier um eine Übergangsform in dem Sinne handelt, daß die Eier des Seidenspinners eine Neigung zur spontanen Parthenogenese zeigen, daß es aber von bestimmten noch nicht bekannten Bedingungen abhängt, ob die Eier sich spontan ohne Befruchtung entwickeln oder nicht, und ob bloß der Anfang der Entwicklung eintritt oder vollständige Entwicklung bis zur Raupe oder Imago stattfindet. Wir verstehen auch, warum verschiedene Autoren zu so widersprechenden Resultaten gelangt sind. Es ist möglich, daß nicht nur die äußeren Bedingungen, sondern auch Bedingungen, die dem Ei selbst angehören (z. B. die Beschaffenheit seiner Hülle), hier mitspielen. Wir werden später bei der künstlichen Parthenogenese der Seesterneier einem ähnlichen Falle begegnen.

v. Siebold, Leuckart und andere Autoren haben die Beobachtungen über die natürliche Parthenogenese weiter geführt, namentlich mit Rücksicht auf die Bedeutung, welche diese Beobachtungen für ein anderes fundamentales Problem der Biologie haben, nämlich die Bestimmung des Geschlechts. Bei den Psychyden und Solenobia lieferten die parthenogenetischen Eier nur Weibchen, bei den Bienen nur Männchen. Durch Leuckart und v. Siebold wurde festgestellt, daß auch bei anderen Hymenopteren (Polistes, Vespa und Nematus) ähnliche

Verhältnisse vorliegen und daß auch hier Parthenogenese vorkommt, die aber ausschließlich zur Bildung von Männchen führt. Bei Krustazeen, nämlich Apus, Artemia und Limnadia, stellte v. Siebold ebenfalls eine parthenogenetische Entwicklung fest, die aber nur zur Bildung von Weibchen führte.

Diese Skizze der älteren Beobachtungen über spontane Parthenogenese genügt zum Verständnis der Versuche über künstliche Parthenogenese, die historisch an jene anknüpfen.

IV. Zur Geschichte der ersten Versuche über künstliche Parthenogenese.

Der Ausgangspunkt für die Versuche über künstliche Parthenogenese waren die Beobachtungen über die natürliche Parthenogenese bei *Bombyx mori*. Im Jahre 1847 teilte ein französischer Autor, Boursier, mit, „daß ein weiblicher Seidenspinner, der sich mit einem Männchen nicht begattet hatte, von ihm bald dem Sonnenlicht, bald dem Schatten ausgesetzt worden sei, wobei der Schmetterling viele Eier gelegt habe, von denen diejenigen, welche im Sonnenschein gelegt worden seien, Räupchen geliefert hätten“. ¹⁾

v. Siebold bemerkt hierzu: „Indem wohl niemand im vorliegenden Falle, wie Boursier es getan hat, die Befruchtung der Eier von dem Einfluß des Sonnenlichts und der Sonnenwärme ableiten wird, so wird man sich doch nicht enthalten können, in dieser Erscheinung eine Parthenogenesis zu erblicken.“ Im Hinblick auf die schon erwähnte Beobachtung Barthélemys über den Unterschied im Verhalten der Sommer- und Wintererier und im Hinblick auf die theoretischen Resultate der später zu erwähnenden Versuche über künstliche Parthenogenese ist es jedoch durchaus möglich, daß die Temperatur, welcher das frisch gelegte Ei von *Bombyx mori* ausgesetzt wird, von Bedeutung für dessen Entwicklung sein kann.

Im Jahre 1886 teilte Tichomirow²⁾ eine kurze Notiz über

¹⁾ v. Siebold, Wahre Parthenogenesis. Leipzig 1856, S. 126.

²⁾ Tichomirow, Du Bois Reymonds Archiv 1886.

„die künstliche Parthenogenese bei Insekten“ mit, deren Zweck war, den Arbeiten von Herold und v. Siebold über die natürliche Parthenogenese des Seidenspinners eine neue Stütze zu verleihen. „Es ist seit langer Zeit bekannt, daß die Eier von *Bombyx mori* sich parthenogenetisch entwickeln können; doch hört man nach den Arbeiten von Herold und v. Siebold noch immer zweifelnde Stimmen darüber.“ Um nun die Zahl der sich ohne Befruchtung entwickelnden Eier von *Bombyx* zu vergrößern, benutzte Tichomirow ein Mittel, dessen sich die Züchter bedienen, um die Entwicklung befruchteter Eier zu beschleunigen. Gewisse Arten von Seidenspinnern legen nämlich ihre Eier im Sommer; diese Eier beginnen zwar ihre Entwicklung sofort, aber im Winter stagniert dieselbe, und erst im Frühjahr kriechen die Räumchen aus. Es scheint nun, daß es bei den Züchtern gebräuchlich ist, die Entwicklung der befruchteten Eier durch besondere „Reizmittel“ zu beschleunigen, so daß die Räumchen noch im selben Sommer, in dem die Eier gelegt werden, ausschlüpfen. Tichomirow wendete nun dieselben Mittel auf die unbefruchteten Eier an. Seine „Versuche bestanden darin, daß die Eier mechanisch und chemisch gereizt wurden, ganz in der Weise, wie man es tut, um von befruchteten Eiern, die wie bekannt normal im Sommer nur bis zu einem gewissen Grad sich entwickeln, schon in demselben Sommer Räumchen zu bekommen. Ich tauchte 36 unbefruchtete Eier in konzentrierte Schwefelsäure und ließ sie dort zwei Minuten (später wurden die Eier sorgfältig ausgewaschen). Dreizehn von diesen Eiern fingen schon am vierten Tage an ihre Farbe zu wechseln. Am sechsten Tage konnte man in diesen Eiern einen Embryo konstatieren. Der Embryo sowohl als auch die aus prachtvollen Pigmentzellen bestehende seröse Hülle sahen ganz normal aus.“

„Andere 16 Eier wurden mit einer Bürste absichtlich ganz schwach gerieben. Bis jetzt (also nach einer Woche) bleibt das Resultat negativ; kein einziges Ei entwickelt sich. Eine dritte Anzahl von 99 Eiern ward mit einer Bürste stark gerieben. Am vierten Tage bemerkte man bei sechs von diesen Eiern den für die sich entwickelnden Eier charakteristischen Farbenwechsel. Unter allen unbefruchteten Eiern, die ungereizt blieben, wurde kein einziges parthenogenetisch entwickeltes Ei bemerkt.“

Erst 16 Jahre später, nach dem Erscheinen meiner Versuche über die künstliche Parthenogenese bei Seeigeln und Anneliden kam Tichomirow wieder auf seine Versuche zurück.¹⁾ Er hatte offenbar keine neuen Resultate bei denselben erzielt, und die Larven, die er erhielt, starben früh ab. Der Gedanke, von dem er ausging, daß es sich bei der Befruchtung nur um eine „Reizung“ — im Sinne der Erregung der Nerven und Muskeln handle, kann natürlich zu keinem fruchtbaren Versuche führen.

Die Erfahrung der Züchter, daß Eintauchen der Eier in konzentrierte Schwefelsäure oder daß Reiben derselben mit einer Bürste deren Entwicklung beschleunigt, ist schwer zu erklären. Ich habe an die Möglichkeit gedacht, daß das Ei vom Bombyx vielleicht mit einer Hülle einer erst klebrigen, später gerinnenden Substanz bedeckt sei, die gewöhnlich zum Anheften des Eies an die Unterlage dient, und daß diese Hülle vielleicht die Diffusion des Sauerstoffs in das Ei erschweren könne. Das Reiben des Eies mit der Bürste sowie das Eintauchen desselben in konzentrierte Säure dient vielleicht nur dazu, das Ei für Sauerstoff durchgängiger zu machen. Wenn diese Auffassung richtig ist, so dürfte sie auch Tichomirows Resultate erklären.

Die Versuche von Tichomirow regten Dewitz²⁾ an, eine früher von ihm gemachte Beobachtung an Froscheiern im Sinne der Parthenogenese zu deuten. „Als ich im Frühjahr 1885 bei Herrn Professor Zuntz im physiologischen Institut der landwirtschaftlichen Hochschule in Berlin arbeitete, brachte ich für gewisse Zwecke unbefruchtete Eier von *Rana fusca* in Sublimatlösung. Zu meinem Erstaunen fand ich dieselben am folgenden Morgen gequollen und gefurcht. Bei einem Teil der Eier war nur eine, bei andern waren mehrere Furchen erschienen, bei einigen waren die Furchen unregelmäßig, bei sehr vielen aber normal. . . Ferner trat die Furchung sowohl dann ein, wenn die Eier im Sublimat liegen blieben, als auch, wenn sie sich darin nur wenige Minuten befunden hatten. . . Danach läßt sich schließen, daß das Sublimat einen Reiz ausübt, welcher die erste Furchung veranlaßt.“

¹⁾ Tichomirow, Zoologischer Anzeiger 25, 386, 1902.

²⁾ J. Dewitz, Kurze Notiz über die Furchung von Froscheiern in Sublimatlösung. Biol. Centralbl. 7, 93, 1888.

Es kann keinem Zweifel unterliegen, daß der letztere Schluß unrichtig ist. Es handelte sich offenbar um Gerinnungserscheinungen, die allmählich zur mechanischen Zerklüftung der Eioberfläche führten und wobei das Wesentliche der Zellteilung, nämlich die Kernteilung, ausblieb. Das ist auch von Roux¹⁾ gezeigt worden.

In den achtziger und neunziger Jahren war die Aufmerksamkeit der Morphologen auf die feineren Vorgänge bei der Kern- und Zellteilung gerichtet. Diese Arbeitsrichtung brachte für das uns hier interessierende Tatsachengebiet die Beobachtung, daß die unbefruchteten Eier von gewissen Seeigeln, wenn sie länger im Seewasser liegen, den Anfang einer Kernteilung oder auch sogar einer Zellteilung zeigen können. Die erste hierher gehörige systematische Beobachtung dürfte wohl von Richard Hertwig²⁾ herrühren. „Als ich im Frühjahr 1887 gemeinsam mit meinem Bruder Experimente über die Befruchtung der Seeigeleier anstellte, hatten wir uns die Frage vorgelegt, welchen Einfluß die Konzentration des Samens auf die polysperme Befruchtung geschädigter, speziell durch Reagenzienbehandlung in ihrer Lebensfunktion gestörter Eier ausübt. Deshalb wurden Eier 30 Minuten lang mit 0,1proz. Strychninlösung behandelt und mit verschieden stark verdünntem Sperma derselben Spezies versetzt. In einem Falle wurde Sperma so sehr mit Seewasser verdünnt, daß nach Ausweis der Beobachtung in lebendem Zustand und nach Ausweis einer sehr genauen Untersuchung des konservierten Materials mehr als 90% infolge ungenügenden Samenzusatzes unbefruchtet blieben. Fünfzig Minuten nach der Besamung war Kontrollmaterial eingelegt worden. Von demselben waren 89% nach wie vor unbefruchtet. An diesem fand ich die Anfänge zu den interessanten Veränderungen des Eikerns, die ich hier beschreiben will.“

Diese Veränderungen bestehen kurz darin, daß der Kern ähnliche Veränderungen zeigt wie nach der Befruchtung. Im Kern beginnen die Vorgänge der Teilung, zu einer Kern- oder Zellteilung kam es aber meist nicht. Ausnahmsweise fand eine

1) W. Roux, Gesammelte Abhandl. 2, 432.

2) R. Hertwig, Über die Entwicklung des unbefruchteten Seeigeleies. Festschrift für Gegenbaur. Leipzig 1896. (Schon 1892 hatte Hertwig in der deutschen zool. Gesell. über diese Beobachtungen berichtet.)

einzigste Teilung des Eies in zwei Furchungskugeln statt, von denen jede mit ihrem Kern versehen ist. „Diese am meisten einem normalen Furchungsprozeß nahe kommenden Fälle sind selten und auch sie unterscheiden sich vom normalen noch“ (S. 44). Später überzeugte sich auch Hertwig, daß gelegentlich eine solche Kern- und Zellteilung bei Seeigeleiern eintritt, die längere Zeit ohne Samenzusatz im Seewasser gelegen hatten. Wir werden später sehen, daß diese parthenogenetische Tendenz bei verschiedenen Seeigelarten verschieden stark ausgeprägt ist. Ich vermute, daß es sich hier meist um eine Wirkung der von den Eiern oder von Bakterien, die im Seewasser enthalten sind, gebildeten Kohlensäure oder der Hydroxylionen des Seewassers handelt.

Eine Arbeit von Morgan knüpfte an Versuche, die ich im Jahre 1892 veröffentlicht hatte.¹⁾ Ich hatte gefunden, daß, wenn man frisch befruchtete Seeigeleier (*Arbacia*) in hypertones Seewasser von geeigneter Konzentration bringt (etwa 100 ccm Seewasser + 2 g NaCl), die Eier sich in dieser Lösung nicht furchen; bringt man sie aber nach zwei, drei oder vier Stunden in normales Seewasser zurück, so findet in ganz kurzer Zeit, nach 20 oder sogar 10 Minuten, ein Zerfall des Eies in mehrere Zellen auf einmal statt, und zwar ist die Zahl der Zellen um so größer, je länger die Eier in der hypertonen Lösung waren. Da die Zellteilung der Kernteilung folgt, so schloß ich, daß in diesen Versuchen die Kernteilung weiter ging, während die Zellfurchung unterdrückt war. Für die Unterdrückung der Zellteilung hielt ich den Wasserverlust verantwortlich, den das Ei in der hypertonen Lösung erlitten hatte. Bleiben die Eier zu lange in der hypertonen Lösung, oder ist deren Konzentration zu hoch, so kommt auch die Kernteilung ins Stocken. W. W. Norman²⁾ unternahm später eine histologische Untersuchung solcher Eier und bestätigte diesen Schluß.

Die hypertone Lösung, so stellte ich mir vor, bringt durch Wasserentziehung eine Art Starrezustand im Zytoplasma

¹⁾ Loeb, Journ. of Morphol. 7, 253, 1892. Abgedruckt in „Untersuchungen zur künstlichen Parthenogenese“ S. 1.

²⁾ Norman, Arch. f. Entwicklungsmechanik 3, 106, 1896.

des Eies hervor, infolgedessen dasselbe die zur Zellteilung nötigen Bewegungen nicht mehr ausführen kann. Wählt man die NaCl-Menge, welche man dem Seewasser zufügt, ein wenig höher als absolut nötig, um die Zellteilung zu unterdrücken, so bleibt auch die Zerstreuung der Kerne im Ei aus, da ja hierzu vermutlich auch Protoplasmabewegungen nötig sind. Das erklärt wohl die Resultate Morgans¹⁾, der meine Versuche wiederholte, aber keine Kernteilung beobachtete. Er fand aber in Übereinstimmung mit meinen Versuchen, daß die einige Zeit mit hypertonischem Seewasser behandelten Eier sich nach etwa zehn Minuten, nachdem sie in normales Seewasser zurückgebracht waren, auf einmal in mehrere Zellen teilten. Es handelte sich offenbar um Eier, in denen die Vermehrung der Kernmasse stattgefunden hatte, in denen aber die zur Zerstreuung der Kerne nötigen Protoplasmabewegungen nicht mehr möglich waren.

Morgan schloß freilich, daß keine Kernteilung stattgefunden habe. Diese Annahme läßt es aber unerklärt, warum nach dem Zurückbringen der Eier aus dem hypertonschen in normales Seewasser so rasch ein Zerfall der Eier in mehrere Zellen stattfindet. Um über diese Schwierigkeit hinwegzukommen, nahm Morgan an, daß die hypertonsche Lösung die Bildung künstlicher Astrosphären im Ei veranlasse und daß diese Astrosphären die rasche Teilung des Eies veranlassen, nachdem dasselbe in normales Seewasser zurückgebracht war. Um jene Zeit stellte die Mehrzahl der Autoren sich vor, daß die Astrosphären die aktiven Organe der Kernteilung seien. Auf Schnittpräparaten konnte Morgan²⁾ in der Tat die Existenz von mehreren Astrosphären im Ei nachweisen. Unabhängig von Morgan und von einem andern Gesichtspunkt aus nahm um diese Zeit auch Mead die Frage nach der Bedeutung der Zentrosomen experimentell in Angriff. Boveri hatte die Ansicht ausgesprochen, daß das unbefruchtete Ei sich deshalb nicht zu entwickeln vermöge, weil ihm der Apparat zur Zellteilung fehle, nämlich die Zentrosomen. Nach Boveri regt das Spermatozoon die Entwicklung

1) Morgan, Anat. Anzeiger 9, Nr. 5 u. 6, 1893.

2) Morgan, The Production of Artificial Astrospheres. Arch. f. Entwicklungsmechanik 3, 339, 1896.

des Eies dadurch an, daß es ein Zentrosom ins Ei trägt. Dadurch wird das letztere in den Stand gesetzt, seine Teilung zu beginnen. Nur das Zentrosom soll die Ursache der Teilung sein. Mead weist nun darauf hin, daß bei gewissen Eiern, z. B. dem Ei von Chätöpterus, das Spermatozoon eine ganz andere Wirkung hat. So lange das Ei von Chätöpterus im Ovarium ist, gibt es keine Polkörperchen ab, sobald es aber ins Seewasser kommt, beginnt die Reifung, und es kommt zur Spindelbildung, die der Abschnürung des ersten Polkörperchens vorausgeht.

Auf diesem Stadium bleibt das Ei stehen, solange kein Spermatozoon ins Ei eindringt. „Im Ei von Chätöpterus bildet sich ein vollständiger Amphiaster mit Zentrosomen, Zentrosphären, Astrosphären und Spindelfasern, und dieses System bleibt stundenlang bestehen, wenn das Ei unbefruchtet im Seewasser bleibt; und das gleiche gilt für die Eier von vielen anderen marinen Anneliden. Diese komplizierte Maschine für die mitotische Zellteilung wird aber sofort in Bewegung gesetzt, sobald das Spermatozoon ins Ei eintritt, obwohl das Spermatozoon und seine Zentrosomen in einem weit davon entfernten Teil des Eies sich befinden. Alle Phasen der weitem Bildung der Polkörperchen sind unabhängig von den karyokinetischen Änderungen in der Umgebung des Spermatozoons. Da also bei dieser Form die Oozyte sich nicht teilt, bis der Same in das Ei tritt, obgleich die Zentrosomen und der ganze Amphiaster vorhanden sind, so ist der Verdacht berechtigt, daß auch im reifen Ei von anderen Formen, z. B. dem Seeigel, die Mitose nicht bloß dadurch gehindert ist, weil ein Zentrosom fehlt, und daß die Mitose nicht bloß dadurch angeregt wird, weil ein neues Zentrosom ins Ei gebracht wird, um eine Kernspindel-figur zu bilden“.¹⁾

Mead schließt, daß für die Zellteilung ein Reiz nötig sei, demjenigen vergleichbar, der den motorischen Apparat von Pigmentzellen, Leukozyten oder Muskelzellen in Bewegung setzt. Um nun diesen Gedanken weiter auszuführen, stellte er

¹⁾ A. D. Mead, *The Rate of Cell Division and the Foundation of the Centrosome*. Biological Lectures delivered at Woods Hole 1896/97, 201. Boston 1898.

nach dem Rat von C. W. Greene einige Versuche über die Wirkung von Salzen an. Er benutzte die Salze, welche seit Ringer in der Zirkulationsflüssigkeit für das Herz angewendet werden und fand, daß, wenn man eine kleine Menge, $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ ‰, KCl zum Seewasser setzt, der Amphiaster des ersten Oozytenstadiums seine Tätigkeit sofort wieder aufnimmt. „Die Reifungsvorgänge inklusive der Ausstoßung des ersten und zweiten Polkörperchens und die entsprechenden Änderungen in der Form des Eies folgen einander mit derselben Regelmäßigkeit, wie wenn das Ei befruchtet wird.“ Eine weitere Entwicklung beobachtete aber Mead an diesen Eiern nicht. Aus diesen Versuchen zieht Mead den Schluß, daß auch bei der normalen Befruchtung von Chätopterus „das eintretende Spermatozoon die mitotischen Vorgänge in derselben Weise anregt, nämlich durch die Ausübung eines chemischen Einflusses auf das Ei und nicht dadurch, daß es dem Ei spezielle Organe der Zellteilung liefert“. Diese Arbeit von Mead, die m. E. unter den zytologischen Abhandlungen einen hervorragenden Platz einnimmt, ist in der Literatur wenig berücksichtigt worden.

Im Jahre 1899 veröffentlichte Morgan¹⁾ neue und wichtige Beobachtungen über die Wirkung hypertotonischer Lösungen auf das Ei. Er fand nämlich, daß unbefruchtete Eier, wenn sie mit hypertonischem Seewasser behandelt waren, anfangen sich zu furchen, ohne sich jedoch zu Larven zu entwickeln.

Diese Furchung hielt Morgan für eine abnorme Erscheinung, die mit der normalen Furchung in keiner Weise vergleichbar sei. „Die Form der Furchung solcher Eier ist gänzlich verschieden von der normalen Furchung.“ Nach den Abbildungen, welche Morgan gibt, scheinen sich die Eier ungefähr bis zum 16-Zellstadium, aber nicht weiter entwickelt zu haben. „Die Zeit, welche für eine Furchung erforderlich ist, ist oft sehr lang im Vergleich zur Zeit, welche für die normale Zellteilung erforderlich ist.“ „Das Resultat ist eine Masse sehr kleiner Körnchen oder Stücke. Diese Stücke bilden nie Zilien und produzieren keine Form, die irgend einem Stadium

¹⁾ Morgan, The Action of Salt Solutions on the Unfertilized and Fertilized Eggs of Arbacia and of other Animals. Arch. f. Entwicklungsmechanik 8, 448, 1899.

des normalen Embryos vergleichbar wären. Später zerfallen diese Massen.“ (S. 454 u. 455.) Morgan war nicht darauf ausgegangen, künstliche Parthenogenese zu erzielen, sondern es war ihm darum zu tun, zu zeigen, daß die Wirkung der hypertonen Lösung auf das Ei in der Hervorbringung künstlicher Astrosphären und Zentrosomen besteht, und daß solche Astrosphären und Zentrosomen die Organe der Zellteilung seien. Eine Entwicklung der mit hypertonischem Seewasser behandelten unbefruchteten Eier zu Larven hielt er für völlig ausgeschlossen.

Inzwischen war ich durch die Resultate meiner Versuche über Ionenwirkungen zu der Frage geführt worden, ob es nicht durch Behandlung unbefruchteter Eier mit modifiziertem Seewasser möglich sei, unbefruchtete Eier zur Entwicklung zu Larven zu veranlassen. Versuche über die physiologische Wirkung des galvanischen Stromes hatten mich zu der Ansicht geführt, daß es sich im letzteren Falle um eine Ionenwirkung handle, und da der galvanische Strom ein souveränes Reizmittel für Nerven und Muskeln ist, so brachte mich das auf den Gedanken, daß vielleicht gerade Ionenwirkungen allen bis dahin nicht näher analysierten Reizwirkungen zugrunde liegen könnten. Versuche mit bestimmten Salzen zeigten nun, daß die Lösungen von Natrium-, Lithium-, Cäsium- und Rubidiumsalzen den Skelettmuskel zu rhythmischen oder wenigstens fibrillären Zuckungen veranlassen können, während die Kalzium-, Magnesium- und Strontiumsalze diese Zuckungen hemmen. Wir verdanken es also der Gegenwart der Kalziumsalze oder -ionen in unserem Blute, daß unsere Muskeln nicht fortwährend zucken.¹⁾

Nun war es, wie erwähnt, durch Hertwig und andere bekannt, und ich hatte es oft genug selbst bei Arbaciaeiern beobachtet, daß unbefruchtete Eier gewisser Seetiere gelegentlich anfangen, sich zu teilen, vorausgesetzt, daß sie lange genug im Seewasser liegen. Das regte die Vermutung an, daß es sich mit dem Ei ebenso verhalten möge, wie mit dem Muskel, nämlich, daß das Ei auch ohne Befruchtung sich entwickeln könne, daß aber etwas im Seewasser enthalten sei, das die Entwicklung hemme, ähnlich wie das im Blut enthaltene Ca

¹⁾ Loeb, Festschrift für Fick. Würzburg 1899.

und Mg die fibrillären Zuckungen des Muskels hemmt. Ich beschloß daher Versuche darüber anzustellen, ob es nicht möglich sei, durch Änderung der Konstitution des Seewassers die unbefruchteten Seeigeleier zur Entwicklung zu Larven zu veranlassen. Ich dachte zunächst, daß das durch Hydroxylionen oder durch Wasserstoffionen gelingen müsse. Frühere Versuche hatten nämlich ergeben, daß die Erhöhung der Konzentration der Hydroxylionen innerhalb gewisser Grenzen die Entwicklung des befruchteten Seeigeleies beschleunigt.¹⁾

Es war ferner denkbar, daß die Kohlensäurebildung in den unbefruchteten Eiern selbst die Ursache war, daß dieselben bei längerem Liegen im Seewasser anfangen, sich zu furchen. So versuchte ich zunächst, ob es nicht möglich sei, durch Alkalien oder Säuren die Entwicklung des unbefruchteten Seeigeleies zu Larven zu veranlassen.²⁾ Meine neuesten Versuche haben gezeigt, daß dieser Gedanke richtig war, aber durch einen sonderbaren Nebenumstand gelangte ich damals nicht zum Ziele. Ich war damals nämlich der Meinung, daß für die physiologische Säurewirkung nur das Wasserstoffion in Betracht komme, und deshalb wandte ich nur Mineralsäuren an. Ich habe seitdem gefunden, daß nur die Fettsäuren sich hier wirksam erweisen. Hätte ich Fettsäuren statt der Mineralsäuren angewendet, so wäre die Entwicklung dieses Gebietes um fünf Jahre abgekürzt worden.

Dagegen gelangen die Versuche bei einem Zusatz von Mg Cl₂ zum Seewasser, vorausgesetzt, daß gleichzeitig der osmotische Druck des Seewassers erhöht wurde.³⁾ Unbefruchtete Seeigeleier, welche zwei Stunden lang einer solchen hyper-tonischen Mischung ausgesetzt waren, entwickelten sich hinterher zu Larven, die zum Teil das normale Pluteusstadium erreichten. Damit war derjenige Schritt getan, der die syste-

¹⁾ Loeb, Über den Einfluß von Säuren und Alkalien auf die embryonale Entwicklung und das Wachstum. Arch. f. Entwicklungsmechanik 7, 631, 1898.

²⁾ Loeb, Am. Journ. of Physiology 3, 434, 1900. Übersetzt in „Untersuchungen zur künstlichen Parthenogenese“ 1906, 77.

³⁾ Loeb, On the Nature of the Process of Fertilization and the Production of Normal Larvae (Plutei) from the Unfertilized Eggs of the Sea Urchin. Journ. of Physiology 3, 135, 1899. (Untersuchungen S. 19.)

matische Analyse des Befruchtungsvorganges ermöglichte. Wir besitzen nämlich nur ein einziges Kriterium, das uns zu entscheiden erlaubt, ob ein Eingriff am Ei ähnlich wirkt, wie der Eintritt des Spermatozoons in dasselbe, und dieses Kriterium besteht darin, ob der betreffende Eintritt zur Bildung einer Larve führt. Die bloße Anregung zur Zellteilung genügt hierzu nicht, da beispielsweise im Falle der Tumoren- und Gallenbildung Zellteilungen eintreten, welche nicht zur Bildung von Larven führen. Diese Unterscheidung zwischen einer Zellteilung, welche die Grundlage normaler Entwicklung und normalen Wachstums bildet, und einer Zellteilung, die zur Bildung von pathologischen Produkten führt, ist ja auch praktisch von Bedeutung.

Es ist nun nicht meine Absicht, auf alle Versuche über künstliche Parthenogenese in dieser Schrift einzugehen. Wir werden uns vielmehr auf diejenigen Versuche beschränken, die dazu beitragen, eine Einsicht in den Charakter der Entwicklungserregung zu gewinnen. Wir beginnen mit den Versuchen am Seeigeli, das sich anscheinend am besten für derartige Versuche eignet. Die Seeigelformen, mit deren Eiern ich arbeitete, waren *Arbacia* vom Atlantischen Ozean (Woods Hole) und *Strongylocentrotus purpuratus* und *franciscanus* vom Stillen Ozean (Pacific Grove).

Die Eier dieser beiden Formen entwickeln sich nur, wenn sie durch Samen oder durch die hier zu beschreibenden chemischen Methoden zur Entwicklung veranlaßt werden. Die Eier des kalifornischen Seeigels *S. purpuratus* haben die geringste Tendenz zur parthenogenetischen Entwicklung, die ich überhaupt beobachtet habe. Selbst bei tagelangem Liegen in Seewasser findet in keinem Ei eine Furchung oder Kernteilung statt. Aus diesem Grunde ist dieses letztere Ei am allergeeignetsten für diese Versuche.

V. Die ersten Versuche über die osmotische Entwicklungserregung des unbefruchteten Seeigeleies (Arbacia).

1. Wie schon erwähnt, begann ich meine Versuche mit der Erwartung, daß es gelingen müsse, die unbefruchteten Eier durch Behandlung mit Basen oder Säuren zur Entwicklung anzuregen. Eine Reihe von Wochen hindurch stellte ich im Sommer 1899 an den Eiern eines Seeigels, *Arbacia*, in Woods Hole (am Atlantischen Ozean) Versuche in dieser Richtung an, ohne jedoch ein anderes Resultat zu erzielen, als daß unbefruchtete Eier von *Arbacia*, die in 100 ccm Seewasser + 1 ccm $\frac{n}{10}$ -NaHO gebracht wurden, nach etwa fünfstündigem Verweilen in dieser Lösung anfangen sich zu furchen. Die Furchung war aber sehr unregelmäßig und ging nicht über die ersten Stadien, 2 oder 4 Zellen, hinaus. Daneben zeigten die Eier eine Tendenz zu amöboiden Formänderungen. Die Versuche mit Säuren (HCl, HNO₃, H₂SO₄) ergaben, daß in angesäuertem Seewasser keine Furchung eintrat, daß aber ein paar Furchungen an unbefruchteten Eiern beobachtet wurden, wenn sie etwa 10 Minuten in 100 ccm Seewasser + 2 oder 3 ccm $\frac{n}{10}$ -HCl gebracht und dann in normales Seewasser zurückgebracht wurden.¹⁾ Auch Versuche mit Salzlösungen, die mit dem Seewasser isosmotisch waren, gaben keine besseren Resultate. Als auf diese Weise der Sommer 1899 fast gänzlich mit erfolglosen Bemühungen hingegangen war, versuchte ich zuletzt die Wirkung hypertotonischer Lösungen. Ich ließ $\frac{10}{8}$ m (grammolekulare) Lösungen von den im Seewasser enthaltenen Salzen NaCl, KCl, CaCl₂ und MgCl₂ herstellen und mischte dieselben in verschiedenen Verhältnissen mit Seewasser. Nach längeren Versuchen fand ich, daß die unbefruchteten Seeigeleier, wenn sie zwei Stunden lang einer Mischung von 50 ccm Seewasser + 50 ccm $\frac{10}{8}$ m MgCl₂ ausgesetzt und dann in

¹⁾ Loeb, On the Artificial Production of Normal Larvae from the Unfertilized Eggs of the Sea Urchin. *Am. Journal of Physiology* **3**, 434, 1900. — „Untersuchungen zur künstlichen Parthenogenese“ 1906, 77.

normales Seewasser zurückgebracht wurden, sich zu schwimmenden Pluteen entwickelten.¹⁾ Ich erwartete, daß das gleiche Resultat auch mit NaCl, KCl und CaCl₂ erzielt werden müßte, das war aber zu meiner Überraschung nicht der Fall. Da die Laichzeit inzwischen abgelaufen war und mir nur ein paar Seeigel zur Verfügung standen, so benutzte ich dieses Material dazu, um wenigstens das eine Resultat sicherzustellen, nämlich daß es in der Tat möglich ist, nicht nur Blastulen, sondern auch Gastrulen und Pluteen aus den unbefruchteten Seeigeleiern hervorzubringen, und daß hier keine Täuschung oder Infektion durch Spermatozoen im Spiele war.

Fast jeder sprach nach der Veröffentlichung meiner Versuche den Verdacht aus, daß hier wohl eine Täuschung vorliege, und ich selbst wurde ebenfalls bei der Ausführung der ersten Versuche von derartigen Zweifeln gequält und richtete daher meine ganze Energie darauf, mich davon zu überzeugen, daß ich nicht das Opfer eines Irrtums oder einer Fehlerquelle geworden war. Acht größere Versuchsreihen, jede mit einer großen Zahl verschiedener Lösungen, die ich noch in Woods Hole ausführen konnte, und mit vielen Kontrollversuchen stellten dann fest, daß mir die künstliche Hervorbringung von Larven aus dem unbefruchteten Ei gelungen war. Dann aber trat die weitere Frage heran, ob denn in der Tat nur die Konzentrations-erhöhung des Seewassers mit Magnesiumchlorid eine solche Wirkung habe. Im Februar 1900 nahm ich die Versuche in Pacific Grove an der kalifornischen Küste wieder auf. Mein damaliger Assistent Dr. Garrey begleitete mich, und es gelang uns festzustellen, daß nicht nur eine Konzentrationserhöhung mit MgCl₂, sondern auch mit NaCl und Zucker die Entwicklung der unbefruchteten Eier der dortigen Seeigel, *Strongylocentrotus purpuratus* und *franciscanus*, hervorruft. Zugleich aber stellte ich fest, daß die sorgfältigste Sterilisation des Seewassers und der Instrumente und die Ausschaltung aller möglicher Fehlerquellen die Resultate nicht verschlechterte. Aber neben diesen willkommenen Resultaten machten wir auch eine sehr unwill-

¹⁾ In der vorhin zitierten ausführlichen Mitteilung dieser ersten Versuche (1900) wies ich ausdrücklich darauf hin, daß die Erhöhung des osmotischen Drucks der Lösung eine notwendige Bedingung des Versuches sei. Delage und Bataillon haben das offenbar übersehen.

kommene Erfahrung, die mir lange unverständlich blieb: Die Resultate in Pacific Grove waren nicht so konstant wie in Woods Hole. An manchen Tagen „gingen“ die Versuche in Pacific Grove sehr schön, dann aber folgten Tage, an denen dieselben Lösungen, die bis dahin gute Resultate gegeben hatten, völlig oder fast völlig wirkungslos blieben. Ich wußte keinen Grund hierfür anzugeben und verschob die Veröffentlichung dieser Resultate, bis ich Gelegenheit hatte, sie in Woods Hole an Arbacia noch einmal zu wiederholen. Ich überzeugte mich im Sommer 1900 in Woods Hole, daß auch für Arbacia die Mg-Ionen keine spezifische Rolle spielen, sondern daß es nur auf die geeignete Erhöhung des osmotischen Drucks ankommt.¹⁾ Wenn der osmotische Druck des Seewassers nur um etwa 50% erhöht wurde, so war es gleichgültig, ob die Druckerhöhung durch Zusatz von Elektrolyten wie $MgCl_2$, $NaCl$, KCl oder $CaCl_2$ oder durch Zusatz von Nichtleitern wie Rohrzucker und Harnstoff herbeigeführt wurde. Die Versuche an den Eiern von Arbacia in Woods Hole gaben viel konstantere Resultate als die Versuche an *Strongylocentrotus* in Pacific Grove. Der Umstand, daß im Jahre vorher die künstliche Parthenogenese nur bei der Konzentrationserhöhung des Seewassers mit $MgCl_2$ gelungen war, lag daran, daß die von einem Assistenten hergestellten Lösungen der Salze, mit denen ich arbeitete, nicht, wie ich voraussetzte, isosmotisch waren; vielleicht war auch die von mir benutzte $MgCl_2$ -Lösung etwas alkalisch, während die anderen Salzlösungen eine neutrale Reaktion besaßen.

2. Da uns nun die quantitative Seite dieser Versuche besonders in dieser Schrift interessiert, so müssen wir etwas genauer auf die für die Entwicklung nötige Erhöhung des osmotischen Druckes eingehen. Professor W. E. Garrey hat den osmotischen Druck des Seewassers in Woods Hole mit der Gefrierpunktmethode sehr genau bestimmt und gefunden, daß das Seewasser daselbst eine Gefrierpunktserniedrigung von $1,818^0$ hat, während das fließende Wasser des Laboratoriums

¹⁾ Loeb, Further Experiments on Artificial Parthenogenesis and the Nature of the Process of Fertilization. *Am. Journ. of Physiol.* 4, 178, 1900. (Untersuchungen über künstliche Parthenogenese S. 154.)

eine etwas höhere Konzentration besitzt, nämlich $\Delta = 1,83^{\circ}$.¹⁾ Gefrierpunktsbestimmungen an reinen NaCl-Lösungen ergaben für eine $\frac{m}{2}$ NaCl-Lösung $\Delta = -1,75^{\circ}$, für eine $\frac{m}{2}$ van't Hoffsche Lösung, d. h. für eine Mischung von 100 ccm $\frac{m}{2}$ NaCl, 2,2 ccm $\frac{m}{2}$ KCl, 2,0 ccm $\frac{m}{2}$ CaCl₂, 12 ccm $\frac{m}{2}$ MgCl₂, ist die Gefrierpunkts-erniedrigung beträchtlicher, nämlich $1,84^{\circ}$.²⁾ Das liegt an dem Umstand, daß MgCl₂ und CaCl₂ sich in drei Ionen dissoziieren. Im Seewasser sind aber nicht 12 ccm MgCl₂ sondern 7,8 ccm MgCl₂ + 3,8 ccm MgSO₄, und eine genaue $\frac{m}{2}$ van't Hoffsche Lösung hat also einen etwas geringeren osmotischen Druck. Jedenfalls ist der Unterschied zwischen dem osmotischen Druck einer van't Hoffschen Lösung und dem einer $\frac{m}{2}$ NaCl-Lösung gering.³⁾

Ich fand nun, daß in Woods Hole künstliche Parthenogenese bei Seeigel-Eiern hervorgerufen werden kann, wenn dieselben ein bis zwei Stunden in eine Mischung von 90 ccm Seewasser + 10 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl oder KCl gebracht werden. Die Erhöhung des osmotischen Druckes dieser Lösung war relativ gering, sie betrug nämlich etwas weniger als 40% des osmotischen Druckes des Seewassers.⁴⁾ Ich erhielt schwimmende Larven, wenn die Eier von Arbacia etwa zwei Stunden lang in eine der folgenden Lösungen gebracht wurde, nämlich

100 ccm Seewasser + 25 ccm 2 n Rohrzucker

82 ccm Seewasser + $17\frac{1}{2}$ ccm $2\frac{1}{2}$ n Harnstoff.

Es handelte sich hier um sehr geringe Erhöhungen des osmotischen Druckes.

Selbst eine reine Rohrzuckerlösung von relativ geringem osmotischen Druck genügte, um die unbefruchteten Seeigeleier zur Entwicklung zu veranlassen. Eier von

1) W. E. Garrey, The Osmotic Pressure of Sea Water and of the Blood of Marine Animals. *Biol. Bulletin* 8, 257, 1905.

2) Nach privaten Mitteilungen von Prof. Garrey.

3) Das Seewasser in Pacific Grove hat nach Garrey eine Gefrierungs-erniedrigung von $1,90^{\circ}$.

4) *Am. Journ. of Physiol.* 4, 178, 1900. (Untersuchungen S. 154.)

Arbacia wurden zwei Stunden lang in eine Lösung von 60 ccm 2 n Rohrzucker + 40 ccm destilliertes Wasser gebracht oder selbst in 55 ccm 2 n Rohrzucker + 45 ccm destilliertes Wasser.¹⁾ Im letzteren Falle handelte es sich um eine sehr geringe Erhöhung des osmotischen Druckes.²⁾ Nichtsdestoweniger regte diese Behandlung der Eier die Entwicklung an, die aber nie über das Blastulastadium ging und im allgemeinen nicht einmal so weit. Die Entwicklung der Eier blieb meist auf den ersten Furchungsstufen stehen. Wir werden später sehen, daß für die Erzeugung der Pluteen die hypertonische Lösung eine ziemlich hohe Konzentration der HO-Ionen haben muß. Der Umstand, daß das Seewasser in Woods Hole eine relativ hohe Konzentration der Hydroxylionen hat, erklärt vielleicht, warum die Resultate mit hypertonischem Seewasser dort relativ gut ausfielen. Ich publizierte dieses Zuckerexperiment, um keinen Zweifel zu lassen, daß die hypertonische Lösung nur vermöge ihres Wasserentziehungsvermögens wirkt, und daß es sich nicht um die spezifische Wirkung von Salzen oder deren Ionen handelt.

Noch einen anderen theoretisch wichtigen Punkt stellt diese Versuchsreihe fest. In der hypertonischen Lösung verliert das Ei Wasser; wird es aber in normales Seewasser zurückgebracht, so nimmt es natürlich wieder Wasser auf. Es bestand nun die Frage, ob die Entwicklungserregung hier nur von der Wasserentziehung abhängt, oder ob das Wiederschwellen des Eies, wenn es aus dem hypertonischen in normales Seewasser zurückgebracht wird, etwas mit dem Resultat zu tun hat. Zu dem Zweck wurden unbefruchtete Eier des Seeigels dauernd in schwach hypertonisches Seewasser gebracht, nämlich 93 ccm Seewasser + 7 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl-Lösung. Es stellte sich nun heraus, daß in einer solchen Lösung die Eier anfangen, sich zu entwickeln, und daß einige die Blastulastufe erreichen und umherschwimmen. Daß sie sich nicht weiter entwickeln, liegt daran, daß die hypertonische Lösung die Eier schädigt, wenn sie zu lange in derselben bleiben. Der Versuch zeigt also, daß, soweit die entwicklungserregende Wirkung der hyper-

¹⁾ Am. Journ. of Physiol. 4, 178, 1900. (Untersuchungen S. 154.)

²⁾ Wir werden später sehen, daß die osmotische Wirksamkeit einer reinen Rohrzuckerlösung beträchtlich höher ist als ihr theoretisch berechneter Wert.

tonischen Lösung in Betracht kommt, es nicht nötig ist, die Eier wieder in normales Seewasser zurückzubringen. Das letztere ist nur nötig, wenn wir die Eier in voller Lebensfähigkeit erhalten wollen.

Um nun auch anzudeuten, in welcher Richtung ich damals die Erklärung der künstlichen Parthenogenese suchte, so sei erwähnt, daß ich die Wirkung der hypertonen Lösung mit der Verflüssigung der Kernmembran und anderer Kernbestandteile in Beziehung setzte.¹⁾ Eine solche Verflüssigung muß natürlich bei jeder Kernteilung eintreten; allein ich glaube, daß diese Verflüssigung eine indirekte Folge chemischer Prozesse ist, welche durch die hypertone Lösung im Ei angeregt werden, und nicht eine direkte Wirkung der hypertonen Lösung.

Da nun die hypertone Lösung lediglich vermöge ihres osmotischen Druckes wirkt und da der osmotische Druck nur von der Zahl der Moleküle resp. Ionen in der Volumeneinheit der Flüssigkeit, aber nicht von der chemischen Natur der Moleküle oder Ionen abhängt, so sollten sich alle Lösungen gleich günstig für die Entwicklungserregung erweisen. Wie wir nun schon erwähnten, erleidet dieser Schluß eine Einschränkung durch die giftigen Nebenwirkungen der Lösungen gewisser Stoffe. So ist es kaum nötig zu erwähnen, daß beispielsweise Kupfersalze zu giftig sind, um für diesen Zweck in Betracht zu kommen. Aber auch eine reine NaCl-Lösung ist nicht so günstig wie beispielsweise eine Mischung von NaCl, KCl und CaCl₂ in dem Verhältnis, in welchem diese drei Stoffe im Seewasser vorhanden sind. Das hängt damit zusammen, daß eine reine NaCl-Lösung auf die Dauer die Eier schädigt oder tötet, und daß diese giftige Wirkung des NaCl durch den Zusatz von etwas KCl und CaCl₂ gehemmt wird. Das gilt nicht nur für die Seeigeleier, sondern für die meisten, wenn nicht alle, tierischen und pflanzlichen Zellen. Die Zeit, welche erforderlich ist, damit die Zellen in einer reinen NaCl-Lösung sterben, ist für verschiedene Zellen sehr verschieden; die unbefruchteten Eier des Seeigels können beispielsweise viel länger in einer solchen Lösung bleiben, ohne zu leiden, als die befruchteten Eier. Die Giftigkeit einer reinen Kochsalzlösung nimmt ferner

¹⁾ Loeb, Am. Journ. of Physiol. 4, 178, 1900. (Untersuchungen S. 163.)

mit dem osmotischen Druck der Lösung und mit der Konzentration der HO-Ionen zu.

Die unbefruchteten Eier von *Strongylocentrotus purpuratus* können in einer $\frac{m}{2}$ NaCl-Lösung bei 15° C. länger als 24 Stunden bleiben, ohne ihre Befruchtungsfähigkeit einzubüßen. In einer alkalischen NaCl-Lösung von höherem osmotischen Druck ist die Giftigkeit erheblich höher.¹⁾ Man erhält deshalb eine etwas größere Menge guter Larven, wenn man als hypertonische Lösung eine Mischung von NaCl, KCl und CaCl₂ im richtigen Verhältnis wählt, als wenn man eine reine Chlornatriumlösung von demselben osmotischen Druck benutzt. Je mehr die hypertonische Lösung in ihrer Zusammensetzung dem Seewasser sich nähert, um so geringer sind die schädigenden Nebenwirkungen der hypertonischen Lösung. Aus diesem Grunde benutze ich meist zur Herstellung der hypertonischen Lösung Seewasser, dessen Konzentration durch Zusatz einer passenden Menge einer 2 $\frac{1}{2}$ n NaCl-Lösung auf die gewünschte Höhe gebracht wird. Die minimale Konzentration, in der die verschiedenen hypertonischen Lösungen wirken, ist für die Lösung verschiedener Stoffe verschieden. Das liegt wohl daran, daß die Eier nicht in idealem Sinne semipermeabel sind. Wir werden auf diesen Umstand später genauer eingehen.

3. Die nächsten Versuche gingen darauf aus, festzustellen, ob die hier erlangten Resultate nur eine Eigentümlichkeit der Seeigeleier sind, oder ob die künstliche Parthenogenese bei den Eiern aller Tiere hervorgerufen werden kann. Dabei war es für mich zuerst Nebensache, durch welche Methode die Entwicklungserregung gelang, solange es nur möglich war, die unbefruchteten Eier zur Entwicklung zu bringen. Die Versuche sollen aber doch kurz erwähnt werden, da die hier gewonnenen Erfahrungen auf die weitere Entwicklung des Gebiets von Einfluß blieben. Noch im Jahre 1900 gelang es mir zu zeigen, daß die Eier eines marinen Wurms, *Chätopterus*, sich ohne Erhöhung des osmotischen Druckes des Seewassers durch Zusatz

¹⁾ Loeb, Über die Ursachen der Giftigkeit einer reinen Chlornatriumlösung und ihrer Entgiftung durch K und Ca. *Biochem. Zeitschr.* 2, 81, 1906.

von Säure zu demselben oder durch Zusatz von irgend einem Kaliumsalz zur Entwicklung bringen lassen.¹⁾

Ferner stellten Neilson und ich fest, daß durch beliebige anorganische Säuren — d. h. durch Wasserstoffionen — die unbefruchteten Eier des Seesterns (*Asterias Forbesii*) zur Entwicklung der Larven veranlaßt werden können.

Im Verein mit Fischer ermittelte ich, daß Zusatz eines Kalziumsalzes zum Seewasser die Entwicklung der unbefruchteten Eier eines marinen Wurms, nämlich *Amphitrite*, veranlaßt.²⁾ Wir kommen auf diese Versuche später zurück.

VI. Fortsetzung dieser Versuche: Die osmotische Entwicklungserregung der Eier des kalifornischen Seeigels (*Strongylocentrotus purpuratus* und *franciscanus*).

Es war auffallend, daß diese Methode der osmotischen Druckerhöhung, welche in Woods Hole an *Arbacia* gute Resultate ergab, zu schwankenden Resultaten bei den Eiern der kalifornischen Seeigel führte. Wenn eine Methode bald gute, bald schlechte Resultate gibt, so darf man darauf rechnen, daß noch eine wesentliche Variable im Spiele ist, die unberücksichtigt geblieben ist. Ich dachte lange Zeit, daß die Temperatur diese Variable sei, fand aber, daß auch bei Berücksichtigung dieser Möglichkeit die Resultate der rein osmotischen Entwicklungserregung in Pacific Grove ihren unsicheren Charakter beibehielten. Als ich nun im Jahre 1906 meine Versuche über die Ursachen der Giftigkeit einer reinen Chlornatriumlösung fortsetzte, wurde meine Aufmerksamkeit wieder auf die Bedeutung der Konzentration der Hydroxylionen bei der Entwicklung gelenkt; und dabei wurde mir der Unterschied

¹⁾ Loeb, Versuche über künstliche Parthenogenese bei Anneliden (*Chaetopterus*) und die Natur des Befruchtungsprozesses. *Am. Journ. of Physiol.* **4**, 423, 1901. (Untersuchungen S. 167.)

²⁾ Loeb, Fischer und Neilson, Weitere Versuche über künstliche Parthenogenese. *Pflügers Arch.* **87**, 594, 1901. (Untersuchungen S. 278.)

in der Alkalinität des Seewassers in Pacific Grove und Woods Hole und die mögliche Bedeutung dieses Unterschiedes klar. Das Seewasser im Laboratorium in Woods Hole gab mit Phenolphthalein eine sehr kräftige Rotfärbung, während das Seewasser in Pacific Grove, das für die Versuche frisch aus dem Ocean geschöpft wurde, mit Phenolphthalein farblos bleibt. Es gibt aber mit Neutralrot eine Orangefärbung. Daraus folgt auf Grundlage der Arbeiten von Friedenthal und Salm, daß das Seewasser, das bei meinen Versuchen in Woods Hole benutzt wurde, eine Konzentration der Hydroxylionen hatte, die $\bar{\approx} 10^{-5}$ normal war, während das Seewasser in Pacific Grove eine Konzentration der Hydroxylionen hat, die niemals den Wert 10^{-5} normal erreicht, aber $\bar{\approx} 10^{-6}$ normal ist. Meine Versuche hatten mir auch gezeigt, von welcher außerordentlichen biologischen Bedeutung schon ganz geringe Unterschiede in der Konzentration der Hydroxylionen sind. Um ein Beispiel zu geben: Stellt man sich eine neutrale Lösung von NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, MgSO₄ her, welche diese Salze in dem Verhältnis enthält, in dem dieselben im Seewasser enthalten sind, und welche denselben osmotischen Druck wie das Seewasser hat, so entwickelt sich im allgemeinen kein (mit Samen) befruchtetes Ei von Strongylocentrotus in einer solchen Lösung; vorausgesetzt, daß die Eier durch vorheriges wiederholtes Waschen in einer neutralen Lösung von allen Spuren von Alkali an ihrer Oberfläche befreit sind. Die Eier fangen vielleicht an, sich zu furchen, und einzelne können das Vier- oder Achtzellenstadium erreichen, aber dann hört im allgemeinen die Entwicklung auf. Fügt man aber zu 50 ccm dieser Lösung 0,1 oder 0,2 ccm einer $\frac{n}{100}$ Lösung von NaHO zu, so entwickeln sich viele oder alle Eier zu Larven; obwohl dieser Zusatz von Alkali so gering ist, daß er die Lösung, die mit Neutralrot rot ist, nur für ein paar Minuten gelb zu färben imstande ist. Die wenigen Moleküle NaHO, die so in jedes Ei getrieben werden, geben die Möglichkeit für die Entwicklung des Eies!¹⁾ Unter diesen Umständen

¹⁾ Loeb, Über die Ursachen der Giftigkeit einer reinen Chlornatriumlösung und ihrer Entgiftung durch K und Ca. Biochem. Zeitschr. 2, 81, 1906.

lag es nahe, daran zu denken, daß die unerkannte Variable, welche für die erwähnten Unsicherheiten der rein osmotischen Entwicklungserregung verantwortlich war, die Konzentration der Hydroxylionen in der hypertonischen Lösung sein könnte. Der Gedanke erwies sich als richtig, und es gelang nunmehr mit einem Schlage, die Unzuverlässigkeit der Resultate, welche dieser Methode in Pacific Grove bisher angehaftet hatte, in hohem Grade zu beseitigen; es war nur nötig, dem hypertonischen Seewasser eine genügende Menge Natronlauge zuzusetzen.¹⁾ In dem Falle erhält man stets bei der osmotischen Methode positive Resultate, obwohl dieselben numerisch nicht einander gleich sind. Der Umstand, daß ohne den Zusatz von Alkali das hypertonische Seewasser manchmal die Entwicklungserregung unbefruchteter Seeigel in Pacific Grove veranlaßte, daß derselbe aber sehr oft versagte, liegt daran, daß die minimale Konzentration der Hydroxylionen, welche für diese Art der Entwicklungserregung nötig ist, für die Eier verschiedener Weibchen verschiedene Werte hat. Für die Eier mancher Weibchen reicht eine Konzentration der Hydroxylionen zwischen 10^{-6} und 10^{-5} n. aus; sehr oft ist eine solche Konzentration zu gering. Die Versuche ergaben mit voller Sicherheit, daß auch in solchen Fällen die rein osmotische Methode der Entwicklungserregung zur Entwicklung von Larven führt, wenn man die Konzentration der Hydroxylionen in dem hypertonischen Seewasser erhöht.²⁾ Der Zusatz von Alkali muß in manchen Fällen ziemlich hoch sein. In einem Versuche wurden zu je 50 ccm Seewasser + 10 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl-Lösung 0, 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zugesetzt. Die unbefruchteten

¹⁾ Loeb, Zur Analyse der osmotischen Entwicklungserregung unbefruchteter Seeigeleier. Pflügers Arch. **118**, 181, 1907. Eine vorläufige Mitteilung dieser Versuche erfolgte in Proceedings New York Society for Experimental Biology and Medicine. März 1907.

²⁾ Auf die Bedeutung des Alkalizusatzes zur hypertonischen Lösung hatte ich schon 1906 aufmerksam gemacht (Pflügers Archiv **113**, 505): „Ich habe auch den Eindruck gewonnen, daß hypertonisches Seewasser rascher die künstliche Parthenogenese unbefruchteter Seeigeleier hervorruft, wenn es schwach alkalisch, als wenn es neutral (mit Phenolphthalein als Indikator) ist, beabsichtige aber, hierüber noch weitere Versuche anzustellen.“

Eier eines Weibchens wurden in diese Lösungen verteilt und nach 60, 90, 120, 150 und 240 Minuten wurde je eine Portion der Eier in normales Seewasser übertragen. Die Temperatur des hypertonen Seewassers war $13\frac{1}{2}^{\circ}$ C. Nur zwei dieser Lösungen, nämlich die mit der höchsten Konzentration der Hydroxylionen (1,5 und 2,0 ccm NaHO zu 50 ccm des hypertonen Seewassers) veranlaßten die Eier sich zu Larven zu entwickeln (Expositionsdauer $1\frac{1}{2}$ Stunden). Ein Teil dieser Larven erreichte das Pluteusstadium und schwamm an der Oberfläche des Gefäßes. Im allgemeinen genügt der Zusatz von weniger Natronlauge für die Entwicklungserregung, und für die Eier von manchen Weibchen ist die im Seewasser vorhandene Konzentration der HO-Ionen ausreichend. Es ist schwer zu sagen, warum der Betrag von Alkali, der für die Wirksamkeit hypertoner Lösungen erforderlich ist, so großen Schwankungen unterliegt.

Die Erkenntnis der Bedeutung der Konzentration der Hydroxylionen führte naturgemäß zu der Einsicht, daß die rein osmotische Methode der Entwicklungserregung in Wirklichkeit eine Funktion von wenigstens zwei Variablen war, nämlich der Erhöhung des osmotischen Druckes und der Konzentration der Hydroxylionen. Zunächst war festzustellen, ob in einer neutralen Lösung durch Erhöhung des osmotischen Druckes die unbefruchteten Seeigeleier zur künstlichen Parthenogenese veranlaßt werden können. Es stellte sich heraus, daß auch die maximale Erhöhung des osmotischen Druckes in einer neutralen Lösung meist, aber nicht immer, außerstande ist, das unbefruchtete Ei von *Strongylocentrotus purpuratus* zur Entwicklung zu Larven zu veranlassen, gleichviel, wie lange das Ei auch einer solchen Lösung ausgesetzt bleibt.¹⁾ Für solche Versuche kann man das alkalische Seewasser nicht benutzen; ich wählte daher als neutrale Lösung eine neutrale Mischung von 100 ccm NaCl, 2,2 ccm KCl, 1,5 ccm CaCl₂ und 11,6 ccm MgCl₂, alle Lösungen halbgrammolekular. Diese Lösung ist im Anschluß an van't Hoff's Bestimmung der Zusammensetzung des See-

¹⁾ In Woods Hole dürften die Resultate etwas besser ausfallen, als in Pacific Grove, weil dort das Seewasser, in welches die Eier nach der Behandlung mit neutralem hypertonischem Seewasser übertragen werden, eine höhere Konzentration der Hydroxylionen besitzt.

wassers gewählt, wonach die verschiedenen Salze in folgenden Verhältnissen im Seewasser enthalten sind: 100 Moleküle NaCl, 2,2 Moleküle KCl, 7,8 Moleküle MgCl₂, 3,8 Moleküle MgSO₄ und etwas variierende Mengen von CaCl₂. (Eine solche Mischung, die künstliches Seewasser darstellt, bezeichne ich als van't Hoff'sche Lösung.) Ich habe mir die Vereinfachung erlaubt, MgSO₄ durch MgCl₂ zu ersetzen, was für unsere Zwecke zulässig ist. Wie ich durch lange Erfahrung gefunden habe, darf eine halbgrammolekulare van't Hoff'sche Lösung als ausreichend isosmotisch mit dem hiesigen Seewasser angesehen werden.¹⁾

Ich bezeichne nun im folgenden eine solche van't Hoff'sche Lösung als neutral, welche mit Neutralrot sich eben noch rot färbt, die aber auf Zusatz von nur 0,1 oder 0,2 ccm $\frac{n}{100}$ NaHO einige Minuten lang sich orange färbt, aber dann wieder rot wird. Die Konzentration der Hydroxylionen einer solchen Lösung liegt unter $10^{-6}n$, aber so nahe an dieser Grenze, daß der geringste Alkalizusatz die Konzentration der HO-Ionen auf diese Höhe bringt; durch Diffusion der CO₂ der Luft in die Lösung sinkt aber die Konzentration der HO-Ionen alsbald wieder unter das Niveau von $10^{-6}n$.

Ich will nun durch einige Beispiele die Tatsache erläutern, daß in neutraler Lösung auch die stärkste Erhöhung des osmotischen Druckes die Eier nicht zur Umwandlung in Larven veranlaßt. Zu je 50 ccm einer neutralen van't Hoff'schen Lösung wurden 8, 12, 16, 24 und 32 ccm $2\frac{1}{2}n$ KCl-Lösung zugesetzt. Die Eier eines Weibchens wurden in diese Lösungen verteilt, nachdem sie durch zweimaliges Waschen in van't Hoff'scher Lösung von jeder Spur von Seewasser befreit waren.

¹⁾ Wir erwähnten schon, daß nach Bestimmungen von W. E. Garrey die Gefrierpunktserniedrigung des Seewassers in Woods Hole = 1,818° ist; die Gefrierpunktserniedrigung einer $\frac{m}{2}$ NaCl-Lösung ist = 1,75°,

die einer $\frac{m}{2}$ van't Hoff'schen Lösung (100 Mol. NaCl, 2,2 KCl, 2 CaCl₂, 12 MgCl₂) = 1,845°. Die Gefrierpunktserniedrigung des Seewassers in Pacific Grove findet Garrey = 1,90°, was derjenigen einer 0,54 m NaCl-Lösung gleichkommt. (Gefrierpunktserniedrigung = 1,895°.) Garrey, *Biolog. Bulletin* 8, 287, 1904).

Diese Vorsichtsmaßregel ist für derartige Versuche unerlässlich und ist in all meinen Versuchen angewendet worden. Die Temperatur der hypertonen Lösung betrug 13° C. Nach 25, 45, 75, 105, 145, 185 und 220 Minuten wurde je eine Portion der Eier aus jeder Lösung in normales Seewasser übertragen. Kein einziges Ei entwickelte sich zur Larve. In dem Zusatz von 32 ccm 2¹/₂ n KCl zu 50 ccm der van't Hoff'schen Lösung ist die Grenze des zulässigen osmotischen Druckes erreicht, da bei noch höherem osmotischen Druck sofort Zytolyse der Eier eintritt.¹⁾ Noch lehrreicher ist der folgende Versuch, in welchem Seewasser statt der van't Hoff'schen Lösung angewendet wurde. Es handelte sich um Eier, für die auch die Konzentration der Hydroxylionen im Seewasser unzureichend war. Zu je 50 ccm Seewasser wurde 4, 8, 12, 16, 24 und 32 ccm 2¹/₂ normale NaCl-Lösung zugefügt und ein Teil der Eier eines Weibchens in diese Lösungen verteilt. Nach 20, 40, 70, 100, 135, 210, 273, 346 und 426 Minuten wurde je eine Portion der Eier in normales Seewasser zurückgebracht. In keinem Falle entwickelte sich auch nur ein einziges Ei zu einer Larve. Manche Eier begannen den Furchungsprozeß, der aber bald zum Stillstand kam, ein Umstand, auf den wir später zurückkommen werden. Man hätte nun glauben können, daß es sich hier um Eier handelte, die überhaupt in keiner Weise durch osmotische Einwirkung zur Entwicklung gebracht werden könnten. Es ließ sich aber zeigen, daß es sich hier nur um eine zu niedrige Konzentration der Hydroxylionen handelte. Es wurde deshalb ein Kontrollversuch angestellt, in dem zu je 50 ccm van't Hoff'scher Lösung + 16 ccm 2¹/₂ n NaCl, 0, 0,1, 0,2, 0,4 und 0,8 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zugesetzt und ein Teil der Eier desselben Weibchens in diese Lösungen verteilt wurde. Nach 30, 60, 90, 120 und 210 Minuten wurde je eine Portion dieser Eier in normales Seewasser übertragen. Von den mit der neutralen van't Hoff'schen Lösung behandelten Eiern entwickelte sich kein einziges zu einer Larve, während die 90 bis 120 Minuten mit der alkalischen Lösung behandelten Eier

¹⁾ Loeb, Arch. f. d. ges. Physiol. **103**, 1904 und Untersuchungen über künstliche Parthenogenese S. 288 ff.

Larven bildeten; am zahlreichsten waren die Larven in der Portion der Eier, welche 90 Minuten in der Lösung mit $0,8 \text{ ccm } \frac{n}{10} \text{ NaHO}$ gewesen waren. Hier entwickelten sich 80 % der Eier zu Larven.

Auf der andern Seite ließ sich zeigen, daß in hyperalkalischen Lösungen schon eine relativ geringe Erhöhung des osmotischen Druckes zur Hervorrufung der Larvenbildung bei unbefruchteten Eiern ausreicht und daß größere Erhöhung des osmotischen Druckes nur die zur Larvenbildung nötige Expositionsdauer in der Lösung verkürzt. Als Beispiel diene folgender Versuch: Zu je 50 ccm der van't Hoff'schen Lösung $+ 2,0 \frac{n}{10} \text{ NaHO}$ wurden 0, 2, 4, 8 und 16 ccm $2\frac{1}{2} n \text{ KCl}$ zugefügt. Die unbefruchteten Eier wurden in diese fünf Lösungen verteilt und nach 45, 64, 89, 114 und 144 Minuten wurde je eine Portion der Eier in normales Seewasser übertragen. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Die Erhöhung des osmotischen Druckes ist in der Tabelle abgerundet in Prozenten des Druckes der halbgrammolekularen NaCl-Lösung angegeben.

Expositions- dauer	Erhöhung des osmotischen Druckes der Lösungen um				
	0 %	16 %	30 %	55 %	87 %
45 Minuten	0	0	0	0	Zahlreiche Larven.
64 „	0	0	0	0	Zahlreiche Larven.
89 „	0	0	Zahlreiche Larven.		
116 „	0	0			
144 „	0	0			

Es gelang bei sehr langer Expositionsdauer und genügend hoher Konzentration der Hydroxylionen sogar zweimal, durch Zusatz von 2 ccm $2\frac{1}{2} n \text{ NaCl}$ zu 50 ccm der van't Hoff'schen Lösung die Bildung von einzelnen Larven hervorzurufen.

Wir sehen also, daß die osmotische Methode der Entwicklungserregung eine Kombination von zwei Agentien ist, nämlich hypertonischer Lösung und Alkali.

VII. Welche chemischen Prozesse im Ei werden durch die hypertonische Lösung modifiziert?

Die hypertonische Lösung wirkt durch Wasserentziehung; aber wir müssen die Frage aufwerfen: wie kann die Wasserentziehung die Vorgänge im Ei so beeinflussen, daß eine Entwicklung eintritt? Hier sind zwei Möglichkeiten vorhanden. Entweder sind die Änderungen in der Viskosität oder anderer physikalischer Eigenschaften im Ei für die Wirkung verantwortlich, oder es handelt sich darum, daß die Wasserentziehung gewisse chemische Vorgänge im Ei modifiziert. Durch einen sehr schlagenden Versuch kann man nun zeigen, daß die hypertonische Lösung die Oxydationsvorgänge im Ei modifiziert. Bringt man unbefruchtete oder befruchtete Seeigelleier in hypertonisches Seewasser von der Konzentration, wie es zu Versuchen über künstliche Parthenogenese benutzt wird (d. h. 50 ccm Seewasser + 8 bis 20 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl), und läßt man die Eier etwas zu lange in der hypertonischen Lösung, so bemerkt man nach der Übertragung der Eier in normales Seewasser einen Zerfall derselben in kleine Tröpfchen.¹⁾ Wir wollen diesen Zerfall durch einige Abbildungen klar machen. Der Vorgang der Zytolyse ist ja physikalisch und chemisch noch so wenig aufgeklärt, daß ein Eingehen auf diese Prozesse am Ei, bei dem sie leichter der Analyse zugänglich sind als bei anderen Zellen, gerechtfertigt erscheint. Die unbefruchteten Eier, welche in Fig. 18 bis 24 dargestellt sind, waren 4 Stunden lang bei 12° C in einer hypertonischen Lösung (50 ccm Seewasser + 12 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl) gewesen. Nach der Herausnahme aus dieser Lösung und nach der Übertragung in normales Seewasser sahen diese Eier zunächst wie die normalen unbefruchteten Eier aus (Fig. 18). Nach einigen Minuten wurde aber die Kontur des Eies unregelmäßig (Fig. 19); diese Unregelmäßigkeiten nahmen rasch zu und das Ei nahm in rascher Folge die Formen der Fig. 20 und 21 an.

¹⁾ Loeb, Über die Hemmung der toxischen Wirkung hypertonischer Lösungen auf das Seeigellei durch Sauerstoffmangel und Zyankalium, Pflügers Arch. **113**, 487, 1906 und Untersuchungen über künstliche Parthenogenese, S. 507. Leipzig 1906.

52 Welche chem. Prozesse werden durch hypertonische Lösung modifiziert?

Dann fielen die Tröpfchen auseinander (Fig. 22 und 23). Die hier an einem Ei gezeichneten Zerfallerscheinungen spielten sich in weniger als einer halben Stunde ab.

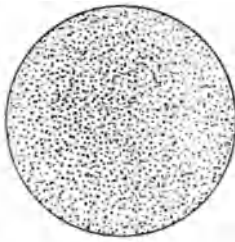


Fig. 18.

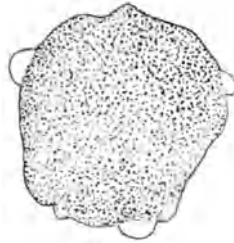


Fig. 19.

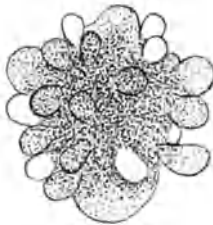


Fig. 20.



Fig. 21.

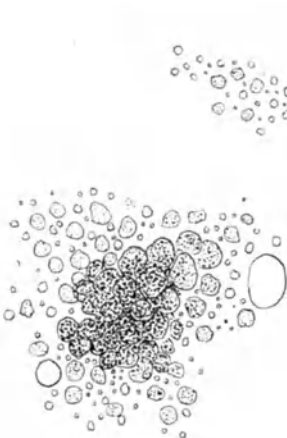


Fig. 22.

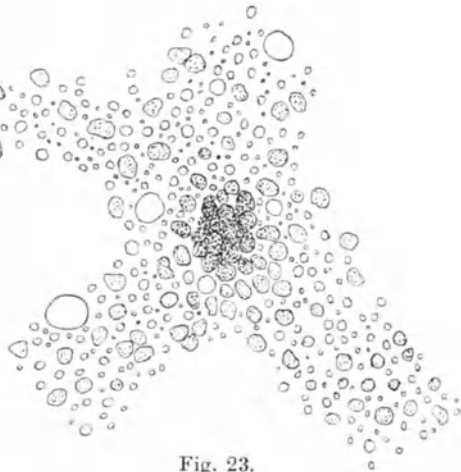


Fig. 23.

Fig. 18 bis 23. Typische Degeneration eines Eies, das längere Zeit mit sauerstoffhaltiger hypertonischer Lösung behandelt wurde. (Siehe Text.)

Nicht alle Eier zerfielen so. Viele Eier gingen in ein Stadium wie das in Fig. 24 dargestellte. Sie waren geschwollen und dunkel, das Zentrum dunkler als die Peripherie. Diesen Zustand bezeichnete ich damals als schwarze Zytolyse. Der Zustand ist derselbe wie in Fig. 22, nur mit dem Unterschiede, daß die Tröpfchen zusammengehalten werden.

Es ist zu beachten, daß die Veränderungen, d. h. dieser Zerfall der Eier, nicht eintritt, während die Eier in der hypertonischen Lösung sind, sondern erst, nachdem sie aus der hypertonischen Lösung in normales Seewasser übertragen sind. Entweder erfolgt der Zerfall sofort oder im Verlaufe von einer halben Stunde oder einer Stunde. Diese Wirkung der hypertonischen Lösung tritt aber nur dann ein, wenn die-

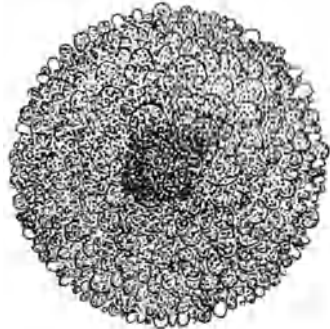


Fig. 24.
(Siehe Text.)

selbe eine genügende Menge von freiem Sauerstoff enthält. Verringert man den Sauerstoffgehalt des Seewassers in hinlänglicher Weise, indem man den Sauerstoff durch einen Strom von chemisch reinem Wasserstoffgas verdrängt, oder hemmt man die Oxydation im Ei, indem man etwas Zyankalium zum Seewasser zusetzt, so bleibt dieser Zerfall der Eier nach der Herausnahme derselben aus der hypertonischen Lösung aus. Einige Beispiele sollen das erläutern.

Seeigeleier (*Strongylocentrotus purpuratus*) wurden mit Samen befruchtet und dann 11 Minuten später in zwei Flaschen verteilt, von denen jede 50 ccm Seewasser und 8 ccm $2\frac{1}{2}$ m CaCl_2 (das leicht alkalisch war) enthielt. Eine dieser Flaschen war mit einem Wasserstoffentwicklungsapparat verbunden, und vor Beginn des Versuches war zwei Stunden lang Wasserstoff durchgeleitet worden. Auch nachdem die Eier in diese Flaschen gebracht waren, wurde die Durchleitung des Wasserstoffs fortgesetzt. In der anderen Flasche mit 50 ccm Seewasser und 8 ccm $2\frac{1}{2}$ m CaCl_2 blieb die Lösung der Luft ausgesetzt. Die Temperatur war 15°C . Nach 4 Stunden und 14 Minuten wurde

je eine Partie Eier aus der lufthaltigen und der wasserstoffhaltigen hypertonischen Lösung in normales Seewasser zurückgebracht. Das Ergebnis war außerordentlich schlagend. Die Eier, welche in Gegenwart der Luft dem hypertonischen Seewasser ausgesetzt gewesen waren, gingen alle rasch unter tropfenförmigem Zerfall zugrunde. Kein einziges Ei furchte oder entwickelte sich. Die Eier hingegen, welche in dem hypertonischen Seewasser gewesen waren, in dem die Luft durch Wasserstoff ersetzt war, furchten sich alle ohne Ausnahme und viele entwickelten sich zu normalen Pluteen. Solche Eier können auch leiden, aber nicht durch die Wirkung der hypertonischen Lösung, sondern durch den Sauerstoffmangel.

Der folgende Versuch war ebenfalls mit befruchteten Eiern ausgeführt. Dieselben waren 10 Minuten nach der Befruchtung in zwei Flaschen verteilt, von denen jede 50 ccm Seewasser + 17 ccm $2\frac{1}{2}$ m neutrales NaCl enthielt. In der einen Flasche war die Luft vorher durch einen Wasserstoffstrom ausgetrieben worden. Die Durchleitung von Wasserstoff wurde auch nach dem Einbringen der Eier fortgesetzt, da ja Spuren von Luft mit dem Übertragen der Eier wieder in die Lösung gelangten. Der Inhalt der zweiten Flasche blieb dauernd in Berührung mit Luft. Nach 2 Stunden und 10 Minuten wurden die Eier aus beiden hypertonischen Lösungen in normales Seewasser zurückgebracht. Die Eier, welche in der hypertonischen Lösung in Berührung mit Luft gewesen waren, gingen im Laufe der ersten halben Stunde nach der Übertragung in normales Seewasser zugrunde, und zwar in ähnlicher Weise wie in Fig. 21 bis 25. Von den Eiern dagegen, welche in der Wasseratmosphäre gewesen waren, ging etwa ein Ei unter 500 zugrunde, während die anderen sich furchten und zu normalen Pluteen sich entwickelten. Offenbar war die Luft nicht hinreichend vollständig verdrängt worden, sonst hätten sich alle Eier entwickelt, und sonst wäre keins zugrunde gegangen.

Ich wollte mich nun überzeugen, ob die hypertonische Lösung, durch welche Wasserstoff geleitet worden war, die Eier schädigt, wenn sie hinterher in Berührung mit Luft kommt. Es wurden deshalb nicht alle Eier aus der hypertonischen Lösung genommen, nachdem die letztere vom Wasserstoffentwicklungsapparat entfernt war, sondern ein Teil der Eier blieb

in der Lösung und wurde dann der Luft ausgesetzt. Nach einer halben Stunde wurde eine Portion dieser letzteren Eier in normales Seewasser zurückgebracht. Etwa 30 % der Eier gingen zugrunde, während die übrigen sich entwickelten. Nach 1 Stunde 40 Minuten wurde wieder eine Portion Eier in normales Seewasser zurückgebracht. Diesmal gingen alle Eier unter tropfenförmigem Zerfall zugrunde.

Noch viel schlagender fallen die Versuche mit unbefruchteten Eiern aus, weil dieselben durch Sauerstoffmangel viel weniger leiden als befruchtete Eier. Während beispielsweise in einem Versuche unbefruchtete Eier, welche 140 Minuten in Gegenwart von freiem Sauerstoff in einer Lösung von 50 ccm Seewasser + 17 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl gewesen waren, alle in Tröpfchen zerfielen, nachdem sie in normales Seewasser zurückgebracht wurden, blieben die unbefruchteten Eier, welche in derselben Lösung und derselben Temperatur ($16\frac{1}{2}^{\circ}$ C), aber ohne Sauerstoff gewesen waren, alle völlig intakt. Dasselbe war der Fall bei den unbefruchteten Eiern, welche bei Sauerstoffmangel 335 Minuten in dieser Lösung gewesen waren. Daß diese Eier nicht nur dem Aussehen nach, sondern in Wirklichkeit unversehrt waren, ging daraus hervor, daß sie bei Samenzusatz sich normal furchten und entwickelten.

Ebenso kann man die zerstörende Wirkung der hypertonischen Lösung auf befruchtete und unbefruchtete Eier dadurch aufheben, daß man derselben etwas Zyankalium zusetzt. Der Zusatz von 1 bis 2 ccm einer $\frac{1}{20}$ proz. Lösung von KCN zu 50 ccm der hypertonischen Lösung genügt für den Zweck. Das Zyankalium hemmt, wie wir durch die Versuche von Schönlein und Geppert wissen, die Oxydationsvorgänge im Ei. Wegen der Einfachheit dieser Versuche möge ein Beispiel genügen. Zwei Lösungen von je 50 ccm Seewasser + 10 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl wurden hergestellt und zu einer der beiden Lösungen wurde 2 ccm $\frac{1}{20}$ proz. KCN zugefügt. Die unbefruchteten Eier desselben Seeigels wurden in beide Lösungen verteilt und nach verschiedenen Intervallen in normales Seewasser zurückgebracht. Die Eier, welche in der zyankaliumfreien Lösung gewesen waren, zerfielen alle schon, wenn sie nach 305 Minuten (Temperatur ca. 14° C) in normales Seewasser übertragen wurden. Die Eier dagegen, welche in der zyan-

kaliumhaltigen hypertonischen Lösung gewesen, blieben normal, wenn sie selbst 24 Stunden in derselben gewesen waren. Wurden sie um diese Zeit in normales Seewasser übertragen, so behielten sie ihr normales Aussehen, und daß sie in Wirklichkeit normal waren, ging daraus hervor, daß sie sich auf Samenzusatz furchten und zu Larven entwickelten. Freilich ist die schützende Wirkung des Zyankaliums nicht unbegrenzt. Länger als 30 Stunden hielt die Wirkung nicht an. Das dürfte aber zum Teil darauf beruhen, daß das Zyankalium allmählich in HCN umgewandelt wird und verdampft, so daß die Lösung von KCN zu schwach wird, um die Oxydationen in den Eiern zu verhindern.

Diese Versuche lassen keinen Zweifel daran, daß die toxischen oder schädlichen Wirkungen einer hypertonischen Lösung auf das befruchtete und unbefruchtete Ei auf Oxydationsvorgänge zurückzuführen sind. Das Ei wird zu Tode oxydiert. Warum der Zerfall des Eies erst stattfindet, nachdem es in normales Seewasser zurückgebracht wird, und nicht, während es im hypertonischen Seewasser bleibt, muß erst durch weitere Versuche aufgeklärt werden.

Nicht nur Zyankalium, sondern auch gewisse andere Stoffe sind imstande, die toxischen Wirkungen hypertonischer Lösungen auf das Ei zu hemmen resp. abzuschwächen. Dahin gehört beispielsweise Chloralhydrat. Fügt man 2—3 ccm einer $\frac{n}{10}$ Chloralhydratlösung zu 50 ccm der hypertonischen Lösung, so wird die schädliche Wirkung derselben auf das Seeigeli ein wenig vermindert. Aber die Wirkung ist nur sehr klein verglichen mit der Wirkung des Zyankaliums. Auch der Zusatz von 3 ccm einer 1 proz. Lösung von Nikotin verringert die schädliche Wirkung einer hypertonischen Lösung ein wenig, aber immerhin deutlich. Auch der Zusatz von etwas Säure zum hypertonischen Seewasser schwächt die toxische Wirkung desselben ab (z. B. Zusatz von 0,5 ccm $\frac{n}{10}$ NHO_3 zu 50 ccm des hypertonischen Seewassers). Der Zusatz von NaHO erhöht dagegen die toxische Wirkung der hypertonischen Lösung.

Alle diese Mittel, welche die toxische Wirkung der hypertonischen Lösung hemmen, hemmen auch die Oxydationsvor-

gänge im Ei. Das läßt sich indirekt dadurch zeigen, daß sie die Furchung des befruchteten Eies in normalem Seewasser hemmen. Für das Zustandekommen der Furchung sind Oxydationsvorgänge erforderlich, wie im zweiten Kapitel schon erwähnt wurde. Alkali beschleunigt die Furchung etwas (solange man nicht zu viel zusetzt), vermutlich weil es die Oxydationen beschleunigt. Der Schluß, daß Chloralhydrat die Oxydationsvorgänge hemmt oder verzögert, hat vielleicht für die Theorie der Wirkung der Narcotica eine Bedeutung.

Was hier für die Wirkung von hypertonischem Seewasser gesagt wurde, gilt auch für die Wirkungen hypertonischer Lösungen von nur einem Stoffe, wie beispielsweise NaCl, Rohrzucker usw.

Wir haben bisher nur von der Bedeutung des freien Sauerstoffs für die schädigenden Wirkungen der hypertonischen Lösungen gesprochen. Ist es für die entwicklungsregende Wirkung der hypertonischen Lösung ebenfalls nötig, daß dieselbe freien Sauerstoff enthält? Diese Frage muß unbedingt mit Ja beantwortet werden. Vertreibt man aus einer hypertonischen Lösung den Sauerstoff hinreichend gründlich, so ist diese Lösung nicht mehr imstande, die unbefruchteten Eier des Seeigels zur Entwicklung zu veranlassen. Als Beispiel diene folgender Versuch: Aus einer Reihe von Flaschen, deren jede 50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl enthielt, wurde durch mehrstündiges Durchleiten von chemisch reinem Wasserstoff die Luft vertrieben und dann wurde in jede Flasche eine Pipette voll mit Eiern eines Seeigels gebracht. Dieses Einbringen wurde mit Hilfe eines Assistenten vorgenommen, und zwar in der Weise, daß der Stöpsel der Flasche etwa 1 bis 2 Sekunden lang nur an einer Seite bis über den Rand der Flasche erhoben wurde und die bereit gehaltene Pipette mit Eiern während dieser Zeit hineingespritzt wurde. Die Durchleitung von H war nicht unterbrochen worden und ging während der ganzen Versuchsdauer weiter. Ein Teil der Eier wurde in 50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl gebracht, das in Berührung mit Luft blieb. Nach 128 und 180 Minuten wurde je eine Probe der Eier in normales Seewasser zurückgebracht. Die Eier, welche in dem sauerstoffhaltigen Seewasser gewesen waren und nach 128 Minuten in normales Seewasser übertragen wurden, ent-

wickelten sich fast alle zu Larven; die Eier, welche nach 180 Minuten in normales Seewasser übertragen wurden, zerfielen fast alle in Tropfen, und nur wenige entwickelten sich. Von den Eiern jedoch, welche in der Wasserstoffatmosphäre in den hypertonischen Lösungen gewesen waren, entwickelte sich kein einziges, als sie nach 128 und nach 180 Minuten in normales Seewasser übertragen wurden. Die Eier sahen normal aus, und daß sie auch normal waren ging daraus hervor, daß sie sich nach Samenzusatz normal entwickelten.

In diesen Versuchen war natürlich nicht aller Sauerstoff aus den hypertonischen Lösungen getrieben worden: es war nur der Druck des Sauerstoffs unter das Minimum heruntersgesetzt worden, das für die entwicklungs-erregende Wirkung der hypertonischen Lösung nötig ist.

Wir wollen einen weiteren Versuch hier anführen. Unbefruchtete Eier eines Weibchens wurden in fünf Flaschen, von denen jede 50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl enthielt, verteilt. Eine Flasche bleibt offen, d. h. der Luft ausgesetzt, stehen; die anderen, aus denen durch eine 2 Stunden lange Wasserstoffdurchströmung die Luft verdrängt war, bleiben dem Wasserstoffstrom auch ferner ausgesetzt. Nach 2, 3, $4\frac{1}{2}$ und $5\frac{1}{2}$ Stunden wurde je eine Flasche vom Wasserstoffapparat getrennt und die darin enthaltenen Eier wurden in normales lufthaltiges Seewasser übertragen. Die Eier waren völlig unverändert und furchten und entwickelten sich nicht. Daß sie nicht bloß dem Ansehen nach, sondern auch in Wirklichkeit unverändert waren, ging daraus hervor, daß sie sich auf Samenzusatz¹⁾ alle normal furchten und entwickelten. Gleichzeitig wurde stets auch eine Probe Eier aus dem lufthaltigen hypertonischen Seewasser in normales Seewasser übertragen. Die nach zwei Stunden aus dem lufthaltigen hypertonischen in normales Seewasser übertragenen Eier entwickelten sich in großer Zahl in normale Blastulae; von den nach 3 Stunden aus dem lufthaltigen hypertonischen in normales Seewasser übertragenen Eiern entwickelten sich nur etwa 1⁰/₀, der Rest zerfiel in kleine Tröpfchen.

¹⁾ Der Same darf erst eine halbe Stunde später, nachdem die Eier aus dem Sauerstoffvakuum kommen, zugesetzt werden, andernfalls sind die Resultate nicht so günstig; vermutlich muß das Ei freien Sauerstoff aufgenommen haben, ehe das Spermatozoon eintritt.

Die nach $4\frac{1}{2}$ und $5\frac{1}{2}$ Stunden herausgenommenen zerfielen alle in dieser Weise. Wir verstehen auch jetzt eine Erscheinung, die bei der Entwicklungserregung der Eier mit hypertonischen Lösungen immer wieder auffällt, nämlich daß die Entwicklung der Eier nur dann eintritt, wenn die Sauerstoffversorgung derselben in der hypertonischen Lösung eine genügende ist. Liegen die Eier in einer dichten Masse übereinander, so machen sie sich den Sauerstoff gegenseitig streitig und die hypertonische Lösung bleibt wirkungslos. Dasselbe findet statt, wenn die Eier von einer zu hohen Wasserschicht bedeckt sind, welche die Diffusion des Sauerstoffs zu den Eiern verzögert.

Aus allen diesen Versuchen zog ich den Schluß, daß die entwicklungs-erregende Wirkung der hypertonischen Lösung nur dann möglich ist, wenn in derselben eine genügende Menge freien Sauerstoffs zugegen ist. „Der Gedanke, daß eine hypertonische Lösung durch Oxydationserregung resp. Oxydationsbeschleunigung wirken könne, war, soviel mir bekannt, neu oder geradezu unerwartet“¹⁾. Diese Ansicht von der oxydationsbeschleunigenden Wirkung der hypertonischen Lösung erhält durch direkte Messungen des Sauerstoffverbrauchs bei Seeigeleiern eine Stütze. O. Warburg hat gefunden, daß „sich der Sauerstoffverbrauch unbefruchteter Eier in derartigen hypertonischen Lösungen bis auf das zehnfache steigern läßt“²⁾. Das ist aber nur dann der Fall, wenn die Konzentration der Lösung den für die künstliche Parthenogenese nötigen Schwellenwert übersteigt.

Wir werden späterhin noch weitere Gelegenheit haben, das hier Gesagte zu bestätigen. Wir werden auch sehen, daß der Temperaturkoeffizient für die Wirksamkeit hypertonischer Lösungen von der Größenordnung ist, die für chemische Reaktionen charakteristisch ist.

1) Loeb, Pflügers Arch. **113**, 491, 1906.

2) O. Warburg, Beobachtungen über die Oxydationsprozesse im Seeigelei. Zeitschr. f. physiol. Chem. **57**, 1, 1908.

VIII. Die verbesserte Methode der künstlichen Parthenogenese beim Seeigelei.

Ich hatte schon in meinen ersten Mitteilungen darauf hingewiesen, daß die rein osmotische Methode der Entwicklungserregung keine genaue Nachahmung des Prozesses der Samembefruchtung ist. Wenn man Seeigeleier durch Samen befruchtet, so besteht die erste, fast momentane Wirkung des Spermatozoons darin, daß sich das Ei mit einer Membran, der sogenannten Befruchtungsmembran, umgibt¹⁾. Dieser Membranbildungsprozeß, der so außerordentlich auffallend bei Samembefruchtung ist, war nun bei der osmotischen Entwicklungserregung unbefruchteter Eier nicht beobachtet worden.

Ein zweiter Unterschied zwischen den parthenogenetischen Larven und den durch Samembefruchtung erzeugten bestand darin, daß die letzteren an der Oberfläche des Wassers schwammen, während die ersteren sich oft nicht vom Boden erheben konnten.

Ein dritter Unterschied war die Art und Geschwindigkeit der Entwicklung beider Klassen von Eiern bei derselben Temperatur. Am unangenehmsten aber war die Unbeständigkeit der Resultate bei Anwendung der osmotischen Methode auf die Eier von *Strongylocentrotus*. Manchmal erhielt ich fast keine Larven, manchmal nur sehr wenige, manchmal aber auch eine beträchtliche Zahl.

Das brachte mich auf den Gedanken, daß die osmotische Entwicklungserregung nur eine unvollständige Nachahmung des Befruchtungsprozesses sei, und daß es sich bei der Befruchtung durch ein Spermatozoon vielleicht nicht um ein einziges chemisches Agens, sondern um eine Kombination von zwei oder mehr Agenzien handle, die nur zufällig im Spermatozoon vereinigt seien. Dieser Gedanke erwies sich als richtig. Ich hatte gerade vorher verschiedene Ester als besonders wirksam bei heliotropischen Versuchen gefunden und versuchte nun die Einwirkung von Äthylazetat auf die unbefruchteten Eier von *Strongylocentrotus purpuratus*.

¹⁾ Das ist allerdings nur bei frischen Eiern der Fall. Liegen die Eier 48 Stunden oder länger im Seewasser, so bilden sie bei der Samembefruchtung keine Membran mehr, oder nur eine dem Ei sehr dicht anliegende Membran, aber sie entwickeln sich doch.

1. Es stellte sich heraus, daß, wenn man solche Eier in Seewasser bringt, dem man etwas Äthylazetat zusetzt, die Eier nach dem Zurückbringen in normales Seewasser eine typische Befruchtungsmembran bilden und anfangen sich zu furchen. Wenn die Eier dauernd in dem äthylazetathaltigen Seewasser blieben, so bildeten sie keine Membran; auch verloren sie die Fähigkeit zur Membranbildung, wenn sie zu lange in solchem Seewasser verweilten. Sie bildeten aber eine Membran, wenn sie nur ein paar Minuten dem äthylazetathaltigen Seewasser ausgesetzt blieben und dann in normales Seewasser zurückgebracht wurden. Eier, die auf diese Weise behandelt waren, bildeten nach einigen Stunden alle eine völlig normale Kernspindel und fingen an, sich zu furchen. Zu einer Entwicklung zu Larven kam es im allgemeinen nicht, vielmehr gingen die Eier alle in weniger als 24 Stunden (bei ungefähr 19° C) zugrunde, ohne je das Blastulastadium zu erreichen. Völlig überraschend war aber das folgende Resultat. Wenn man die Eier von *Strongylocentrotus* 2 Stunden in hypertonisches Seewasser brachte, so entwickelte sich oft nur ein Bruchteil von einem Prozent der Eier. Wenn man aber einen Teil dieser Eier hinterher so lange mit Äthylazetat behandelte, daß die Eier nach der Übertragung in normales Seewasser eine Membran bildeten, so entwickelte sich die Mehrzahl der Eier, und viele derselben entwickelten sich in normaler Weise. Die Furchung bei diesen letzteren Eiern verlief normal und mit normaler Geschwindigkeit, und ein Teil der Larven — vermutlich die aus den normal gefurchten Eiern entstandenen — stieg an die Oberfläche des Wassers. Damit war also eine wesentlich bessere Nachahmung des Befruchtungsvorganges erzielt.¹⁾

2. Der nächste Schritt bestand nun darin, festzustellen, ob es sich hier um eine spezifische Wirkung des Esters oder einer seiner Spaltungsprodukte handele. Es stellte sich heraus, daß das letztere der Fall war und daß jede einbasische Fettsäure, Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Valeriansäure usw. die Membranbildung hervorruft.

Bringt man die unbefruchteten Eier von *Strongylocentrotus*

¹⁾ Loeb, On an Improved Method of Artificial Parthenogenesis. University California Publications 2, 83, 1905. (Untersuchungen S. 315.)

purpuratus bei 15°C in 50 ccm Seewasser + 2,8 ccm $\frac{n}{10}$ Buttersäure und läßt man sie in dieser Lösung etwa $1\frac{1}{2}$ bis $2\frac{1}{2}$ Minuten, so bilden alle Eier Membranen, wenn sie in normales Seewasser zurückgebracht werden. Werden sie zu früh aus dem säurehaltigen Seewasser in normales Seewasser zurückgebracht, so bilden sie keine Membranen; bleiben die Eier zu lange in demselben, so tritt ebenfalls keine Membranbildung ein, weil die Säure sie schädigt. In dem säurehaltigen Seewasser bilden die Eier nie Membranen, die Membranbildung tritt erst ein, nachdem die Eier in normales Seewasser zurückgebracht sind.¹⁾

Tritt also eine dieser Fettsäuren oder Kohlensäure, die ebenfalls imstande war, eine Membranbildung im unbefruchteten Ei von *Strongylocentrotus* hervorzurufen, in das Ei, so wirkt sie wie Äthylazetat, indem sie die Membranbildung auslöst. Wenn man nun die unbefruchteten Eier von *Strongylocentrotus* erst 2 Stunden in hypertonisches Seewasser brachte und sie dann hinterher mit einer einbasischen Fettsäure behandelte, d. h. sie $1\frac{1}{2}$ bis $2\frac{1}{2}$ Minuten bei 15°C in 50 ccm Seewasser + 2,8 ccm $\frac{n}{10}$ Buttersäure brachte, so daß sie bei der Übertragung in normales Seewasser alle Membranen bildeten, so entwickelten sich alle oder die Mehrzahl der Eier zu Larven; während von den mit dem hypertonischen Seewasser allein behandelten Eiern desselben Weibchens sich oft, wie gesagt, weniger als $1\frac{1}{10}$ entwickelten.

3. Ist die entwicklungserrigende Wirkung der Säuren eine direkte oder nur eine indirekte, durch den Membranbildungsprozeß vermittelte? Die Membranbildung ist ja, wie alle morphologischen Veränderungen bei der Zellteilung und Befruchtung, nur die Wirkung chemischer oder physikalischer Änderungen im Ei, und gerade die letzteren sind die für die Entwicklung in Betracht kommenden Ursachen.

Die Frage, die uns also hier beschäftigt ist die, ob die Fettsäure direkt als solche chemisch oder katalytisch die Entwicklung bedingt, oder ob ihre Wirkung sich nur auf Auslösung

¹⁾ Loeb, Untersuchungen über künstliche Parthenogenese. Leipzig 1906. S. 329.

des Membranbildungsprozesses beschränkt, und der letztere Prozeß, der bisher für etwas sehr Nebensächliches betrachtet worden ist, als für die Entwicklung wesentlich sich herausstellt? Die Frage muß für den kalifornischen Seeigel im letzteren Sinne beantwortet werden, wie die folgenden Tatsachen beweisen. Wenn man die unbefruchteten Eier eines Seeigels, *St. purpuratus*, $1\frac{1}{2}$ bis $2\frac{1}{2}$ Minuten bei 15°C in 50 ccm Seewasser + 2,8 ccm $\frac{n}{10}$ einer einbasischen Fettsäure bringt, so bilden nach der Übertragung in Seewasser alle Eier eine Membran. Dieses Resultat ist so konstant, daß ich so gut wie niemals eine Ausnahme hiervon gefunden habe. Bringt man aber die Eier etwas früher aus dem säurehaltigen Seewasser in normales Seewasser zurück, so findet man einen Zeitpunkt, in dem nicht mehr alle Eier, sondern nur ein Teil derselben eine Membran bildet. Man wird finden, daß nur solche Eier bei der nachträglichen oder voraufgehenden Behandlung mit hypertonischem Seewasser sich entwickeln, welche eine Membran gebildet haben.¹⁾ Die Membranbildung ist also der für die Entwicklung entscheidende Umstand.

Ein weiterer Beweis liegt in folgender Tatsache. Bereits 1887 veröffentlichten O. und R. Hertwig²⁾ die Tatsache, daß, wenn man unbefruchtete Eier des Seeigels in Seewasser bringt, das mit Chloroform gesättigt ist, — nur Spuren dieser Substanz sind im Seewasser löslich, — die Eier in solchem Seewasser Membranen bilden. Später fand Herbst³⁾, daß Benzol, Toluol und Kreosot ähnlich wirken. Ich habe diese Versuche wiederholt und gefunden, daß in der Tat die Eier, wenn sie mit diesen Stoffen behandelt werden, Membranen bilden, daß sie aber rasch der Zytolyse unterliegen und in „Schatten“ ver-

¹⁾ Der Anfänger muß berücksichtigen, daß die Membran dem Ei gelegentlich eng anliegt und daß gelegentlich der Membranbildungsprozeß nicht vollständig ist, sondern nur in der Bildung winziger Bläschen besteht. Solche Eier können sich aber entwickeln.

²⁾ O. und R. Hertwig, Untersuchungen zur Morphologie und Physiologie der Zelle, Heft 5. Jena 1887.

³⁾ Herbst, *Biolog. Centralbl.* **13**, 14, 1893, und Mitteilungen aus der *Zoolog. Station Neapel* **16**, 445, 1904. Das Benzol ist im Seewasser nur spurenweise löslich. Etwa 1 ccm Benzol wird zu 100 ccm zugesetzt, das ganze wird tüchtig geschüttelt. In solchem Seewasser bilden die Eier Membrane und zytolysieren.

wandelt werden. Arbeitet man aber sehr rasch und bringt man die Eier unmittelbar nach der Membranbildung in normales Seewasser, so kann man sie vor der Zytolyse bewahren. Setzt man nun solche Eier, die eine Membran besitzen, die aber vor der Zytolyse gerettet werden, der Behandlung mit hypertonischem Seewasser aus, so entwickeln sie sich wie befruchtete Eier oder Eier mit einer Fettsäuremembran nach voraufgegangener Behandlung mit hypertonischem Seewasser.

Es sind nicht nur Benzol, Chloroform, Toluol, die so wirken, sondern, wie es scheint, allgemein Kohlenwasserstoffe und gewisse Substitutionsprodukte derselben. Auch Amylen bewirkt, wie ich gefunden habe, eine Membranbildung. Der Unterschied zwischen der Hervorrufung der Membranbildung durch Kohlenwasserstoffe und Fettsäuren liegt darin, daß bei der Fettsäurebehandlung die Eier erst eine Membran bilden, wenn sie aus dem säurehaltigen Seewasser in normales Seewasser zurückgebracht sind; behandelt man aber die Eier mit Benzol oder Amylen, so bilden sie ihre Membran während sie in dem benzolhaltigen Seewasser sind. Für die Entwicklung ist also die Membranbildung das Wesentliche und es ist Nebensache wie die Membranbildung hervorgerufen wird; nur ist es praktisch von Bedeutung, daß die Hervorrufung der Membranbildung durch eine Fettsäure die Eier weniger schädigt als die durch Benzol und ähnliche Stoffe.

4. Die bisher geschilderten Versuche mit der Kombination der beiden Agenzien geben nicht die natürliche Reihenfolge wieder. Die natürliche Befruchtung mit Samen beginnt mit der Membranbildung, und es war daher natürlich, daß auch bei der künstlichen Parthenogenese die Hervorrufung der Membranbildung durch eine Fettsäure der erste Akt sein mußte.

Die Eier wurden deshalb der Fettsäurebehandlung ausgesetzt, bis sie alle Membranen bildeten. 10 bis 20 Minuten später wurden sie in hypertonisches Seewasser gebracht. Es stellte sich heraus, daß bei dieser Reihenfolge der Eingriffe die Eier nur relativ kurze Zeit in der hypertonischen Lösung bleiben dürfen, nämlich etwa 20 bis 50 Minuten bei etwa 15° C. Die Entwicklung der Eier ist bei richtiger Anwendung dieser Methode nahezu identisch mit der durch Samen bewirkten. So gut wie alle Eier entwickeln sich.

Das Verfahren für die chemische Entwicklungserregung des unbefruchteten Eies von *Strongylocentrotus purpuratus* gestaltet sich demnach folgendermaßen. Die Eier werden in 50 ccm Seewasser + 2,8 ccm $\frac{n}{10}$ Buttersäure gebracht (die vorher gründlich gemischt wurden). Bei 15° C wird nach 1½, 2, 2½ und 3 Minuten je eine Portion der Eier in je 200 ccm Seewasser übertragen, das vorher für diesen Zweck bereitgestellt wurde. In einer oder mehreren dieser Schalen bilden alle Eier normale Befruchtungsmembranen.

Es ist dabei zu beachten, daß man nicht zu viele Eier in das säurehaltige Seewasser bringen darf, da sonst die Säuremenge nicht ausreicht. Es ist auch nötig, die Eier vor dem Übertragen in das normale Seewasser durch gelindes Rotieren des Gefäßes auf einen Haufen zusammenzubringen, so daß man sie mit einer Pipette mit nur wenig Säure in das normale Seewasser übertragen kann.

Nachdem die Eier aus dem säurehaltigen Seewasser in normales Seewasser übertragen sind, bringe man sie nicht sofort in das hypertonische Seewasser, sondern erst nach 15 bis 20 Minuten oder noch etwas später. Das hypertonische Seewasser ist in diesem Falle eine Mischung von 50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2} n$ NaCl. Von hier werden sie nach 15 bis 60 Minuten bei 15° C in Intervallen von je 5 Minuten in normales Seewasser übertragen. Nach der Übertragung in normales Seewasser fangen diejenigen Eier, welche gerade lange genug in dem hypertonischen Seewasser gewesen waren, an sich zu furchen und zu entwickeln. Im allgemeinen werden bei dieser Methode und der richtigen Wahl der Exposition nur zwei Astrosphären oder Zentrosomen gebildet, und die erste Furchung ist eine Durchschnürung des Eies in zwei Zellen, wie bei der normalen Befruchtung. Nur die Zelldurchschnürung erfolgt bei der ersten Furchung oft nicht gleichzeitig im ganzen Äquator auf einmal, wie bei der normalen Furchung. Das ist wohl eine Folge der Behandlung des Eies mit hypertonischem Seewasser. Diese Anomalie zeigt sich aber nur bei der ersten Furchung und hat keinen weiteren Einfluß auf die Entwicklung. Alle die Eier, welche sich in zwei Zellen zerschnüren, entwickeln sich anscheinend zu normalen Larven, während die Eier, welche sich

in mehr als zwei Zellen auf einmal furchen, sich zu verkrüppelten Larven entwickeln, die meist im Gastrulastadium oder noch früher absterben. Diese letztere abnorme Art der Entwicklung wird regelmäßig erzielt, wenn die Eier zu lange in der hypertonen Lösung bleiben, und eine Überexposition von nur wenigen Minuten kann diese fatale Wirkung haben. Das beweist, wie nötig es ist, daß die Eier rechtzeitig aus der hypertonen Lösung in normales Seewasser übertragen werden.

Es ist ferner nötig, daß nicht zu viele Eier in eine Schale mit hypertonischem Seewasser gebracht werden, da sie sich sonst den Sauerstoff gegenseitig streitig machen. Auch muß man die Eier in flachen Schalen halten, damit die Wasserschicht, welche dieselbe bedeckt, nicht zu hoch ist und so die Diffusion des Sauerstoffs der Luft zu den Eiern zu stark verzögert. Die Schalen bedecke ich gewöhnlich lose mit einer Glasplatte.¹⁾

Europäische Forscher haben bei dem Versuch, meine Methode der künstlichen Membranbildung zu wiederholen, keine so günstigen Resultate gehabt wie ich. Ich habe oft beobachtet, daß die Resultate schlechter werden, wenn die Seeigel vorher an Sauerstoffmangel gelitten haben (z. B. wenn sie mehrere Stunden in einem Eimer gestanden haben), oder wenn die Eier einige Zeit lang im Seewasser bei höherer Temperatur gelegen haben. Da mein Laboratorium so situiert ist, daß ich die Tiere direkt für den Versuch von den Felsen an der Küste nehme, so mag das vielleicht etwas mit meinen besseren Erfolgen zu tun haben.

IX. Die Wirkung der künstlichen Membranbildung auf das Ei.

Wir werden weiterhin sehen, daß für das Seesternei und das Ei verschiedener Anneliden (Polynoe und Thalassema) die Hervorrufung der künstlichen Membranbildung ausreicht, um die unbefruchteten Eier zur Entwicklung der Larven zu veranlassen. Auch bei den Eiern der neapolitanischen Seeigel

¹⁾ Andere Variablen, die bei dieser Methode noch in Betracht kommen, sollen im nächstfolgenden Kapitel besprochen werden.

scheint nach den Versuchen von Herbst, auf die wir später zurückkommen, etwas Ähnliches der Fall zu sein. Die Eier des kalifornischen Seeigels, die unter all den von mir untersuchten Eiern die geringste Tendenz zur parthenogenetischen Entwicklung haben, entwickeln sich meist nicht zu Larven, wenn man bloß die künstliche Membranbildung bei denselben veranlaßt. Wohl aber tritt ausnahmslos der Anfang der Entwicklung bei denselben ein. Es hängt von der Temperatur ab, wie weit die Entwicklung geht. Ist die Temperatur sehr niedrig (etwa 2° bis 5°), so furchen sich die Eier sehr langsam und regelmäßig, und sie können sich zu schwimmenden Larven entwickeln¹⁾, allein sie überleben das Blastulastadium nicht. Ist die Temperatur ein wenig höher, etwa bis 10° oder 12° , so gehen die Eier ins Zwei-, Vier-, Acht- und sogar Sechzehnstellenstadium, aber nicht weiter. Ist die Temperatur noch höher, etwa 15° bis 18° C, so kommt es nur zu einer Astrosphärenbildung oder Kernteilung, aber die Entwicklung gerät dann ins Stocken und die Eier furchen sich nicht.

Es ist außerordentlich auffallend und theoretisch und praktisch wichtig, daß in allen diesen Fällen die Furchung völlig regelmäßig erfolgt, und daß auch bei 15° und selbst 18° eine völlig normale Spindel gebildet wird, genau wie bei der Entwicklungserregung durch Samen. Man hat unter diesen Umständen die Empfindung, daß die Membranbildung allein zur Bildung normaler Larven führen sollte. Warum geschieht das nicht? Die Antwort lautet, daß in diesen Eiern, bei denen man die künstliche Membranbildung hervorgerufen hat, zwar die Entwicklung eintritt, daß aber bald auch ein Zerfallprozeß beginnt, der der Entwicklung und dem Leben des Eies ein Ende bereitet. Diesen Prozeß wollen wir nun näher kennen lernen, und zwar an der Hand einiger Abbildungen. Fig. 25 gibt das Bild eines Eies einige Stunden nach der künstlichen Membranbildung, in dem die Kernspindel sichtbar ist. Zur weiteren Entwicklung kam es nicht, aber etwas später sieht man (Fig. 26) einige helle Tröpfchen, welche wie Polkörperchen aussehen, aus dem Ei treten; wie ich vermute, findet dieser Austritt der Tröpfchen in der Äquatorialebene

¹⁾ Loeb, Untersuchungen S. 490. — Biochem. Zeitschr. 1, 203, 1906.

statt. Dieser Zerfall schreitet dann weiter (Fig. 27) und endlich ist das Ei fast völlig zerfallen (Fig. 28).

Während die Figuren 26 bis 28 ein Bild des Eizerfalls bei Zimmertemperatur geben, ist in den Figuren 29 bis 33 der Beginn des Zerfalls bei etwas niedrigeren Temperaturen dargestellt. Die Eier waren nach der Membranbildung mit Butter-

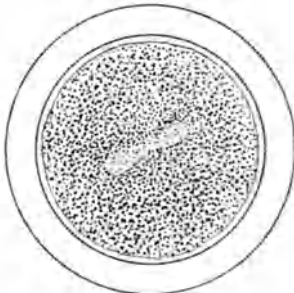


Fig. 25.

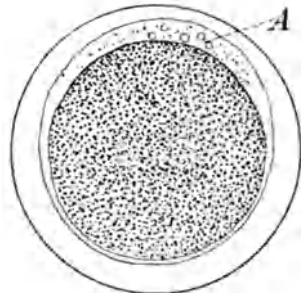


Fig. 26.

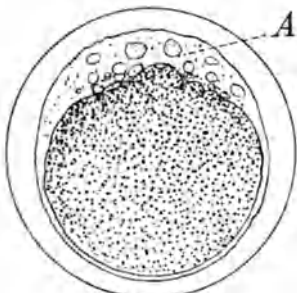


Fig. 27.

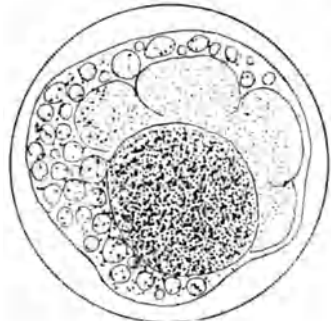


Fig. 28.

Fig. 25 bis 28. Zerfall des Seeigeleies nach der Membranbildung, wenn keine Nachbehandlung mit hypertonischer Lösung oder Oxydationshemmung erfolgt.

säure bei einer Temperatur zwischen 5° bis 10° C gehalten worden. Viele fürchteten sich und der Zerfall begann später. Eine Reihe verschiedener Eier mit beginnendem Zerfall wurden gezeichnet. Überall beginnt der Zerfall mit der Bildung der kleinen Tröpfchen, meist in der Furchungsebene. Das Ende ist stets ähnlich wie in Fig. 28. Was bedingt diesen Zerfall?

Um hierauf eine Antwort zu geben, müssen wir kurz auf

eine Tatsache eingehen, welche wir später eingehender besprechen, nämlich den Zusammenhang zwischen Membranbildung und Zytolyse. Viele Agenzien, welche die Membranbildung hervorrufen, bedingen auch die Zytolyse des Eies, z. B. Saponin, Seife, Benzol, aber auch höhere Fettsäuren, z. B. Kaprylsäure und Nonylsäure. Eine geringe Dosis oder eine kurz dauernde Einwirkung dieser Stoffe bewirkt nur Membran-

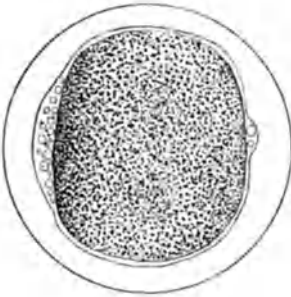


Fig. 29.

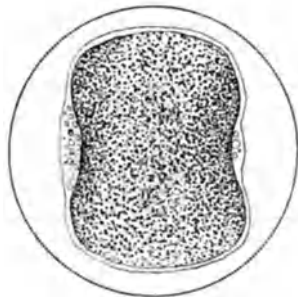


Fig. 30.

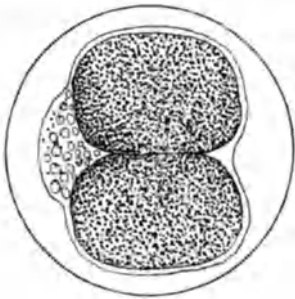


Fig. 31.

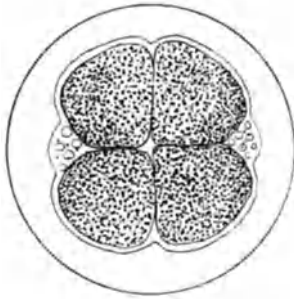


Fig. 32.



Fig. 33.

Fig. 29 bis 33. Zerfall des Eies bei niedriger Temperatur. (Siehe Text.)

bildung und damit die Entwicklungserregung des Eies; eine länger dauernde Einwirkung bewirkt erst Membranbildung und bald darauf Zytolyse. Die niederen Fettsäuren bewirken nur die Membranbildung. Es scheint demnach, daß der Prozeß, der der Membranbildung zugrunde liegt, mit demjenigen, der der Zytolyse zugrunde liegt, nahe verwandt ist. Auch wenn wir nur die Membranbildung im Ei anregen, z. B. mit Saponin

oder mit einer Fettsäure, so ist doch die Substanz im Ei, auf deren Änderung die Zytolyse beruht, etwas affiziert, und der Zerfall, den wir in den Figuren 26 bis 28 und in 29 bis 33 geschildert haben, ist vielleicht nur eine Zytolyse. Für die Annahme spricht der Vergleich des vorhin geschilderten Zerfalls mit der Wärmezytolyse oder Alkoholzytolyse. In allen Fällen beginnt der Zerfall mit dem Ausfließen einer Substanz aus dem Zytoplasma, d. h. einer Art zweiter Membranbildung, und dieses Ausfließen sehen wir auch in Fig. 26 und 27 bei A.) Diese verspätet entstehende Zytolyse des Eies macht seiner weiteren Entwicklung ein Ende.

Die künstliche Membranbildung genügt, um die Entwicklung des Seeigeleies anzuregen, sie läßt aber das Ei in einem pathologischen Zustand zurück; beginnt das Ei sich in diesem pathologischen Zustand zu entwickeln, so kommt früher oder später die Zytolyse zum Durchbruch, um so früher, je höher die Temperatur ist. Hemmen wir aber die Entwicklung, und geben wir dem Ei Zeit, sich vor der drohenden Zytolyse (oder was sonst die Natur dieses Zerfallsprozesses sein mag) zu „erholen“, ehe es seine Entwicklung beginnt, so erhalten wir eine normale Furchung und die Bildung schöner Larven; und auf diese Tatsachen wollen wir nunmehr eingehen.

Wir haben erwähnt, daß wir die Entwicklung des befruchteten Seeigeleies hemmen können, indem wir ihm den Sauerstoff entziehen oder indem wir die Oxydation durch gewisse Gifte, wie KCN oder Chloralhydrat, hemmen. Was Chloralhydrat anbetrifft, so ist es nur eine Vermutung, daß es die Oxydationen hemmt, wir wissen nur, daß es die Entwicklung hemmt. Wir wollen nun zunächst zeigen, daß, wenn wir dem Seeigelei nach der künstlichen Membranbildung den Sauerstoff entziehen, oder wenn wir es in Seewasser mit etwas KCN oder Chloralhydrat bringen, wir den vorhin beschriebenen, vermutlich zytolytischen, Zerfall hemmen.¹⁾ Bei den Eiern eines Seeigels wurde durch Buttersäurebehandlung die Membranbildung hervorgerufen. Dann wurden die Eier in drei Portionen geteilt. Eine blieb in Berührung mit Luft, eine zweite wurde in eine Flasche gebracht, durch welche ein Strom von reinem Sauer-

¹⁾ Loeb, Untersuchungen S. 483. — Biochem. Zeitschr. 1, 192. 1906.

stoff geschickt wurde, die dritte in eine Flasche, aus deren Seewasser praktisch alle Luft durch Wasserstoff ausgetrieben war, und in der der Wasserstoffstrom während des ganzen Versuchs durch das Gefäß ging. Die Eier, welche in den beiden ersten Gefäßen in Berührung mit Sauerstoff gewesen waren, hatten alle zu rechter Zeit Kernspindeln gebildet und fingen nach 4 bis 5 Stunden an zu zerfallen. Keines dieser Eier konnte nach 10 Stunden durch Behandlung mit hypertonischem Seewasser zur Entwicklung angeregt werden. Die Eier dagegen, welche in Wasserstoffstrom gewesen waren, hatten keine Spindel gebildet und waren bei der Herausnahme aus dem Wasserstoffstrom völlig intakt. Dieselben konnten durch Behandlung mit hypertonischem Seewasser noch zur Entwicklung angeregt werden. Auch nach 24stündigem Verweilen im Wasserstoffstrom waren die Eier der Form nach intakt. Genau solche Resultate wurden erzielt, wenn man dem Seewasser etwas KCN oder Chloralhydrat zusetzte, wodurch die Entwicklung gehemmt wurde. Durch die Hemmung der Entwicklung (infolge der Hemmung der Oxydation im Ei) bewahrt man die Eier nach der Membranbildung vor dem Zerfall, zu dem sie bei Zimmertemperatur verurteilt gewesen wären. Man muß also den Schluß ziehen, daß die Membranbildung zwar die Entwicklung anregt, daß sie aber das Ei in einem Zustand zurückläßt, in welchem die bei Zimmertemperatur erfolgende Entwicklung dasselbe rasch tötet.

Diese Auffassung wird nun unterstützt durch die Beobachtung, daß wenn man die Entwicklung der Eier nach der Membranbildung für eine Reihe von Stunden hemmt, dieselben hinterher imstande sind, sich auch bei Zimmertemperatur zu entwickeln, und zwar nicht nur zu Blastulen, sondern auch zu Pluteen.¹⁾ Ich wurde auf diese Tatsache zuerst aufmerksam, als ich Eier nach der Membranbildung (mittels Buttersäure) in Seewasser brachte, aus dem die Luft durch einen Wasserstoffstrom verdrängt war. Nach verschiedenen Intervallen wurden Eier aus dem sauerstoffarmen Seewasser in normales Seewasser zurückgebracht. Es zeigte sich, daß Eier, welche bei 15° C weniger als 3 Stunden in dem sauerstoffarmen

¹⁾ Loeb, loc. cit.

Seewasser gewesen waren, nach dem Zurückbringen in normales Seewasser alle zerfielen; daß aber von den Eiern, welche 3 Stunden oder etwas länger in dem sauerstoffarmen Seewasser gewesen waren, sich hinterher, nachdem sie in normales Seewasser übertragen waren, eine Reihe (etwa 10%) zu völlig normalen Pluteen entwickelten. Versuche mit Zyankalium ergaben dasselbe Resultat. Unbefruchtete Eier, bei denen eine Buttersäuremembran gebildet war, wurden nach der Membranbildung in 50 ccm Seewasser + 1 ccm einer 1proz. KCN-Lösung gebracht. Die Konzentration war also vierzigmal so groß als zur Unterdrückung der Furchung des befruchteten Eies und zur Hemmung des Zerfallprozesses nötig ist. Nach 15, 30, 45, 65 und 85 Minuten wurde je eine Portion der Eier in normales Seewasser übertragen. Von den nach 45 und 65 Minuten in normales Seewasser gebrachten Eiern entwickelte sich eine kleine Zahl, nämlich etwa 5%. In diesem Falle aber trat die Entwicklung erst etwa 14 Stunden, nachdem die Eier aus dem zyankaliumhaltigen Seewasser gebracht waren, ein. Ich vermute, daß es eine Reihe von Stunden erforderte, bis alle Blausäure aus dem Ei verschwunden war. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, daß nur solche Eier sich entwickelten, welche nach der Behandlung von Zyankalium in flache Uhrschildchen gebracht wurden, in denen sie nur mit einer dünnen Wasserschicht bedeckt waren, in denen also die Verdunstung der HCN rasch vor sich gehen konnte. Es begünstigte auch die Entwicklung der Eier, wenn man eine Minute lang einen Sauerstoffstrom durch die Uhrschildchen schickte. Aber auch mit geringeren Quantitäten KCN konnte man solche Wirkungen erzielen. So wurden in einem Versuche die Eier nach der künstlichen Membranbildung in 50 ccm Seewasser gebracht, dem man 1, 2, 4 und 8 ccm $\frac{1}{10}$ % KCN zugefügt hatte. Die Eier blieben in diesen Lösungen 1 bis 23 Stunden lang. Unter den Eiern, welche nach 3 bis 7 Stunden aus den Lösungen mit 2 und 4 ccm $\frac{1}{10}$ % KCN in normales Seewasser übertragen wurden, entwickelten sich einige zu Larven.

Es war mir bei diesen Versuchen aufgefallen, daß die Entwicklung der Eier auffallend normal war, und so nahm ich neuerdings diese Versuche wieder auf, die ich nur wegen meiner abnormen Empfindlichkeit gegen Blausäuredämpfe unterbrochen

hatte. Um mich davon zu überzeugen, daß die Membranbildung der wirklich entwicklungsregende Eingriff ist, war es nötig zu zeigen, daß man durch diesen Eingriff allein alle Seeigeleier zur Entwicklung bringen kann.

Bei meinen früheren Versuchen waren die Eier sehr bald nach der Membranbildung in das zyankaliumhaltige Seewasser gebracht worden. Dieser Umstand ist nun zum großen Teil dafür verantwortlich gewesen, daß die Zahl der Eier, welche sich damals zu Larven entwickelten, so klein blieb. Ich habe nämlich neuerdings gefunden, daß, wenn man die Eier etwas später in das zyankaliumhaltige Seewasser bringt, man einen sehr großen Prozentsatz von Larven erhält, und daß in manchen Versuchen sich alle Eier zu Larven entwickeln, nachdem sie wieder in Seewasser übertragen werden. In diesen Versuchen wurde eine sehr schwache Lösung von KCN benutzt, nämlich eine Mischung von 50 ccm Seewasser + 1 oder 2 ccm $\frac{1}{20}$ ‰ KCN.

Mittels Buttersäure wurde bei den Eiern eines Seeigels (*Strongylocentrotus purpuratus*) die Membranbildung hervorgerufen. Ein Teil der Eier kam sofort (d. h. zwei Minuten) nach der Membranbildung in 50 ccm Seewasser + 2 ccm $\frac{1}{20}$ ‰ KCN. Nach 3, 4 und 5 Stunden wurden die Eier (nachdem sie durch dreimaliges Waschen in Seewasser von KCN befreit waren) in normales Seewasser übertragen. Die Temperatur betrug $11\frac{1}{2}^{\circ}$ C. Kein einziges dieser Eier entwickelte sich zur Larve.

Eine zweite Portion der Eier wurde 20 Minuten nach der Membranbildung in das zyankaliumhaltige Seewasser gebracht. Nach 3 Stunden wurde ein Teil dieser Eier in normales Seewasser übertragen und etwa 5 ‰ dieser Eier entwickelten sich zu Larven. Von den nach 4 und 5 Stunden aus dem zyankaliumhaltigen Seewasser genommenen Eiern entwickelten sich 10 ‰ resp. 20 ‰ zu Larven.

Eine dritte Portion Eier wurde 43 Minuten nach der Membranbildung in das zyankaliumhaltige Seewasser übertragen. Von den Eiern, welche nach 3 Stunden wieder in normales Seewasser übertragen wurden, entwickelten sich praktisch alle zu Larven! Die Eier, welche länger in dem zyankaliumhaltigen Seewasser blieben, litten und entwickelten sich nicht so schön.

Eier, welche 57 Minuten nach der Membranbildung in das zyankaliumhaltige Seewasser übertragen wurden, verhielten sich ähnlich. Eier, welche 82 Minuten nach der Membranbildung in das zyankaliumhaltige Seewasser übertragen wurden, gaben weniger Larven.

Diese Versuche wurden oft mit demselben Erfolg wiederholt. Meine früheren Versuche hatten nur deshalb eine geringere Ausbeute an Larven ergeben, weil ich die Eier zu bald nach der Membranbildung in die Zyankaliumlösung brachte.

In allen diesen neueren Versuchen wurden die Eier nach der Herausnahme aus dem zyankaliumhaltigen Seewasser erst zweimal oder dreimal im Seewasser gewaschen.

Auffallend war in allen Versuchen die völlige Regelmäßigkeit der Furchung; die Furchung ist fast ebenso schön wie bei den mit Samen befruchteten Eiern. Das ist eine wertvolle Tatsache im Hinblick auf die Versuche, in welchen die zytolytische Nebenwirkung der Membranbildung durch hypertonisches Seewasser gehemmt wird (siehe nächstes Kapitel). Hierbei ist oft die erste Furchung etwas unregelmäßig. Die Versuche mit Zyankalium zeigen, daß diese Unregelmäßigkeit wesentlich eine Nebenwirkung der hypertonischen Salzlösung ist, und daß die Membranbildung allein eine normale Furchung hervorruft.

Zweitens ist zu bemerken, daß die Larven bei diesen Versuchen wie bei der normalen Entwicklung an die Oberfläche des Seewassers stiegen und sich zum großen Teil zu normalen Pluteen entwickelten. Die Zahl der Eier, welche sich zu normalen Pluteen entwickelten, war um so größer, je kürzere Zeit die Eier in der Zyankaliumlösung verweilt hatten. Die Ursache hierfür ist klar. Die Membranbildung setzt die chemischen Reaktionen in den Gang, welche die Entwicklung bestimmen, (oder beschleunigt dieselben). Unterdrücken wir die Oxydationen in einem solchen Ei, so muß es zu einer Anhäufung von Spaltungsprodukten im Ei kommen, welche durch die Oxydationen beseitigt werden sollten. Ich nehme an, daß diese Anhäufung von Spaltungsprodukten zur Schädigung des Eies führt, was sich darin zeigt, daß die Eier um so mehr an Lebensfähigkeit einbüßen, je länger sie in der zyankaliumhaltigen Lösung bleiben. Wir haben dieselbe Erfahrung bei den mit Samen befruchteten Eiern der Seeigel gemacht, die

auch um so mehr an Lebensfähigkeit verloren und in einem um so früheren Larvenstadium starben, je länger sie dem Sauerstoffmangel (oder dem KCN) ausgesetzt blieben. Eier, die nur 2 bis 3 Stunden nach der künstlichen Membranbildung in dem zyankaliumhaltigen Seewasser verweilten, entwickelten sich in relativ größerer Zahl zu Pluteen, als die Eier, welche länger in dieser Lösung blieben.

Die optimale Expositionsdauer der Eier in der zyankaliumhaltigen Lösung hängt auch von der Konzentration des KCN in derselben ab. In einer Mischung von 50 ccm Seewasser + 2 ccm $\frac{1}{20}\%$ KCN scheinen 3 Stunden etwa die optimale Expositionsdauer zu repräsentieren. Bleiben die Eier nur 2 Stunden in der Zyankaliumlösung, so erhält man gelegentlich, aber nicht immer, Larven. So wurden in einem Versuche die Eier 2 Stunden nach der künstlichen Membranbildung in 50 ccm Seewasser + 2 ccm $\frac{1}{20}\%$ KCN gebracht. Von den Eiern, welche nach 2 Stunden herausgenommen, zweimal in Seewasser gewaschen und dann in normales Seewasser übertragen wurden, entwickelten sich 50% zu guten Larven; von den nach 3 Stunden herausgenommenen entwickelten sich 90% zu Larven; aber die Lebensdauer der ersteren war größer als die der letzteren.

Die hier beschriebene Methode der Entwicklungserregung mittels Sauerstoffmangel und KCN hat aber den praktischen Nachteil, daß sie technisch sehr beschwerlich und im Falle von KCN auf die Dauer unangenehm ist, und zweitens, daß die Zeit, welche zwischen der künstlichen Membranbildung und dem Übertragen in die zyankaliumhaltige Lösung verfließen muß, offenbar nicht stets die gleiche ist. Ich habe stets gefunden, daß, wenn man die Eier unmittelbar nach der Membranbildung in die zyankaliumhaltige Lösung überträgt, keine oder nur wenig Eier sich entwickeln; aber ich vermag nicht zu sagen, wie lange man nach der Membranbildung warten muß, ehe man die Eier in die Zyankaliumlösung bringt. Manchmal genügten 45 Minuten, in anderen Fällen waren 120 Minuten erforderlich. Ich vermute, daß die Eier eine bestimmte chemische Phase der Entwicklung erreicht haben müssen, ehe der Zeitpunkt für Entwicklungshemmung durch Sauerstoffmangel oder KCN oder Chloralhydrat gekommen.

Der Eintritt dieser Phase hängt wieder von einer Reihe von Variablen ab.

Was aber ist der Zusammenhang zwischen der Entwicklungshemmung des Eies und seiner „Erholung“ von den Nebenwirkungen der Membranbildung? Wie „erholt“ sich das Ei während der 2 oder 3 Stunden, während welcher die Entwicklung verhindert ist? Wir haben darauf hingewiesen, daß bei Sauerstoffmangel dennoch chemische Prozesse im Ei weiter gehen, vermutlich Hydrolysen. Stellen wir uns nun vor, daß die Zytolyse (oder was sonst die Natur des Zerfallprozesses sein mag), die nach der künstlichen Membranbildung im Ei einzutreten beginnt, durch besondere (zytolytische?) Stoffe in demselben bedingt ist, so können wir weiter annehmen, daß das Ei sich dieser Stoffe durch die Hydrolysen entledigt. Sind diese Stoffe zerstört, so kann nunmehr das Ei ungestraft sich entwickeln.

Ganz besonders wichtig ist es nun, daß bei dieser Methode der künstlichen Parthenogenese die Furchung des Eies völlig normal verläuft. Keine andere Methode der künstlichen Parthenogenese gibt eine so schöne Furchung wie die Entwicklungserregung mittelst künstlicher Membranbildung, wenn man die Entwicklung hinterher einige Zeit durch Sauerstoffmangel oder Zyankalium hemmt. Auch diese Tatsache ist eine Stütze unserer Ansicht, daß der Membranbildungsprozeß der eigentlich entwicklungserregende Vorgang ist. Daß dieser Prozeß das Ei schädigt und eine Tendenz zum Zerfall oder zur Zytolyse zurückläßt (von der das Ei sich erst erholen muß, wenn es sich zur Larve entwickeln soll), beruht lediglich auf einer Nebenwirkung derjenigen Stoffe und Agenzien, welche die Membranbildung bedingen. Membranbildung und Zytolyse sind, wie wir später sehen werden, nahe verwandte Prozesse, und man kann, wie es scheint, keine Membranbildung herbeiführen, ohne wenigstens eine Tendenz zur Zytolyse im Ei zu erwecken.

Das regt die Frage an, wie das Spermatozoon die Membranbildung ohne nachfolgende Zytolyse herbeiführen kann. Wir werden später sehen, daß das Spermatozoon neben der Substanz, welche die Membranbildung bedingt, noch eine zweite Substanz ins Ei trägt, welche die zytolytischen Nebenwirkungen des Membranbildungsprozesses beseitigt.

Wir werden im nächsten Kapitel eine raschere Methode als die der Entwicklungshemmung durch Sauerstoffmangel kennen lernen, durch welche wir die zytolytische Nebenwirkung des Membranbildungsprozesses im Ei beseitigen können; nämlich die Behandlung des Eies mit der hypertonen Lösung.

X. Die Wirkung der hypertonen Lösung nach der Membranbildung.

1. Wir besitzen eine viel bequemere Methode, die Eier des Seeigels nach der Membranbildung vor dem Zerfall zu retten, als die im vorigen Kapitel mitgeteilte; und diese Methode erlaubt es uns in jedem Falle, alle Eier, welche eine Membran besitzen, zur Entwicklung zu bringen. Sie besteht, wie schon erwähnt, darin, daß wir die Eier nach der Membranbildung eine kurze Zeit in hypertones Seewasser bringen. Übertragen wir dieselben dann zur rechten Zeit aus der hypertonen Lösung in normales Seewasser, so furchen sich alle Eier und alle entwickeln sich zu Larven; und bei einem Teil dieser Larven ist diese Entwicklung völlig normal.

Warum geben nicht alle so behandelten Eier normale Larven? Um das zu verstehen, müssen zwei Tatsachen berücksichtigt werden. Läßt man die Eier zu kurze Zeit in der hypertonen Lösung, so wird die drohende Zytolyse oder der drohende Zerfall nicht gehemmt und die Eier gehen genau so zugrunde, als ob keine hypertone Lösung angewendet worden wäre. Läßt man die Eier zu lange in der hypertonen Lösung, so entwickeln sich zwar alle zu Larven, die Larven sind aber nicht normal und sterben zu früh; um so früher, je mehr man den richtigen Zeitpunkt für die Übertragung der Eier in normales Seewasser überschritten hatte.

Nun ist aber die richtige Expositionsdauer in der hypertonen Lösung nicht für alle Eier die gleiche. Selbst wenn man die Eier desselben Weibchens wählt; wenn man dieselben ferner gleichzeitig dem Membranbildungsprozesse unterwirft und sie gleichzeitig in dieselbe hypertone Lösung bringt,

so findet man, daß die richtige Expositionsdauer für die verschiedenen Eier in ziemlich weiten Grenzen schwankt. Man findet das in der Weise, indem man die Eier in Intervallen von je 5 Minuten aus der hypertonen Lösung in normales Seewasser zurückbringt. Von den zuerst in normales Seewasser zurückgebrachten Eiern entwickelt sich vielleicht kein einziges, dann findet man eine Portion, in der sich wenige Eier entwickeln; in der nächsten entwickeln sich mehr, bis man eine Portion erreicht, in der sich alle zu Larven entwickeln; aber nicht alle bilden normale Larven. Ein Teil der Eier war nämlich zu lange in der hypertonen Lösung geblieben und diese Überexposition schädigte die betreffenden Eier. Das wird dadurch bewiesen, daß in den später herausgenommenen Eiern die Zahl der geschädigten Larven stets zunimmt. Was diese individuelle Variation bestimmt, können wir nicht sagen. Zum Teil hängt es wohl mit Ungleichheiten in der Geschwindigkeit der Diffusion von Sauerstoff und Alkali in die Eier zusammen. Wichtig ist nur, daß schon, wie die Versuche zeigen, eine kurze Überexposition in der hypertonen Lösung die Eier schädigen kann. Wie lange müssen die Eier in der hypertonen Lösung bleiben?

Das hängt zunächst davon ab, wie bald nach der Membranbildung man dieselben in die hypertone Lösung bringt. Herr Moore hat über diesen Gegenstand im hiesigen Institute einige Versuche angestellt. Er bestimmte die Zeit, welche nötig ist, um alle Eier zur Entwicklung zu Larven zu veranlassen. Wenn die Eier sofort, d. h. etwa 2 bis 4 Minuten nach der künstlichen Membranbildung in das hypertone Seewasser (50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl) gebracht wurden, so mußten dieselben etwa 60 bis 70 Minuten in der hypertonen Lösung bleiben, ehe alle Eier zur Entwicklung gebracht werden konnten. Brachte man die Eier 30 Minuten nach der Membranbildung in die hypertone Lösung, so mußten sie 40 bis 50 Minuten in derselben bleiben, um das optimale Resultat zu erzielen. Wurden sie erst 1 oder 2 Stunden nach der künstlichen Membranbildung in die hypertone Lösung gebracht, so war es nur nötig, sie 30 bis 40 Minuten in derselben zu lassen, um alle Eier zur Entwicklung zu Larven zu veranlassen. Wartete man noch

länger, ehe man die Eier nach der Membranbildung in das hypertonische Seewasser brachte, so wurde das Resultat wieder schlechter. Bei diesen Versuchen war die Temperatur ungefähr 12° C. Diese Resultate stimmen mit den Versuchen des vorigen Kapitels, wonach der beste Zeitpunkt für die Hemmung der drohenden Zytolyse dann gekommen ist, wenn das Ei nach der künstlichen Membranbildung in ein bestimmtes Stadium der Entwicklung oder der chemischen Änderung getreten ist.

Um dem Leser ein vollständigeres Bild des Gesagten zu geben, will ich einen derartigen Versuch, den ich selbst angestellt habe, etwas ausführlicher mitteilen. Bei den Eiern eines Weibchens wurde die Membranbildung durch 2 Minuten lange Behandlung mit 50 ccm Seewasser + 2,9 ccm $\frac{n}{10}$ Butter-säure (die gründlich gemischt waren) hervorgerufen. Eine Portion A wurde sofort, eine zweite B 30 Minuten später, eine dritte Portion C nach 2 Stunden in hypertonisches Seewasser (50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}n$ NaCl) gebracht. Nach Intervallen von 5 Minuten wurde je eine Portion der Eier in normales Seewasser zurückgebracht und die Zahl der sich furchenden Eier, und am nächsten Tage die Zahl der gebildeten Larven ermittelt. Die folgende Tabelle gibt das Resultat. Die drei Partien der Eier sind mit A, B und C bezeichnet. Die oberste horizontale Reihe gibt an, wie lange (in Minuten) die Eier in der hypertonischen Lösung verweilten, und darunter ist angegeben, wie viele Prozent der Eier der betreffenden Partie sich zu Larven entwickelten.

	5'	10'	15'	20'	25'	30'	35'	40'	45'	50'
A	0	0	0	0	0	1%	30%	90%	99%	100%
B	0	0	$\frac{1}{2}\%$	40%	70%	90%	98%			
C	0	$\frac{1}{4}\%$	10%	30%	70%	90%	100%			

Die Temperatur der hypertonischen Lösung betrug 15° C. In allen im folgenden erwähnten Versuchen wurden die Eier sehr bald, d. h. etwa 10 Minuten nach der Membranbildung, in hypertonisches Seewasser übertragen; daher ist die Expositionsdauer etwa wie in Reihe A.

2. Wir wollen nunmehr untersuchen, wie die Zeit, während

welcher die Eier in der hypertonen Lösung bleiben müssen mit dem osmotischen Druck der letzteren variiert.¹⁾

Die unbefruchteten Eier eines Seeigels wurden mit buttersäurehaltigem Seewasser behandelt, und bei allen trat die Membranbildung ein. Zu je 50 ccm Seewasser wurden 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12 und 14 ccm $2\frac{1}{2}$ m (grammolekulares) NaCl zugefügt und die Eier in diese Lösungen verteilt. Aus diesen Lösungen wurde nach 33, 45, 57, 68, 98 und 128 Minuten je eine Portion der Eier in normales Seewasser übertragen und der Prozentsatz derselben, welcher sich zu Larven entwickelte, für jede Portion festgestellt. Die folgende Tabelle gibt das Resultat. 0 bedeutet, daß kein Ei sich entwickelte, 30%, daß 30% aller Eier Larven bildeten. Die Temperatur der hypertonen Lösung war 16° C.

Natur der Lösung.	Prozentsatz der Eier, welche sich zu Larven entwickelten, nach einem Aufenthalt in der Lösung von					
	33	45	57	68	98	128 Min.
50 ccm Seewasser	0	0	0	0	0	0
50 „ „ + 4ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl	0	0	0	0	0	1 Larve
50 „ „ + 5ccm $2\frac{1}{3}$ m „	0	0	0	1%	30%	60%
50 „ „ + 6ccm $2\frac{1}{2}$ m „	0	0	2%	50%	100%	10%
50 „ „ + 7ccm $2\frac{1}{2}$ m „	0	1%	30%	70%	70%	0
50 „ „ + 8ccm $2\frac{1}{2}$ m „	0	1%	50%	80%	wenige	0
50 „ „ + 10ccm $2\frac{1}{2}$ m „	0	0	10%	10%	1%	0
50 „ „ + 12ccm $2\frac{1}{2}$ m „	0	0	1 Larve	0	0	0
50 „ „ + 14ccm $2\frac{1}{2}$ m „	0	0	0	0	0	0

Zwei Tatsachen sind hier zu beachten: erstens, daß die Wirksamkeit der hypertonen Lösung enge Grenzen hat. Der Zusatz von 4 ccm ist praktisch zu gering, der Zusatz von 12 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl ist zu viel. Im letzteren Falle gehen die Eier durch Zerfall in Tropfen zugrunde. Zweitens ist zu beachten, daß, wenn einmal die optimale Konzentration erreicht ist, d. h. die Konzentration, welche den größten Prozentsatz von Larven hervorbringt (nämlich bei 7 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl), eine

¹⁾ Loeb, Über den Unterschied zwischen isosmotischen und isotonischen Lösungen bei der künstlichen Parthenogenese. Biochem. Zeitschr. 11, 144, 1908.

weitere Konzentrationserhöhung die Zeit, während welcher das Ei in der hypertonischen Lösung bleiben muß, nicht abkürzt. Das harmoniert mit der früher ausgesprochenen Vermutung, daß der Aufenthalt des Eies in der hypertonischen Lösung nur deshalb nötig ist, weil in dieser Lösung bestimmte Stoffe im Ei gebildet werden, welche die Entwicklung des Eies in normale Bahnen lenken und es vor dem Verfall retten, zu dem die künstliche Membranbildung es sonst führt. Um diese Stoffe in genügender Menge zu bilden, ist eine gewisse Zeit erforderlich.

Dieser Versuch ist sehr oft mit im wesentlichen gleichem Resultat wiederholt worden. Der Zusatz von nur 3 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl zu 50 ccm Seewasser hat nie zur Entwicklung einer Larve nach der Membranbildung geführt, wie lange man auch die Eier in der Lösung ließ.

Ein Beispiel eines derartigen länger dauernden Versuches soll erwähnt werden. Die unbefruchteten Eier eines Weibchens wurden nach der künstlichen Membranbildung in 50 ccm Seewasser + 0, 1, 2, 3, 4 usw. ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl gebracht. Nach 37, 47, 57, 110, 150, 200, 280 und 340 Minuten wurde je eine Portion der Eier in normales Seewasser zurückgebracht. Temperatur $16\frac{1}{2}^{\circ}$ C bis $17\frac{1}{2}^{\circ}$ C. (Beispiel siehe nächste Seite.)

Der Versuch bestätigt wieder, daß der Zusatz von weniger als 4 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl zu 50 ccm Seewasser auch bei einer lange fortgesetzten Einwirkung nicht ausreicht, die Eier vor dem Zerfall zu schützen und die Entwicklung hervorzurufen. Es ist ferner deutlich, daß, wenn einmal das Optimum erreicht ist, die Expositionsdauer durch eine weitere Erhöhung der Konzentration des Seewassers nicht verringert werden kann. Bei dem Zusatz von 8 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl ist die minimale Expositionsdauer 47 Minuten, und dasselbe ist der Fall für den Zusatz von 12 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl.¹⁾

Vielleicht erklärt die folgende Tatsache, warum es nicht gelingt, mit dem Zusatz von weniger als 4 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl zu 50 ccm Seewasser die Eier nach der künstlichen Membranbildung

¹⁾ In diesen Versuchen waren die Eier sehr bald nach der Membranbildung in die hypertonische Lösung gebracht worden, sonst wären die Zeiten kürzer gewesen.

Natur der Lösung.

50 ccm	Seewasser	2 ccm	$2\frac{1}{2}$ m	NaCl
50 ccm	„	3 ccm	$2\frac{1}{2}$ m	„
50 ccm	„	4 ccm	$2\frac{1}{2}$ m	„
50 ccm	„	5 ccm	$2\frac{1}{2}$ m	„
50 ccm	„	6 ccm	$2\frac{1}{2}$ m	„
50 ccm	„	8 ccm	$2\frac{1}{2}$ m	„
50 ccm	„	10 ccm	$2\frac{1}{2}$ m	„
50 ccm	„	12 ccm	$2\frac{1}{2}$ m	„
50 ccm	„	14 ccm	$2\frac{1}{2}$ m	„

Prozentsatz der Eier, welche sich zu Larven entwickelten, nach einem Aufenthalt der Eier in der Lösung von

	37	47	57	110	150	200	280	340 Min.
	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1%	5%	8%	—	30%
	0	0	30%	50%	80%	90%	90%	40%
	—	—	80%	95%	—	—	—	—
	0	10%	100%	—	—	—	—	—
2 Larven,	0	8%	30%	—	—	—	—	—
	0	1%	2%	0	0	0	0	0
	0	0	0	Ein paar	0	0	0	0
				Larven.				

vor dem Zerfall zu retten. Bringt man mit Samen befruchtete Eier in je 50 ccm Seewasser, dem zunehmende Mengen von $2\frac{1}{2}$ m NaCl zugesetzt sind, so bemerkt man, daß der Zusatz von 1 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl zu 50 ccm Seewasser keinen Einfluß auf die Entwicklung hat, daß der Zusatz von 2 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl zu 50 ccm Seewasser die erste Furchung kaum merkbar verzögert, daß der Zusatz von 3 ccm die Furchung um etwa 12% der gewöhnlichen Dauer verzögert, daß aber in einer solchen Lösung die Entwicklung aller Eier in fast normaler Weise stattfindet. Erst der Zusatz von 4 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl zu 50 ccm Seewasser verzögert die erste Furchung um eine Reihe von Stunden (über 100% der normalen Dauer); in dieser Lösung können sich die Eier zwar noch langsam entwickeln, aber die Entwicklung tritt nicht mehr bei allen ein. Es stellt sich also auch hier heraus,

daß der Zusatz von 4 ccm NaCl eine kritische Bedeutung hat. In 50 ccm Seewasser + 5 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl entwickelten sich die Eier nicht mehr über das 32- bis 64-Zellstadium hinaus. Es müssen also wohl in einer Lösung von 50 ccm Seewasser + 4 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl erhebliche Änderungen in den chemischen Reaktionen im Ei eintreten. Diese Änderungen führen zur Bildung derjenigen Stoffe, welche dem Ei nach der künstlichen Membranbildung gestatten, sich nach der Übertragung in normales Seewasser normal zu entwickeln. Bleiben die Eier zu lange in der hypertonischen Lösung, so bilden sich die betreffenden Stoffe in zu großen Mengen, oder das Ei leidet aus anderen Gründen und geht nach der Übertragung in normales Seewasser zugrunde.

In all diesen Versuchen waren die Eier etwa 10 Minuten nach der Membranbildung in die hypertonische Lösung gebracht worden.

3. Die dritte Variable, welche die Dauer der Einwirkung der hypertonischen Lösung bestimmt, ist die Temperatur. In meinen ersten Arbeiten über künstliche Parthenogenese war ich zweifelhaft, ob die hypertonische Lösung rein physikalisch, oder rein chemisch wirkt. Ich hatte bereits 1892 gefunden, daß dieselbe die Zelldurchschnürung rascher als die Kernteilung hemmt. Da ein geringerer Grad der Hypertonie ausreicht, um die Zelldurchschnürung als um die Kernteilung zu hemmen, so erhält man bei einem gewissen minimalen Grad der Hypertonie der Lösung Kernteilung ohne Zellteilung, wie ich schon damals mitteilte. Es ist nun durchaus möglich (aber nicht bewiesen), daß diese Hemmung der Zelldurchschnürung auf einer Erhöhung der Viskosität des Protoplasmas infolge des Wasserverlustes desselben in der hypertonischen Lösung beruht. Dagegen war es nicht sehr wahrscheinlich, daß die Entwicklungserregung des Eies durch eine hypertonische Lösung auf eine physikalische Wirkung zurückzuführen sei.

Die Bestimmung des Temperaturkoeffizienten gibt uns nun die Mittel an die Hand, um zu entscheiden, ob in einem gegebenen Falle ein physiologischer Prozeß auf einer chemischen Reaktion oder einem rein physikalischen Vorgang beruht. Wie van't Hoff und Arrhenius gezeigt haben, ist der Temperaturkoeffizient für chemische Reaktionen relativ hoch, nämlich \geq

2 für je 10° C, während physikalische Vorgänge im allgemeinen einen niedrigeren Temperaturkoeffizienten haben. Wir können auf diese Weise eine Entscheidung darüber herbeiführen, ob die Wirkung der hypertonischen Lösung auf die Eier nach der künstlichen Membranbildung auf Beeinflussung einer chemischen Reaktion im Ei oder eines physikalischen Prozesses beruht.¹⁾

Zu dem Zweck wurden folgende Versuche angestellt. Bei Eiern von *Strongylocentrotus purpuratus* wurde die Bildung der Membran durch Buttersäure hervorgerufen. Die Eier wurden dann in je zwei Schalen mit derselben hypertonischen Lösung (50 ccm Seewasser + 8 ccm 2¹/₂ n NaCl) verteilt, von denen die eine bei der Temperatur t⁰, die andere bei einer 10° höheren Temperatur gehalten wurde. In verschiedenen Intervallen wurden Portionen der Eier in normales Seewasser von Zimmertemperatur gebracht, und es wurde die minimale Expositionsdauer ermittelt, die nötig ist, um einem gewissen Prozentsatz von Eiern die Entwicklung zu erlauben. Die Resultate an den Eiern von fünf verschiedenen Seeigeln sind in der folgenden Tabelle enthalten. Ein merkwürdiges Resultat war, daß bei Temperaturen über 20° C die Eier durch die hypertonische Lösung geschädigt wurden. Das gilt natürlich nicht für die Eier aller Seeigel, da meine Versuche in Woods Hole oft bei einer Temperatur von über 20° C angestellt worden waren. Es dürfte wohl damit zusammenhängen, daß *Strongylocentrotus purpuratus* in einer relativ niedrigeren Temperatur lebt.

1) In meinen ersten Arbeiten über Salzwirkungen störte es mich, daß ich kein Kriterium besaß, um zu entscheiden, ob ich es mit rein physikalischen Wirkungen, z. B. Gerinnungen, oder mit chemischen Wirkungen zu tun habe. Cohens treffliche „Vorlesungen über physikalische Chemie für Ärzte“ wiesen auf die Bedeutung der Temperaturkoeffizienten zur Entscheidung dieser Frage hin. Ich selbst wandte dieses Kriterium auf entwicklungsphysiologischem Gebiet an und veranlaßte meine Schüler C. D. Snyder und S. S. Maxwell dasselbe auf die Entscheidung der Frage anzuwenden, ob der Herzschlag und die Nervenleitung auf chemischen oder physikalischen Prozessen beruhe. Der gefundene Temperaturkoeffizient beider Vorgänge war von der Größenordnung der chemischen Prozesse.

Temperatur.	Minimale Expositionsdauer zur Erzeugung zahlreicher Larven.	Temperaturkoeffizient Q_{10} für 10°C .
Versuch 1	$\left\{ \begin{array}{l} 14^{\circ} \text{ ungefähr 50 Minuten} \\ 24^{\circ} \text{ alle Eier sterben} \end{array} \right.$?
Versuch 2	$\left\{ \begin{array}{l} 16^{\circ} \text{ ungefähr 35 Minuten} \\ 26^{\circ} \text{ alle Eier sterben} \end{array} \right.$?
Versuch 3	$\left\{ \begin{array}{l} 4^{\circ}-5^{\circ} \text{ 210 Minuten} \\ 15^{\circ} \text{ 40 Minuten} \end{array} \right.$	$Q_{10}=5$
Versuch 4	$\left\{ \begin{array}{l} 5^{\circ} \text{ 160 Minuten} \\ 15^{\circ} \text{ ungef. 55 Minuten} \end{array} \right.$	$Q_{10}=3$
Versuch 5	$\left\{ \begin{array}{l} 10^{\circ} \text{ ungef. 112 Minuten} \\ 20^{\circ} \text{ ungef. 32 Minuten} \end{array} \right.$	$Q_{10}=3$

Es ist zweifellos, daß der Temperaturkoeffizient Q_{10} höher ist als 2, nämlich 3, und daß er bei Temperaturen, die nahe 0° sind, rasch wächst und den Wert 5 und vielleicht noch höhere Werte erreicht.¹⁾

Es weist also auch die Größenordnung des Temperaturkoeffizienten darauf hin, daß es sich hier um eine chemische Wirkung der hypertonischen Lösung handelt.

4. Wir sind aber auch in der Lage, die Natur der chemischen Vorgänge, auf welche es bei der Wirksamkeit der hypertonischen Lösung ankommt, näher zu bestimmen. Es handelt sich, wie zu erwarten, um Oxydationsprozesse. Das können wir dadurch beweisen, daß die Wirksamkeit der hypertonischen Lösung durch Hemmung der Oxydationen im Ei mittelst Zyankalium oder durch Entziehung des Sauerstoffs gänzlich aufgehoben wird.²⁾

Es läßt sich nämlich zeigen, daß bei Eiern nach der künstlichen Membranbildung die Behandlung mit hypertonischem Seewasser wirkungslos bleibt, wenn dasselbe nicht genug Sauerstoff enthält, oder wenn die Oxydationen im Ei durch KCN verhindert werden. Die Eier benehmen sich nach der Herausnahme aus solchen Lösungen, als ob nur die Membranbildung hervorgerufen wäre, d. h. sie fangen an sich zu entwickeln,

¹⁾ Loeb, Untersuchungen S. 494. — University of Californ. Public. 3, 39, 1906.

²⁾ Loeb, Biochem. Zeitschr. 1, 194, 1906.

aber sie zerfallen alsbald in der im vorigen Kapitel geschilderten Weise. Das soll nun durch einige Beispiele erläutert werden.

Die Eier eines Weibchens wurden $1\frac{1}{2}$ bis 2 Minuten in 50 ccm Seewasser + 3 ccm $\frac{n}{10}$ Buttersäure gebracht und nach der Übertragung in Seewasser bildeten alle, wie gewöhnlich, eine vollkommene Befruchtungsmembran. Dann wurden sie in folgende Lösungen verteilt:

1. 50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}n$ NaCl
2. 50 „ „ + 8 „ $2\frac{1}{2}n$ „ + 2 ccm $\frac{1}{20}\%$ KCN.

Nach 30, 40, 50, 135, 195, 285, 335, 385, 450 und 1320 Minuten wurde je eine Probe der Eier in normales Seewasser übertragen. Die Temperatur war 18° C. Das Resultat war für die Eier, die in Lösung 1 gewesen waren, folgendes. 30 Minuten in der hypertonischen Lösung genügten nicht, und die Eier zerfielen alle bis auf zwei, die sich entwickelten. 40 und 50 Minuten genügten, und etwa 50% der Eier entwickelten sich zu Larven. Die Eier, welche 135 Minuten und länger in der hypertonischen Lösung gewesen waren, gingen zugrunde. Von den Eiern dagegen, welche in der zyankaliumhaltigen hypertonischen Lösung gewesen waren, (in der die Oxydationen unterdrückt waren), entwickelten sich keine, die weniger als 385 Minuten der Lösung ausgesetzt gewesen waren. Alle diese Eier gingen im Laufe der nächsten 24 Stunden zugrunde, und zwar unter den Erscheinungen, wie sie bei Eiern nach der Membranbildung eintreten, falls dieselben in normalem Seewasser bleiben und nicht in hypertonische Lösungen gebracht werden. Die Wirksamkeit der hypertonischen Lösung war also durch den Zusatz von Zyankalium unterdrückt worden. Von den Eiern, welche länger als 385 Minuten in der hypertonischen Lösung waren, entwickelten sich ein paar — je zwei bis vier in einem URSchälchen mit vielen Tausenden von Eiern — zu Blastulen.¹⁾ Die Eier, die längere Zeit in dem Seewasser mit Zyankalium gewesen waren, zerfielen auch nicht so rasch, wenn sie in normales Seewasser übertragen wurden, wie die Eier, welche

¹⁾ Es handelt sich hier wohl um die im vorigen Abschnitt erläuterte Wirkung von Zyankalium auf solche Eier, aber nicht um die Wirkung der hypertonischen Lösung.

kürzere Zeit im zyanalkiumhaltigen hypertonen Seewasser verweilt hatten. Das dürfte wohl daran liegen, daß die Eier, welche längere Zeit im zyanalkiumhaltigen Seewasser bleiben, mehr KCN oder HCN aufnehmen und deshalb nach der Übertragung in normales Seewasser dasselbe nicht so rasch wieder abgeben. Dieser Versuch wurde sehr oft und stets mit demselben Erfolg wiederholt. Meist verhinderte der Zusatz von Zyanalkium zum hypertonen Seewasser dessen Wirkung absolut. Für diejenigen, welche diese Versuche wiederholen wollen, möchte ich bemerken, daß das Zyanalkium mit dem hypertonen Seewasser sehr gründlich gemischt sein muß, ehe die Eier hineingebracht werden dürfen.

Diese Versuche könnten das Bedenken aufkommen lassen, daß das Zyanalkium die Eier vielleicht getötet oder wenigstens entwicklungsunfähig gemacht habe. Dieses Bedenken wird aber durch folgende Versuche beseitigt.

Die Eier eines Weibchens wurden nach künstlicher Membranbildung (mittels Buttersäurebehandlung) in zwei Gefäße mit je 50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl gebracht. Dem einen Gefäß wurde 2 ccm $\frac{1}{20}$ % KCN zugefügt. Je eine Portion wurde in Intervallen von 10 Minuten aus dem hypertonen in normales Seewasser übertragen.

Wir betrachten zunächst das Verhalten der Eier, welche in der hypertonen Lösung ohne Zyanalkium gewesen waren. Von den früher als nach 35 Minuten aus dem hypertonen in normales Seewasser übertragenen Eiern entwickelte sich nichts, von den nach 35 Minuten in normales Seewasser übertragenen Eiern entwickelten sich etwa 5% zu guten Larven, von den nach 45 Minuten übertragenen entwickelten sich fast alle, und zwar meist zu normalen Larven. Von den nach 55 Minuten übertragenen waren fast alle entwickelt, aber nur 20% bildeten normale Larven; die noch länger in dem hypertonen Seewasser gewesenen Eier lieferten mit zunehmender Expositionsdauer schlechter werdende Resultate.

Von den Eiern, welche in dem hypertonen Seewasser mit Zyanalkium gewesen waren, entwickelte sich kein einziges nach dem Übertragen in normales Seewasser; sie zerfielen vielmehr im Laufe der nächsten 24 Stunden. Von den Eiern nun, welche nach 55 Minuten aus dem zyanalkiumhaltigen hyper-

tonischen Seewasser genommen worden waren, wurde der größere Teil zunächst nicht in normales Seewasser, sondern in hypertenisches Seewasser (50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}n$ NaCl), aber diesmal ohne Zyankalium, gebracht. Nach 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten wurde je eine Portion dieser Eier in normales Seewasser übertragen. Von den nach 40 Minuten aus dem hypertonischen Seewasser genommenen Eiern entwickelten sich etwa 5%, von den nach 50 Minuten herausgenommenen etwa 30%, und die nach 60 Minuten herausgenommenen entwickelten sich so gut wie alle, wenn auch ein Teil derselben sich abnorm furchte, also bereits die Wirkung der Überexposition zeigte. Dieser Versuch, der mit demselben Erfolg mehrfach wiederholt wurde, zeigt, daß die hypertonische Lösung in Gegenwart der geringen Menge Zyankalium fast unwirksam bleibt, daß aber die Eier in so kurzer Zeit wenigstens nicht geschädigt werden.

Man kann nun auch direkt zeigen, daß die hypertonische Lösung nur in Gegenwart von freiem Sauerstoff wirksam ist, indem man nämlich die Luft aus der hypertonischen Lösung vertreibt. Aber diese Versuche können sehr leicht mißlingen, weil eine störende Fehlerquelle sich bei denselben bemerkbar macht. Gewöhnlich wurde die hypertonische Lösung durch einen mehrere Stunden lang hindurchgehenden Strom von sorgfältigst gereinigtem Wasserstoff von Sauerstoff möglichst befreit. Dann wurden ein oder mehrere Tropfen Eier in die Lösung gebracht. Hier liegt die Fehlerquelle. Mit dem Öffnen der Flasche tritt natürlich etwas Sauerstoff in dieselbe, und für eine kurze Zeit wirkt die hypertonische Lösung nicht bei Sauerstoffabschluß, sondern bei Gegenwart von etwas O. Nun ist offenbar schon wenig O ausreichend, um die Oxydationsvorgänge, welche der Entwicklung des Eies zugrunde liegen, zu unterhalten. Das war mir schon vor 12 Jahren bei meinen ersten Versuchen über die Notwendigkeit des Sauerstoffs für die normale Furchung aufgefallen. Die Eier brauchen aber, wie schon erwähnt, nach der Membranbildung nur ganz kurze Zeit in der hypertonischen Lösung zu bleiben, nämlich 30 bis 50 Minuten, und es ist klar, daß bei einer so kurzen Zeit das Eindringen von etwas Sauerstoff in die hypertonische Lösung den ganzen Versuch leicht vereitelt. Ich verminderte diese Gefahr in der Weise, daß ich mit Hilfe eines geschulten Assistenten

den Stöpsel der Flasche nur etwa eine Sekunde lang und nur einige Millimeter öffnete, um die Eier einzuführen. Vor, während und unmittelbar nach dem Öffnen ging ein sehr kräftiger Wasserstoffstrom durch die Flasche. Negative Versuche, d. h. Versuche, in denen die hypertone Lösung einige oder viele Eier nach der Membranbildung selbst nach Wasserstoffdurchströmung zur Entwicklung anregt, beweisen nicht viel¹⁾, dagegen sind Versuche beweisend, in denen bei Sauerstoffabschluß die hypertone Lösung wirkungslos bleibt, in denen sie aber ihre Wirksamkeit wieder gewinnt, wenn man hinterher Sauerstoff zuläßt.

Die Eier eines Weibchens wurden in der üblichen Weise mit Buttersäure behandelt und alle bildeten Membranen. Diese Eier wurden dann in zwei Flaschen mit demselben hypertonen Seewasser verteilt; durch eine Flasche perlte ein Sauerstoffstrom, durch die andere — welche vorher schon durch einen Wasserstoffstrom von Luft befreit war — ein Wasserstoffstrom. Temperatur $14\frac{1}{2}^{\circ}$ C. Nach einer Stunde wurden die Eier in normales Seewasser (in Berührung mit Luft) übertragen. Fast alle die Eier, welche in dem sauerstoffhaltigen hypertonen Seewasser gewesen waren, entwickelten sich zu Larven, während nur eine kleine Zahl, nämlich etwa $\frac{1}{2}\%$, sich unter denjenigen Eiern zu Larven entwickelten, welche in dem sauerstofffreien, oder richtiger sauerstoffarmen, hypertonen Seewasser gewesen waren. Die übrigen Eier zerfielen in der Weise, die für Eier charakteristisch ist, in welchen man die Membranbildung hervorruft, ohne sie dem hypertonen Seewasser auszusetzen. Ich wollte mich nun überzeugen, ob die Eier, welche nach dem Aufenthalt in hypertonem sauerstofffreien oder -armen Seewasser zerfallen, sich entwickeln, wenn man sie hinterher in derselben hypertonen Lösung der Luft aussetzt. Zu diesem Zwecke wurden nicht alle Eier nach Beendigung des vorhin erwähnten Versuches aus der hypertonen Lösung genommen, aus welcher der Sauerstoff ausgetrieben war, sondern ein Teil blieb in dieser hypertonen Lösung, aber die letztere

¹⁾ Sie zeigen nur, daß zu viel Sauerstoff fehlerhafterweise in die hypertone Lösung geriet. Auf diese Fehlerquelle wies ich bereits in meiner ersten Mitteilung über diesen Gegenstand hin: Loeb, Über die Notwendigkeit von freiem Sauerstoff in der hypertonen Lösung usw. Univ. of Californ. Public 3, 39, 1906. (Untersuchungen S. 491.)

wurde nunmehr der Luft ausgesetzt. Nach verschiedenen Intervallen, 14, 26, 36, 46, 56 und 116 Minuten, wurde je eine Portion der Eier in normales Seewasser übertragen. Die folgende Tabelle gibt die Resultate.

Aufenthalt der Eier in hypertonischem Seewasser		Prozentsatz der Eier, welche sich zu schwimmenden Larven entwickelten	
erst ohne Sauerstoff	dann mit Sauerstoff		
60 Minuten	+ 0 Minuten	ungefähr	$\frac{1}{2}\%$
60 „	+ 14 „	„	4%
60 „	+ 26 „	„	30%
60 „	+ 36 „	„	30%
60 „	+ 46 „	„	90%
60 „	+ 56 „		wenige
60 „	+ 116 „		keine Larven, alle Eier starben

Wir können aus diesen Versuchen mit Sicherheit den Schluß ziehen, daß die hypertonische Lösung in diesen Versuchen nur dann wirksam ist, wenn sie eine genügende Quantität von freiem Sauerstoff enthält. Dieses Resultat war nach den in Kapitel VII mitgeteilten Erfahrungen zu erwarten. Wir verstehen nun, wie es kommt, daß, wenn einmal eine gewisse Hypertonie des Seewassers erreicht ist, eine weitere Steigerung der Hypertonie die Zeit, während welcher die Eier nach der Membranbildung in der hypertonischen Lösung bleiben müssen, nicht abkürzt. Es handelt sich eben darum, daß gewisse chemische Reaktionen im Ei stattfinden müssen, wodurch es in den Stand gesetzt wird, sich von dem schädlichen Einfluß der Membranbildung, d. h. der drohenden Zytolyse, zu erholen. Diese chemischen Reaktionen, nämlich Oxydationen, treten offenbar nach einem gewissen Wasserverlust im Ei ein. Die Geschwindigkeit, mit welcher diese Oxydationen verlaufen, ist aber keineswegs proportional der Hypertonie der umgehenden Lösung.

5. Im allgemeinen beschleunigt eine leicht alkalische Reaktion die Oxydationsvorgänge in tierischen Geweben, und es war daher von Interesse, festzustellen, wie mit der Konzentrationszunahme der HO-Ionen in der hypertonischen Lösung die Geschwindigkeit ihrer Wirkung zunimmt. Zu dem Zweck wurde als Lösung nicht Seewasser, sondern eine neutrale Mischung von $\frac{m}{2}$ NaCl, KCl, CaCl₂ und MgCl₂ in dem Verhältnis dieser Salze benutzt,

indem dieselben im Seewasser enthalten sind. Zu je 50 ccm dieser Lösung wurde 8 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl-Lösung, welche ebenfalls neutral war, zugefügt, um die nötige Hypertonie zu erzielen. Zu je 50 ccm dieser Mischung wurde nun 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 und 1,6 ccm $\frac{n}{50}$ NaHO zugesetzt. In diese Lösungen wurden die Eier eines Strongylocentrotus purpuratus verteilt, nachdem dieselben mittelst Buttersäurebehandlung zur Membranbildung veranlaßt worden waren. Die folgende Tabelle gibt den Prozentsatz der gebildeten Larven.

Expositionsdauer in der hypertonischen Lösung	Alkalizusatz zu der hypertonischen Lösung in Kubikzentimeter $\frac{n}{50}$ NaHO					
	0	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6
30 Minuten	0	{ einige Larven }	5 ^o / _o	5 ^o / _o	{ wenige Larven	wenige Larven
40 „	5 ^o / _o	10 ^o / _o	20 ^o / _o	20 ^o / _o	50 ^o / _o	20 ^o / _o
50 „	20 ^o / _o	80 ^o / _o	50 ^o / _o	80 ^o / _o	80 ^o / _o	100 ^o / _o
60 „	25 ^o / _o	90 ^o / _o	90 ^o / _o	90 ^o / _o	90 ^o / _o	90 ^o / _o
70 „	80 ^o / _o	90 ^o / _o	90 ^o / _o	90 ^o / _o	90 ^o / _o	90 ^o / _o

Bei zu langer Exposition werden die Larven verkrüppelt. Ich fand auch, daß man noch Larven erhält, wenn man der hypertonischen Lösung eine Spur HCl zusetzt. Die untere Grenze für die Konzentration der Hydroxylionen in der hypertonischen Lösung habe ich noch nicht bestimmt.¹⁾

Erhöht man die Alkalinität von hypertonischem Seewasser, so kann man ebenfalls die Zeit abkürzen, während welcher die Eier nach der Membranbildung in der hypertonischen Lösung bleiben müssen. Zu je 42 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}$ norm. NaCl wurden 0, 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zugefügt.

Ein Teil dieses Alkalis wird durch die Bikarbonate und Phosphate des Seewassers gebunden. Die Eier eines Seeigels wurden nach der künstlichen Membranbildung in diese Lösungen verteilt. Die folgende Tabelle zeigt, daß auch hier mit der Zunahme der Konzentration der HO-Ionen die Zeit, während welcher die Eier

¹⁾ Loeb, Zur Analyse der osmotischen Entwicklungserregung unbefruchteter Seeigeleier. Pflügers Arch. 118, 197, 1907.

in der Lösung bleiben müssen, um sich zu Larven zu entwickeln, abgekürzt wird.

Expositionsdauer im hyperten. Seewasser	Eier mit Membran in Kubikzentimetern $\frac{n}{10}$ NaHO				
	0	0,5	1,0	1,5	2,0
35 Minuten	5%	10%	20%	20%	20%
44 „	50%	80%	90%	100%	80%
52 „	90%	100%	100%	100%	100%
60 „	100%	100%	Alle entwickelt, aber schlechte Larven.		

6. Wir kommen nun zu der Besprechung eines scheinbaren Widerspruchs zwischen den Resultaten dieses und des vorigen Kapitels. Im vorigen Kapitel sahen wir, daß die Eier nach der Membranbildung zur Entwicklung gebracht werden können, wenn wir sie 3 Stunden oder länger in sauerstoffarmem Seewasser halten, oder wenn wir die Oxydationen durch Zusatz von KCN zum Seewasser hemmen. In diesem Kapitel sahen wir, daß die Eier nach der Membranbildung am Leben bleiben und zur Entwicklung veranlaßt werden können, wenn wir dieselben hinterher etwa 30 bis 50 Minuten in hypertones Seewasser bringen; daß aber dies nur möglich ist, wenn die hypertone Lösung freien Sauerstoff in genügender Menge enthält. Wie sind diese scheinbar widersprechenden Angaben zu vereinigen?

Die eigentliche Entwicklungserregung besteht in diesem Falle in der Hervorrufung der Membranbildung. Dieser Prozeß ist sicher kein Oxydationsprozeß, da er ohne Sauerstoff möglich ist. Vielleicht handelt es sich in letzter Instanz um einen rein physikalischen Vorgang (wie etwa eine Lipoidverflüssigung oder eine Spaltung einer [hypothetischen] Lipoid-Eiweißverbindung?)

Sobald dieser der Membranbildung zugrunde liegende Prozeß stattgefunden hat, tritt die Entwicklung im Ei ein. Warum das der Fall ist, wissen wir einstweilen noch nicht. Aber dieser Prozeß schädigt gleichzeitig das Ei. Wenn das Ei in diesem geschädigten Zustand anfängt, sich zu entwickeln, so geht es zugrunde. Hindern wir aber das Ei einige Stunden an der Entwicklung, indem wir ihm den Sauerstoff entziehen oder indem wir die Oxydation durch KCN hemmen, so können

die Eier sich normal entwickeln. Den Grund hierfür suchen wir in der Annahme, daß, während die Oxydationen gehemmt sind, gewisse andere Prozesse im Ei (z. B. Spaltungen) weiter gehen und daß diese Prozesse zur Bildung von Stoffen führen, welche die durch den Membranbildungsprozeß bedingte Schädigung aufheben. In viel besserer Weise kann aber diese Schädigung aufgehoben werden durch besondere Oxydationsprozesse, welche durch Behandlung der Eier mit hypertonischem Seewasser eingeleitet werden.

Wir haben schon erwähnt, daß es keinen prinzipiellen Unterschied macht, ob die Eier erst zur Membranbildung veranlaßt werden und dann ins hypertonische Seewasser kommen, oder ob sie erst ins hypertonische Seewasser kommen und die Membranbildung hinterher eingeleitet wird.¹⁾ Der einzige Unterschied zwischen beiden Verfahren besteht darin, daß in dem letzteren Falle die Eier viel länger in dem hypertonischen Seewasser bleiben müssen, nämlich etwa $1\frac{1}{2}$ bis 2 Stunden, während sie, wenn die Membranbildung der Behandlung mit hypertonischem Seewasser voraufgeht, nur $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde in der letzten Lösung zu bleiben brauchen. Dieser Unterschied rührt meines Erachtens daher, daß die hypertonische Lösung in dem Ei nach der Membranbildung deshalb wirksamer ist, weil die Oxydationsvorgänge alsdann schon durch die Membranbildung beschleunigt sind.

Diese Versuche führten mich auf die Idee, daß die Entwicklungserregung durch das Spermatozoon auch vielleicht durch zwei verschiedene Agenzien bedingt sei, nämlich eins, das die Membranbildung veranlaßt, und ein zweites, das die schädliche Wirkung aufhebt, welche durch die Membranbildung allein bedingt wäre. Die Membranbildung könnte möglicherweise durch eine Fettsäure, die zweite Wirkung durch spezielle Oxydasen bedingt sein.

¹⁾ Für praktische Zwecke ist die natürliche Reihenfolge, nämlich erst Membranbildung und dann hypertonische Lösung, viel wirksamer.

XI. Anhang. Über die relative osmotische Wirksamkeit der Lösungen verschiedener Stoffe.

Ich hatte, wie schon erwähnt, bereits im Jahre 1900 die Beobachtung mitgeteilt, daß eine reine Zuckerlösung ebenfalls imstande ist, die Entwicklung des unbefruchteten Seeigeleies anzuregen. Diese Versuche waren von mir deshalb angestellt worden, um zu entscheiden, ob es sich bei der Wirkung der hypertonen Lösungen auf die Entwicklungserregung lediglich um die Wirkung der Wasserentziehung handele, oder ob hierfür noch die Wirkung besonderer Ionen in Betracht käme, wie ich zuerst vermutet hatte. Bei diesen Versuchen hatte es sich schon gezeigt, daß die reine Zuckerlösung eine stärkere osmotische Wirksamkeit hat, als ihr theoretisch zukommen sollte. Delage, der diese Versuche übersehen hatte, setzte sich das Ziel, zu zeigen, daß man ohne hypertone Lösungen imstande sei, die Seeigeleier zur Entwicklung zu bringen. Sein Bemühen war gegenstandslos, da dieser Beweis schon durch Lyon und durch meine früher erwähnten (Kapitel IX) Versuche erbracht war. Leider aber verfiel Delage in einen Irrtum, indem er Zuckerlösungen benutzte, welche 1,135 N waren. Er hatte gefunden, daß die Gefrierpunktserniedrigung des Seewassers 2,12° ist, was mir im Hinblick auf Garreys Versuche etwas zu hoch erscheint. Daraus schloß er, daß eine 1,135 N Saccharoselösung mit dem Seewasser isosmotisch sei. Solche Lösungen sind aber stark hypertone, wie ich im folgenden zeigen will. Bei dieser Gelegenheit wollen wir aber außer den Zuckerlösungen noch die Lösungen einiger anderer Stoffe berücksichtigen.

Die folgenden Versuche wurden alle an Seeigeleiern angestellt, an welchen die Membranbildung vorher durch Butter säurebehandlung eingeleitet war. Die Eier wurden alle etwa 10 Minuten nach der Membranbildung in die hypertone Lösung gebracht, und daher ist die Expositionsdauer etwas länger als sie sein würde, wenn die Eier erst 1 oder 1½ Stunden nach der Membranbildung in die hypertone Lösung gebracht worden wären. Wir beginnen mit Versuchen mit reinen Chlornatriumlösungen.

Die Versuche mit reinen hypertonen NaCl-Lösungen ergaben das auf den ersten Blick paradoxe Resultat, daß die Eier

höhere Konzentrationen von NaCl-Lösungen ertragen können als von hypertonischem Seewasser. Wir werden aber sehen, daß dieses Paradoxon eine einfache Erklärung findet. Die unbefruchteten Eier eines Weibchens wurden der Membranbildung durch Butter-säurebehandlung unterworfen und dann (etwa 10 Minuten später) in 50 ccm $\frac{1}{2}$ m NaCl + 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16 $2\frac{1}{2}$ m NaCl verteilt; nach 55, 90 und 120 Minuten wurde je eine Portion der Eier in normales Seewasser zurückgebracht. Die Temperatur war 13° C.

Natur der Lösung		Prozentsatz der Eier, welche sich zu Larven entwickelten, nach einer Expositionsdauer		
		von 55	90	120 Min.
50 ccm $\frac{1}{2}$ m NaCl	+ 3 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl	0	0	0
50 „ $\frac{1}{2}$ „ „	+ 4 „ $2\frac{1}{2}$ „ „	0	0	0
50 „ $\frac{1}{2}$ „ „	+ 5 „ $2\frac{1}{2}$ „ „	0	0	1 ⁰ / ₀
50 „ $\frac{1}{2}$ „ „	+ 6 „ $2\frac{1}{2}$ „ „	0	1 ⁰ / ₀	5 ⁰ / ₀
50 „ $\frac{1}{2}$ „ „	+ 7 „ $2\frac{1}{2}$ „ „	2 ⁰ / ₀	50 ⁰ / ₀	70 ⁰ / ₀
50 „ $\frac{1}{2}$ „ „	+ 8 „ $2\frac{1}{2}$ „ „	30 ⁰ / ₀	80 ⁰ / ₀	90 ⁰ / ₀
50 „ $\frac{1}{2}$ „ „	+ 10 „ $2\frac{1}{2}$ „ „	80 ⁰ / ₀	90 ⁰ / ₀	—
50 „ $\frac{1}{2}$ „ „	+ 12 „ $2\frac{1}{2}$ „ „	80 ⁰ / ₀	—	—
50 „ $\frac{1}{2}$ „ „	+ 14 „ $2\frac{1}{2}$ „ „	80 ⁰ / ₀	—	—
50 „ $\frac{1}{2}$ „ „	+ 16 „ $2\frac{1}{2}$ „ „	80 ⁰ / ₀	—	—

Durch empirische Versuche habe ich festgestellt, daß eine halbgrammolekulare Lösung von NaCl nahezu oder praktisch isotonisch ist für das Seeigeli. Diese Erfahrung hat sich seit einer Reihe von Jahren dadurch bewährt, daß wir für die Herstellung von künstlichem Seewasser halbgrammolekulare Lösungen von NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂ und MgSO₄ in den bekannten Verhältnissen mit dem besten Erfolg benutzen. Dieser Mischung wird noch eine Spur von NaHCO₃ zugesetzt.

Vergleichen wir nunmehr diese Resultate mit den im vorigen Kapitel erzielten, so finden wir, daß 50 ccm $\frac{1}{2}$ m NaCl + 5 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl die gleiche Wirkung hat wie 50 ccm Seewasser + 4 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl; mit anderen Worten, daß eine Mischung von 50 ccm $\frac{1}{2}$ m NaCl + 1 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl ungefähr isotonisch ist mit Seewasser.

Während nun eine Mischung von 50 ccm Seewasser + 10 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl schon die Eier in 60 Minuten so stark schädigt, daß

nur eine kleine Zahl sich entwickelt, und während eine Mischung von 50 ccm Seewasser + 12 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl praktisch alle Eier mit künstlicher Membran in 60 Minuten bei 16° C tötet, entwickelten sich noch 80% der Eier, nachdem sie 60 Minuten in einer Mischung von 50 ccm $\frac{1}{2}$ m NaCl + 16 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl gewesen waren. Die Erklärung dieses Paradoxons liegt in dem Umstand, daß die NaCl-Lösung praktisch neutral war, während das Seewasser schwach alkalisch ist. Ich habe nun schon früher gezeigt, daß die schädliche Wirkung hypertotonischer Lösungen auf das Ei viel größer ist, wenn diese Lösungen schwach alkalisch, als wenn sie neutral sind; schwach saure hypertotonische Lösungen sind noch unschädlicher als neutrale, mit anderen Worten, die schädliche Wirkung der hypertotonischen Lösungen auf das Ei nimmt innerhalb der in Betracht kommenden Grenzen mit der Konzentration der Hydroxylionen zu. Da ich ferner zeigen konnte, daß in einer Lösung, welche frei von Sauerstoff ist, die schädliche Wirkung dieser hypertotonischen Lösungen ausbleibt, so ist es möglich, daß zwischen beiden Tatsachen ein Zusammenhang besteht, mit andern Worten, daß die Oxydationsvorgänge im Ei mit wachsender Konzentration der HO-Ionen (innerhalb gewisser Grenzen) beschleunigt werden.

Wir kommen nun zu den Versuchen mit Rohrzucker. Nach Gefrierpunktsbestimmungen, welche Herr Dr. W. E. Garrey ausführte, hat das Seewasser im Pacific Grove dieselbe Gefrierpunktserniedrigung wie eine 0,54 m NaCl-Lösung. Das stimmt ziemlich nahe mit den Erfahrungen überein, welche ich mit künstlichem Seewasser gemacht habe. Da nach Kohlrausch und Holborn bei dieser Konzentration etwa 74% der NaCl-Moleküle dissoziiert sind, so ist eine 0,94 m Rohrzuckerlösung mit dem Seewasser theoretisch isosmotisch. Stellt man aber mit reinen Rohrzuckerlösungen Versuche am Seeigeli an, so findet man, daß eine solche Lösung nicht isotonisch, sondern stark hypertonisch wirkt. Zu 50 ccm $\frac{6}{8}$ m Rohrzuckerlösung wurden 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ccm $2\frac{1}{2}$ m Rohrzucker zugefügt und die unbefruchteten Eier eines Seeigels nach der künstlichen Membranbildung in derselben verteilt.¹⁾ Temperatur 12° C. Die

¹⁾ Die Eier waren wenige Minuten nach der Membranbildung in die Zuckerlösung gebracht worden.

Eier blieben 58 Minuten in der Lösung. Die Prozentzahl der gebildeten Larven gibt die folgende Tabelle.

Natur der Lösung		Prozentsatz der Eier, welche sich zu Larven entwickeln
50 ccm $\frac{6}{8}$ m Rohrucker	0 ccm $2\frac{1}{2}$ m Rohrucker	0
50 „ $\frac{6}{8}$ „ „	2 „ $2\frac{1}{2}$ „ „	0
50 „ $\frac{6}{8}$ „ „	3 „ $2\frac{1}{2}$ „ „	Einige Larven
50 „ $\frac{6}{8}$ „ „	4 „ $2\frac{1}{2}$ „ „	2 ⁰ / ₀
50 „ $\frac{6}{8}$ „ „	5 „ $2\frac{1}{2}$ „ „	20 ⁰ / ₀
50 „ $\frac{6}{8}$ „ „	6 „ $2\frac{1}{2}$ „ „	60 ⁰ / ₀
50 „ $\frac{6}{8}$ „ „	7 „ $2\frac{1}{2}$ „ „	98 ⁰ / ₀
50 „ $\frac{6}{8}$ „ „	8 „ $2\frac{1}{2}$ „ „	98 ⁰ / ₀

Es wirkt also eine Mischung von 50 ccm $\frac{6}{8}$ m Rohrucker + 6 ccm $2\frac{1}{2}$ m Rohrucker ebenso günstig wie eine Mischung von 50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}$ NaCl oder 50 ccm $\frac{1}{2}$ m NaCl + 8 oder 10 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl. Eine Mischung von 50 ccm $\frac{6}{8}$ m Rohrucker + 6 ccm $2\frac{1}{2}$ m Rohrucker ist aber 0,94 m oder mit dem Seewasser isosmotisch. Diese Lösung wirkt aber ebenso hypertensisch auf das Seeigeli wie eine 0,80 m NaCl-Lösung, d. h. eine Lösung, deren osmotischer Druck ungefähr 50⁰/₀ höher ist als der einer 0,94 m Rohruckerlösung!

Daß in der Tat eine mit dem Seewasser theoretisch isosmotische Lösung von Rohrucker für das Seeigeli hypertensisch ist, läßt sich direkt zeigen. Die Eier schrumpfen nämlich in einer solchen Lösung; sie schrumpfen sogar schon in einer $\frac{7}{8}$ m Rohruckerlösung; in einer $\frac{6}{8}$ m Rohruckerlösung behalten sie ihr Volumen, und in einer $\frac{5}{8}$ m Rohruckerlösung nehmen sie an Volumen zu. Ich habe übrigens schon vor einigen Jahren beobachtet, daß Medusen (Polyorchis) in einer reinen mit dem Seewasser theoretisch isosmotischen Rohruckerlösung erheblich schrumpften.

Daß eine $\frac{6}{8}$ m Rohruckerlösung ungefähr die für das Seeigeli isotonische Konzentration besitzt, läßt sich indirekt zeigen, wenn man mit Samen befruchtete Seeigeleier unmittelbar nach der Befruchtung in reine Rohruckerlösungen verschiedener Konzentration bringt. Versuche dieser Art zeigten, daß die erste Furchung in einer $\frac{6}{8}$ m Rohruckerlösung bei allen Eiern eintrat, und zwar fast zur selben

Zeit wie im normalen Seewasser; während sie in $\frac{5}{8}$ und $\frac{7}{8}$ m Lösungen verspätet eintrat und nur bei wenigen Eiern. In Lösungen unter $\frac{5}{8}$ m und über $\frac{7}{8}$ m Rohrzucker furchte sich überhaupt kein Ei mehr. Auch in der $\frac{6}{8}$ m Rohrzuckerlösung ging die Furchung nicht über das Vier- oder Achtzellstadium hinaus, was der Ansicht entspricht, daß die Salze des Eies aus demselben herausdiffundieren, wenn es in eine Rohrzuckerlösung gebracht wird. Bringt man die Eier aber wieder in Seewasser zurück, so entwickeln sie sich normal. Dieses Verhalten des Eies in einer Rohrzuckerlösung entspricht dem Verhalten einer Meduse in derselben Lösung, in dem nämlich auch bei der Meduse sowohl wie beim Herzen alsbald die spontanen Kontraktionen in einer reinen Rohrzuckerlösung aufhören.¹⁾ Auch hier dürfte es sich darum handeln, daß infolge des Herausdiffundierens von Natriumsalzen die Erregbarkeit des Herzens und der Meduse rasch abnimmt. Auch Overton fand, daß die Erregbarkeit des Froschmuskels in einer Rohrzuckerlösung rasch abnimmt; was Hamburger wohl mit Recht so erklärt, daß der Muskel seine Erregbarkeit infolge des Herausdiffundierens von Natriumsalzen oder -Ionen verliert.²⁾

Wir sehen also, daß Delage im Irrtum ist, wenn er eine 1,135 N Saccharoselösung als eine mit dem Seewasser isotonische Lösung ansieht. Delages angeblich isotonische Lösungen, in denen er 1,135 N Zuckerlösungen rein oder in Mischung mit Seewasser benutzt, sind alle hypertensisch. Der Vollständigkeit halber seien noch die optimalen Resultate mit den Lösungen einiger anderen Stoffe mitgeteilt.

Natur der Lösung		Prozentsatz der Eier, welche Larven bildeten
50 ccm $\frac{1}{2}$ m LiCl	+ 6 ccm $2\frac{1}{2}$ m LiCl	5%
50 „ $\frac{1}{2}$ „ „	+ 7 „ $2\frac{1}{2}$ „ „	70%
50 „ $\frac{1}{2}$ „ KCl	+ 7 „ $2\frac{1}{2}$ „ KCl	1%
50 „ $\frac{1}{2}$ „ „	+ 8 „ $2\frac{1}{2}$ „ „	60%
50 „ $\frac{2}{8}$ „ MgCl ₂	+ 6 „ $2\frac{1}{2}$ „ MgCl ₂	50%
50 „ $\frac{2}{8}$ „ „	+ 7 „ $2\frac{1}{2}$ „ „	80%
50 „ $\frac{2}{8}$ „ CaCl ₂	+ 6 „ $2\frac{1}{2}$ „ CaCl ₂	20%
50 „ $\frac{2}{8}$ „ „	+ 7 „ $2\frac{1}{2}$ „ „	90%

¹⁾ J. Loeb, Am. Journ. of Physiol. **3**, 384, 1900.

²⁾ H. J. Hamburger, Osmotischer Druck und Ionenlehre **3**, 147. Wiesbaden 1904.

Man sieht daraus, daß Lösungen verschiedener Stoffe, wenn sie auch theoretisch isosmotisch sind, deshalb doch nicht physiologisch gleich stark wirken. Es wäre deshalb angebracht, zwischen theoretisch isosmotischen und physiologisch isotonischen Lösungen zu unterscheiden. Für die roten Blutkörperchen fallen beide viel mehr zusammen als für das Seeigellei. Die folgende Tabelle, in der die optimalen Konzentrationen der Lösung verschiedener Stoffe für die künstliche Parthenogenese zusammengestellt sind, macht das deutlich. Diese optimale Konzentration läßt sich nämlich sehr scharf bestimmen, wenn man eine bestimmte Expositionsdauer wählt, nämlich 55 Minuten bei etwa 15° C.

Optimale Konzentration der Lösung verschiedener Stoffe für die künstliche Parthenogenese.

Natur der Lösung	Optimale Konzentration in Grammolekülen	Dissoziation der Lösung	Osmotischer Druck der Lösung in Atmosphären
Rohrzucker	0,96 m	—	21,53
Traubenzucker	1,04 m	—	23,33
CaCl ₂	0,50 m	64%	25,57
MgCl ₂	0,49 m	70%	26,47
LiCl	0,74 m	66%	27,59
NaCl	0,79 m	71%	30,28
KCl	0,78 m	77%	30,95

Diese Zahlen, welche an *Strongylocentrotus purpuratus* in Pacific Grove gewonnen sind, gelten natürlich nicht ohne weiteres für die Eier jeder beliebigen Seeigelform in jeder beliebigen Lokalität. Was bestimmt die hier gefundene Abweichung zwischen der gefundenen und theoretisch berechneten osmotischen Wirksamkeit dieser Lösungen? Herr Professor Arrhenius hat in einem Brief an mich die Ansicht ausgesprochen, daß es sich hier um den Ausdruck der von H. C. Jones gefundenen Abweichungen zwischen berechnetem und wirklichem osmotischen Druck, also um eine rein physikalische Erscheinung, handle. Ich will mir darüber kein Urteil erlauben, will aber gestehen, daß ich eine Abweichung der Zellen vom Schema der Semipermeabilität zum mindesten für mitverantwortlich halte.¹⁾

¹⁾ Nach Jones' Solvattheorie ist der Unterschied zwischen beobachtetem und theoretischem osmotischem Druck darauf zurückzuführen,

XII. Über chemische Konstitution und physiologische Wirksamkeit der Säuren.¹⁾

Wir wollen uns nun der Beantwortung der Frage zuwenden, welche für das Verständnis der künstlichen Parthenogenese am wesentlichsten ist, nämlich wie die Fettsäure die Membranbildung und damit die künstliche Parthenogenese bewirkt. Diese Frage wollen wir in zwei Kapiteln erörtern, von denen das erste über die Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Wirksamkeit der Säuren handeln soll. Ich hatte schon bei meinen ersten Versuchen über die Membranbildung bemerkt, daß die chemische Konstitution der Säuren für deren Wirkung von großer Bedeutung ist. Während Kohlensäure und die einbasischen Fettsäuren sich als sehr wirksam erwiesen, waren die starken Mineralsäuren wie HCl, HNO₃, H₂SO₄ so wenig wirksam, daß sie für diese Versuche unbrauchbar waren; und das gleiche galt für zwei- und dreibasische organische Säuren wie Oxalsäure, Bernsteinsäure, Zitronensäure u. a. m. Die Oxy-säuren waren wirksam, aber nicht in demselben Grade wie die einbasischen Fettsäuren.²⁾ Es schien aussichtsvoll, die hier vorliegenden Beziehungen zwischen Konstitution und Wirksamkeit näher zu untersuchen, da zu erwarten war, daß sie Aufschlüsse über die Rolle der Säuren bei der Membranbildung geben würden, und daß die Resultate von allgemeinerer Bedeutung sein würden.

Die Versuche wurden in der Weise angestellt, daß die

daß gelöster Stoff und Lösungsmittel Verbindungen bilden und deshalb in konzentrierten Lösungen die Konzentration des Lösungsmittels merklich herabsetzen. Die wesentliche Stütze für diese Annahme sieht er darin, daß gerade die Stoffe, welche mit dem Maximum von Kristallwasser kristallisieren, auch die größte Differenz zwischen theoretischem und wirklichem Druck zeigen. Saccharose gehört aber nicht zu diesen Stoffen, und Jones bemerkt auch ausdrücklich, daß Nichtleiter, mit Ausnahme von Glycerin, eine geringe Tendenz zur Verbindung mit Wasser haben. (H. C. Jones, The Present Status of the Solvate Theory. Am. Chem. Journ. 41, 29, 1909.)

¹⁾ Loeb, Biochem. Zeitschr. 15, 254, 1909.

²⁾ Loeb, Über eine verbesserte Methode der künstlichen Parthenogenese III. Untersuchungen S. 329.

Eier erst durch zweimaliges Waschen in einer $\frac{m}{2}$ NaCl-Lösung von allem Seewasser befreit wurden. Dann wurden dieselben in Lösungen der verschiedensten Fettsäuren in $\frac{m}{2}$ NaCl-Lösung gebracht, da es ja nötig war, die Säurelösung mit dem Seewasser isosmotisch zu machen. Nach bestimmten Intervallen wurde je eine Portion der Eier mittelst einer Pipette in 200 ccm Seewasser zurückgebracht, und es wurde ermittelt, welcher Prozentsatz der Eier Membranen bildete.

Schon bei meinen ersten Versuchen war es mir aufgefallen, daß die höheren Fettsäuren sich als wirksamer erwiesen, als die niederen. Ich vermutete deshalb, daß die Wirksamkeit der einbasischen Fettsäuren mit der Zahl der Kohlenstoffatome zunimmt. Die folgende Tabelle gibt die Resultate einer für die Entscheidung dieser Frage angestellten Versuchsreihe. Die Temperatur betrug ungefähr 15° C.

Die erste vertikale Reihe der Tabelle gibt an, wie lange die Eier in der Säure verweilt hatten, die anderen vertikalen Reihen geben den Prozentsatz der Eier an, welche nach dieser Exposition in den verschiedenen Säuren Membranen bildeten.

Expositionsdauer

in $\frac{n}{1000}$	Ameisen- säure	Essig- säure	Propion- säure	Butter- säure	Capryl- säure	Nonyl- säure
1 Minute	0	0	0	0	10 ⁰ / ₀	100 ⁰ / ₀
1 ¹ / ₂ „	0	0	0	1 ¹ / ₁₀ ⁰ / ₀	80 ⁰ / ₀	—
2 Minuten	0	0	1 ¹ / ₁₀ ⁰ / ₀	10 ⁰ / ₀	100 ⁰ / ₀	—
2 ¹ / ₂ „	0	1 ¹ / ₄ ⁰ / ₀	20 ⁰ / ₀	40 ⁰ / ₀	—	—
3 „	0	5 ⁰ / ₀	50 ⁰ / ₀	90 ⁰ / ₀	—	—
3 ¹ / ₂ „	1 ¹ / ₂ ⁰ / ₀	60 ⁰ / ₀	—	95 ⁰ / ₀	—	—
4 „	30 ⁰ / ₀	—	75 ⁰ / ₀	100 ⁰ / ₀	—	—
4 ¹ / ₂ „	90 ⁰ / ₀	—	—	—	—	—
5 „	100 ⁰ / ₀	—	—	—	—	—

Man sieht, daß die Zeit, welche erforderlich ist, einen bestimmten Prozentsatz der Eier zur Membranbildung zu veranlassen, um so kürzer ist, je größer die Zahl der Kohlenstoffatome der Säure ist. Dieses Verhalten der Säuren ist analog dem Verhalten der Alkohole, deren narkotische und hämolytische Wirksamkeit ebenfalls für die Glieder derselben Reihe mit der Zunahme

der Zahl der Kohlenstoffatome zunimmt.¹⁾ Bei den Alkoholen ist aber die Zunahme der Wirksamkeit eine viel raschere als die von uns bei den Säuren gefundene, indem nämlich jedes folgende Glied der Reihe ungefähr zwei- bis dreimal so wirksam ist, als das vorausgehende Glied.

Obwohl die Frage nach dem Einfluß der Konzentration der Säuren auf ihre Wirksamkeit nicht streng in unser Thema gehört, so sei doch der Vollständigkeit halber einiges hierüber mitgeteilt. Ich führe zwei Versuchsreihen, eine mit Buttersäure, und eine zweite mit Benzoesäure hier an. Wie gewöhnlich erfolgte die Verdünnung der Säure mit halbgrammolekularer Chlornatriumlösung.

Buttersäure.

Expositions- dauer in	$\frac{3}{5000}^n$	$\frac{5}{5000}^n$	$\frac{6}{5000}^n$	$\frac{7}{5000}^n$	$\frac{8}{5000}^n$	$\frac{10}{5000}^n$
$\frac{1}{2}$ Minute	0	0	0	5%	5%	5%
1 „	0	0	14%	100%	100%	100%
$1\frac{1}{2}$ „	0	48%	95%	—	—	—
2 Minuten	2%	60%	100%	—	—	—
$2\frac{1}{2}$ „	3%	95%	—	—	—	—
3 „	5%	—	—	—	—	—
4 „	30%	—	—	—	—	—
5 „	40%	—	—	—	—	—
6 „	80%	—	—	—	—	—
7 „	90%	—	—	—	—	—

Benzoesäure.

Expositions- dauer in	$\frac{12}{50000}^n$	$\frac{18}{50000}^n$	$\frac{24}{50000}^n$
$\frac{1}{2}$ Minute	0	0	—
1 „	0	$\frac{1}{2}\%$	30%
$1\frac{1}{2}$ „	0	60%	100%
2 Minuten	0	100%	—
3 „	0	—	—
4 „	0	—	—
5 „	0	—	—
6 „	0	—	—
7 „	0	—	—
8 „	0	—	—

¹⁾ Fühner und Neubauer, Hämolyse durch Substanzen homologer Reihen. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm. 56, 333, 1907. — Overton, Studien über Narkose, Jena 1901.

Im allgemeinen ist es nicht möglich, durch Konzentrationen der Buttersäure, die unter $\frac{3}{5000}$ n liegen, eine Membranbildung hervorzurufen. Selbst Konzentrationen von $\frac{3}{5000}$ n Buttersäure sind meist wirkungslos. Hat man aber den Schwellenwert erreicht, so wird auch die optimale Konzentration rasch erreicht. Dasselbe beobachten wir bei der Benzoesäure, nur daß hier der Schwellenwert viel niedriger ist als für Buttersäure, nämlich $\frac{18}{50000}$ n.

Wir wollen, ehe wir weiter gehen, darauf hinweisen, daß der Schwellenwert für die Wirksamkeit einer Säure für die Eier verschiedener Weibchen nicht genau derselbe ist. In meinen Versuchen über die Entwicklungserregung von Seeigeleiern durch das Blutserum von Warmblütern ist es eine stets wiederkehrende Beobachtung gewesen, daß diese Versuche nur bei den Eiern von einem Teil der Weibchen gelingen. Auch die Bastardierung von Seeigeleiern mit dem Samen von Mollusken gelingt nach Kupelwiesers und meinen Versuchen nicht mit den Eiern jedes Weibchens. Die Ursache für diese individuellen Schwankungen suche ich in Variationen der Durchgängigkeit der Eier verschiedener Weibchen für Säuren resp. Blut und Spermatozoen. Auch die Masse der Eier ist von Einfluß. Bringt man zu viele Eier in die Lösung, so reicht die gegebene Säuremenge nicht aus.

Overton gibt an, daß die narkotische Wirkung der zweiwertigen Alkohole eine viel geringere ist als die der einwertigen Alkohole. Ich finde, daß die einbasischen Säuren dieser Reihe eine viel schwächere Wirkung auf die Membranbildung zeigen als die entsprechenden Glieder der Reihe der Säuren der einatomigen Alkohole.

Als Belege seien Versuche mit Oxypropion- und β -Oxybuttersäure mitgeteilt:

Expositionsdauer	Oxypropionsäure		β -Oxybuttersäure		
	$\frac{n}{500}$	$\frac{4n}{500}$	$\frac{n}{500}$	$\frac{2n}{500}$	$\frac{4n}{500}$
1 Minute	0	0	0	5 ^o / _o	100 ^o / _o
2 Minuten	0	2 ^o / _o	0	100 ^o / _o	

Expositionsdauer	Oxypropionsäure		β -Oxybuttersäure		
	$\frac{n}{500}$	$\frac{4n}{500}$	$\frac{n}{500}$	$\frac{2n}{500}$	$\frac{4n}{500}$
3 Minuten	0	60 ^o / _o	8 ^o / _o		
4 „	0	90 ^o / _o			
5 „	0				

Aus einem Vergleich zwischen dieser Tabelle und der vorangehenden geht hervor, daß β -Oxybuttersäure nur ein Viertel der Wirksamkeit der Buttersäure besitzt, und daß die Propionsäure mehr als viermal so wirksam ist, als die Milchsäure. Auch bei den Oxysäuren zeigt sich wieder die Zunahme der Wirksamkeit der Säuren mit der Zahl der Kohlenstoffatome, da die β -Oxybuttersäure viel wirksamer ist, etwa zweimal so wirksam, als die Oxypropionsäure. Ein Vergleich der Mandelsäure mit der Benzoesäure ergab, daß die letztere etwa zehnmal so wirksam ist wie die erstere.

Der Einfluß der Konstitution der Säure wird aber vielleicht am deutlichsten durch einen Vergleich der Wirksamkeit der β -Oxybuttersäure und der Oxyisobuttersäure. Die β -Oxybuttersäure ist mehr als viermal so wirksam wie die Oxyisobuttersäure. Das hängt vielleicht damit zusammen, daß die β -Oxybuttersäure dieselbe Kohlenstoffverkettung hat, wie die Buttersäure, während die Oxyisobuttersäure eine „verzweigte“ Kohlenstoffkette hat.

Die Versuche mit zwei- oder mehrbasischen organischen Säuren bilden eine Geduldprobe, da man nicht mit Sicherheit auf Erfolg rechnen kann. Während Propion-, Butter- und Valeriansäure fast ausnahmslos die Membranbildung bei allen Eiern hervorrufen (vorausgesetzt, daß die Konzentration der Säure und die Expositionsdauer richtig gewählt sind), sind die zwei- und mehrbasischen organischen Säuren nicht bei den Eiern aller Weibchen wirksam. Diese Säuren verhalten sich also der Membranbildung gegenüber wie die artfremden Blutsera. Diese Analogie weist darauf hin, daß die zwei-basischen Säuren deshalb eine geringere Wirksamkeit haben als die einbasischen, weil sie langsamer in das Ei eindringen. Denn offenbar ist der Grad der Durchgängigkeit bei den Eiern verschiedener Weibchen verschieden. In

der nächsten Tabelle stelle ich die mit Oxalsäure, Bernsteinsäure, Weinsäure und Zitronensäure an den Eiern eines besonders „günstigen“ Weibchens gewonnenen Resultate zusammen.

Expositionsdauer,	$\frac{1 \cdot 7}{500}^n$	$\frac{7}{500}^n$	$\frac{7}{500}^n$	$\frac{4}{500}^n$
	Oxalsäure	Bernsteinsäure	Weinsäure	Zitronensäure
1 Minute	0	0	10 ⁰ / ₀	0
2 Minuten	15 ⁰ / ₀	0	100 ⁰ / ₀	0
3 „	20 ⁰ / ₀	0		10 ⁰ / ₀
4 „	90 ⁰ / ₀	0		60 ⁰ / ₀
5 „	90 ⁰ / ₀	2 ⁰ / ₀		80 ⁰ / ₀
6 „				90 ⁰ / ₀

Bei dem Versuch, die hier vorliegenden Verschiedenheiten begreiflich zu machen, müssen wir uns erinnern, wie viele konstitutionelle Variablen hier ins Spiel treten. Wir sahen erstens, daß mit der Zunahme der Zahl der Kohlenstoffatome die Wirksamkeit der Säure zunimmt, zweitens, daß der Eintritt einer HO-Gruppe die entgegengesetzte Wirkung hat, drittens, daß die „geradlinige“ Verkuppelung der Kohlenstoffatome wirksamer ist als die „verzweigte“ (Oxybuttersäure und Oxyisobuttersäure). Alle diese und andere konstitutive Umstände werden wohl bei der Erklärung dieser anscheinend regellosen Säurewirkungen der letzten Tabelle in Betracht kommen. Für eine detaillierte Analyse reicht die Zahl der untersuchten Säuren nicht aus.

Für die Mineralsäuren gilt in noch höherem Grade als für die zweibasischen organischen Säuren die Erfahrung, daß dieselben nur bei den Eiern gewisser, aber nicht aller Weibchen die Membranbildung hervorzurufen imstande sind. Mit Schwefelsäure ist es mir überhaupt bis jetzt noch nicht gelungen, die Membranbildung beim Seeigeli zu veranlassen, mit HNO₃ und mit HCl ging es gelegentlich, aber nicht immer. Die günstigsten Resultate, welche ich mit diesen beiden Säuren je erzielt habe, sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Expositionsdauer	$\frac{n}{500}$ HCl	$\frac{n}{500}$ HNO ₃	$\frac{2n}{500}$ HNO ₃	$\frac{3n}{500}$ HNO ₃
1 Minute	0	0	5 ^o / _o	90 ^o / _o
2 Minuten	0	10 ^o / _o	90 ^o / _o	100 ^o / _o
3 „	$\frac{1}{10}$ ^o / _o	80 ^o / _o	100 ^o / _o	
4 „	10 ^o / _o	90 ^o / _o	100 ^o / _o	
5 „	20 ^o / _o	100 ^o / _o		
6 „	30 ^o / _o			
7 „	80 ^o / _o			
8 „	80 ^o / _o			
9 „	80 ^o / _o			
10 „	90 ^o / _o			

Gewöhnlich aber sind die Resultate mehr von der Art wie die in der nächsten Tabelle wiedergegebenen.

Expositionsdauer	$\frac{15n}{500}$ HCl	$\frac{40n}{500}$ HCl
2 Minuten	0	20 ^o / _o
3 „	$\frac{1}{4}$ ^o / _o	20 ^o / _o
4 „	1 ^o / _o	20 ^o / _o
5 „	5 ^o / _o	$\frac{1}{2}$ ^o / _o
6 „	30 ^o / _o	

Man erhält also das paradoxe Resultat, daß tausendstel normale Buttersäure viel wirksamer für die Hervorrufung der Membranbildung ist, als zwölftel normale Salzsäure! Ein blinder Gegner der Dissoziations- theorie könnte sich kein greifbareres Material wünschen als das hier beigebrachte. Gleichwohl wäre es völlig verfehlt, diese Resultate gegen die Theorie der elektrolytischen Dissoziation zu verwerfen.

Der Widerspruch der hier mitgeteilten Tatsachen mit der Dissoziationstheorie ist nur scheinbar und findet seine Lösung durch die Berücksichtigung folgender zwei Umstände. Erstens kommt für die Hervorrufung der Membranbildung nur die in das Ei eingedrungene Säuremenge in Betracht, und zweitens ist die Geschwindigkeit, mit der die verschiedenen Säuren in das Ei eindringen, eine Funktion ihrer chemischen Konstitution.

Wenn das richtig ist, so sollte uns der Nachweis gelingen, daß die in dieser Arbeit nachgewiesenen Beziehungen zwischen Konstitution und physiologischer Wirksamkeit der Säuren in

Wirklichkeit Beziehungen zwischen Konstitution und Geschwindigkeit der Absorption der Säuren durch das Ei darstellen. Wir wollen zwei Beweise hierfür beibringen, einen indirekten und einen direkten. Der indirekte Beweis liegt darin, daß die Wirksamkeit der homologen Alkohole in Overtons und Fühners und Neubauers und die Wirksamkeit der Fettsäuren in unseren Versuchen analog verlaufen. Nun haben Hans Meyer sowohl wie Overton darauf hingewiesen, daß die Wirksamkeit der Alkohole ihrem Teilungskoeffizienten für Lipoide und Wasser parallel läuft. Die relative physiologische Wirksamkeit der Alkohole muß also in erster Linie durch die relative Geschwindigkeit der Absorption derselben durch die Zelle bedingt sein, und die Analogie drängt auf eine ähnliche Annahme für die Säuren.

Der direkte Beweis ist der folgende. Wenn es wahr ist, daß die schwachen einbasischen Fettsäuren deshalb für die Memranbildung wirksamer sind als die starken Mineralsäuren, weil die ersteren rascher vom Ei absorbiert werden, so muß es sich auch nachweisen lassen, daß die Fettsäuren giftiger für das Ei sind und dasselbe rascher töten als die Mineralsäuren; denn, um das Ei zu töten, müssen die Säuren in das Innere desselben eindringen. Dieser Beweis läßt sich nun sehr leicht in der Weise erbringen, daß man die Eier desselben Weibchens in verschiedene (durch halbgrammolekulare NaCl-Lösung verdünnte) Säuren bringt und bestimmt, wie lange sie in den verschiedenen Säuren bleiben müssen, um ihre Befruchtungs- und Entwicklungsfähigkeit dauernd zu verlieren.

Unbefruchtete Seeigeleier wurden nun in eine $\frac{1}{12}$ n-Lösung von HCl (in halbgrammolekularer NaCl-Lösung) gebracht, und von hier nach Intervallen von je einer halben Minute in normales Seewasser übertragen und eine Probe derselben mit Samen befruchtet. Nur wenige hatten bei der Behandlung mit HCl Membranen gebildet, und diese gingen, wie gewöhnlich, alle zugrunde. Die Eier aber, welche bis zu 3 Minuten in $\frac{n}{12}$ HCl gewesen waren, und keine Membranen gebildet hatten, bildeten auf Samenzusatz Membranen und entwickelten sich zu schwimmenden Larven. Von den Eiern, welche 4 Minuten in der HCl-Lösung gewesen waren (und

die nach der Übertragung keine Membranen gebildet hatten), wurden durch Samen noch 20% zur Entwicklung angeregt und selbst nach 5 Minuten langem Verweilen in der $\frac{n}{12}$ HCl-Lösung wurden noch 10% der Eier durch Samen befruchtet und zur Entwicklung angeregt. Es ist kaum nötig, zu erwähnen, daß geringere Konzentrationen von HCl noch viel ungiftiger waren.

Auch die für die Membranbildung wenig geeigneten zwei-basischen Säuren, wie die Weinsäure, erweisen sich als recht ungiftig für das Ei. So z. B. wurden die Eier eines Seeigels, nachdem sie 4 Minuten in einer $\frac{n}{35}$ Weinsäurelösung gewesen waren, befruchtet und alle entwickelten sich in völlig normaler Weise zu normalen Larven mit alleiniger Ausnahme der wenigen Eier, welche eine Membran infolge der Behandlung mit Weinsäure gebildet hatten, und die wie gewöhnlich zugrunde gingen (wenn sie keine der früher besprochenen Nachbehandlungen erfuhren). Ehe wir uns zu den Versuchen über die Giftigkeit der einbasischen Fettsäuren wenden, muß ich den Leser nochmals daran erinnern, daß die Eier keine Membran bilden, solange sie in der Fettsäurelösung sind, sondern erst, nachdem sie in das (schwach alkalische) Seewasser übertragen sind; und ferner, daß die Membranbildung auch nach der Übertragung in das Seewasser dann ausbleibt, wenn die Eier zu lange in der Fettsäurelösung gewesen waren. In dem Falle dringt nämlich zu viel Fettsäure in das Ei und das letztere kann keine Membran mehr bilden. Die folgende Tabelle gibt eine klare Anschauung über diese Verhältnisse. Als Säure diente die Buttersäure.

Expositionsdauer	$\frac{n}{500}$	$\frac{2n}{500}$	$\frac{3n}{500}$	$\frac{4n}{500}$	Buttersäure
1 Minute	100%	100%	100%	100%	
2 Minuten	100%	100%	10%	10%	
3 „	100%	1%	0	0	
4 „		$\frac{1}{2}$ %	0	0	
5 „		0	0	0	

Man ersieht aus dieser Tabelle, daß die unbefruchteten Seeigeleier nicht mehr imstande sind, eine Membran zu bilden,

wenn sie länger als 2 Minuten in einer $\frac{3n}{500}$ Lösung von Buttersäure (in halbgrammolekularer NaCl-Lösung) verweilen. Fügt man nun zu derartigen Eiern nach der Übertragung in normales Seewasser Samen zu, so wird kein Ei befruchtet und keins entwickelt sich. Ich dachte zuerst, daß es sich um eine umkehrbare Säurewirkung handele und daß die Eier nach längerem Verweilen in Seewasser sich zu erholen imstande wären. Aber das ist nicht der Fall. Zur Kontrolle wurden nun die Eier desselben Weibchens in eine $\frac{n}{50}$ Lösung von HCl gebracht. Die Eier blieben 4 Minuten in der Lösung. Keins bildete nach der Übertragung in normales Seewasser eine Membran. Aber auf Samenzusatz wurden 40% dieser Eier befruchtet und entwickelten sich in völlig normaler Weise. Wir haben gesehen, daß Benzoessäure noch viel günstiger für die Hervorrufung der Membranbildung ist als Buttersäure. Dementsprechend sollten wir auch erwarten, daß es giftiger ist. Das trifft auch zu. Eier wurden in eine $\frac{n}{500}$ Benzoessäurelösung gebracht. Nach je 1 Minute wurde eine Portion der Eier in normales Seewasser übertragen. Die nach 1 Minute aus der Benzoessäure übertragenen Eier bildeten alle eine Befruchtungsmembran. Die Eier aber, welche 3 Minuten oder länger in der Lösung der Benzoessäure verweilt hatten, bildeten keine Membranen. Diese Eier konnten aber auch nicht mehr durch Samen befruchtet werden.

Gegen diese Versuche war nun ein Einwand möglich, nämlich, daß die Eier nicht durch Fettsäure getötet, sondern nur für das Eindringen der Spermatozoen undurchgängig gemacht waren. Um diesen Einwand zu prüfen, wurden Eier zuerst mit Samen befruchtet und dann der Wirkung der erwähnten Säuren ausgesetzt. Befruchtete Eier, welche länger als zwei Minuten in einer $\frac{4}{500}n$ Buttersäurelösung gewesen waren, vermochten sich nach der Übertragung in Seewasser nicht mehr zu entwickeln. Wir dürfen es demnach als sicher ansehen, daß der Einfluß der chemischen Konstitution auf die physiologische Wirksamkeit der Säuren auf die Geschwindigkeit ihres Eindringens in das Ei zurückzuführen ist. (Der letztere Ein-

fluß macht sich vielleicht in dem Sinne geltend, daß mit der Zunahme der Teilungskoeffizienten der Säuren für Öl : Wasser auch die Geschwindigkeit ihrer Absorption in die Eizelle zunimmt.) Eine Idee müssen wir aber bestimmt aufgeben, nämlich, daß die physiologische Wirksamkeit der Säuren durch die Diffusion des Wasserstoffions in das Ei bestimmt ist. Wäre das der Fall, so sollte die Wirksamkeit der Säuren der Konzentration der freien Wasserstoffionen entsprechen, was eben nicht der Fall ist. So liefern diese Versuche auch den Beweis, daß die Säuren in der Form der undissoziierten Moleküle in die Eizelle eindringen. In meinen früheren Veröffentlichungen (1905) war ich bereits zu dem Schluß geführt worden, daß bei der Hervorrufung der Membranbildung durch Säuren nicht die Wasserstoffionen, sondern entweder die Anionen der Säure oder die undissoziierten Säuremoleküle in Betracht kämen. Daß die Anionen der Säuren nicht als solche in das Ei diffundieren, geht daraus hervor, daß der Zusatz der Salze der Fettsäuren, z. B. essigsaures Natron oder buttersaures Natron zum Seewasser, keine Membranbildung veranlaßt. Wir werden später sehen, daß diese Salze nicht ganz unwirksam in dieser Richtung sind, aber die Größenordnung ihrer Wirksamkeit ist gering im Vergleich mit der Wirkung der Säuren. Das beweist, daß die letztere auf der Diffusion der undissoziierten Säuremoleküle beruhen muß.

Es stimmt mit dem Gesagten auch schön überein, daß die Kohlensäure für die Membranbildung besonders wirksam ist; das fand ich schon bei meinen früheren Versuchen¹⁾ und es ist neuerdings von Godlewski bestätigt worden.²⁾ Die Kohlensäure diffundiert bekanntlich sehr leicht in die Zellen.

Man beobachtet nun, daß die Eier bei der Behandlung mit den niederen Fettsäuren keine Membran bilden, während sie in der Säure sind, sondern erst nachdem sie in normales Seewasser übertragen sind. Das gilt für Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Valeriansäure und Capronsäure. Heptylsäure, Caprylsäure, Nonylsäure und Caprinsäure aber verhalten sich anders: Die Eier bilden Membranen, während sie

¹⁾ Loeb, Untersuchungen S. 343.

²⁾ E. Godlewski, Arch. f. Entwicklungsmechanik **26**, 278, 1908.

in der Lösung dieser höheren Säuren sind. Die Erklärung hierfür liegt, glaube ich, in der Tatsache, daß die freien Wasserstoffionen die Membranbildung hemmen und daß die zytolytische Wirkung des undissoziierten Säuremoleküls mit der Zunahme der Zahl der Kohlenstoffatome zunimmt. Daß die Wasserstoffionen die Membranbildung hemmen, läßt sich dadurch zeigen, daß keine Membranbildung stattfindet, wenn man die Eier nach der Buttersäurebehandlung in Seewasser bringt, dem eine kleine Quantität einer Mineralsäure zugesetzt ist. Überträgt man die Seeigeleier nach der Buttersäurebehandlung in 50 ccm Seewasser + 1,5 ccm oder 2 ccm $\frac{n}{10}$ HCl, so findet im allgemeinen keine Membranbildung mehr statt. Wir haben früher erwähnt, daß die Eier Membranen bilden, während sie in benzolhaltigem Seewasser sind; fügt man aber zu diesem Seewasser HCl zu, so findet diese Membranbildung nicht statt.

Wie kommt es, daß die starken Mineralsäuren gelegentlich wirksam sind, während sie meist versagen? Wenn sie wirken, so tritt, wie schon erwähnt, die Membranbildung nicht ein, während die Eier in der sauren Lösung sind, sondern erst nach der Übertragung derselben in normales Seewasser. Es ist möglich, daß die Mineralsäuren die Membranbildung nur indirekt veranlassen, indem sie nämlich zunächst die im Ei enthaltenen Fettsäuren aus ihren Salzen frei machen, und indem dann die so freigemachten Fettsäuren die Membranbildung bedingen. Diese Annahme findet in folgender Beobachtung eine Stütze. Wenn man 2 oder 3 ccm HCl $\left(\frac{n}{10}\right)$ zu 50 ccm Seewasser zusetzt und unbefruchtete Eier in diese Lösung bringt, so bilden die Eier nach der Übertragung in normales Seewasser keine Membranen. Ebensowenig kann man Membranbildung hervorrufen, wenn man zum Seewasser 2 oder 3 ccm $\frac{n}{2}$ Natriumbutyratlösung zusetzt. Setzt man aber beide Stoffe, nämlich HCl und Natriumbutyrat gleichzeitig zum Seewasser, so bilden die Eier nach Übertragung in normales Seewasser Membranen. Dieses Resultat findet seine Erklärung in der Annahme, daß Buttersäure entstanden und in das Ei diffundiert ist. Es ist auch kein Grund anzunehmen, warum eine

ähnliche Reaktion nicht auch eintreten sollte, wenn HCl mit der Oberfläche des Eies in Berührung kommt; es könnte dort eine höhere Fettsäure aus anderweitigen Verbindungen frei machen.

Es sei auch hier erwähnt, daß ein Zusatz einer wenig wirksamen Mineralsäure, z. B. HCl, zur Buttersäure die Wirksamkeit der letzteren nicht beeinflußt. Ich habe viele derartige Versuche angestellt, um zu sehen, inwieweit HCl die Fettsäuren ersetzen kann. Es scheint, daß HCl nur als Ersatz für einen kleinen Betrag der Fettsäure eintreten kann; vielleicht wird etwas Säure durch die Eiweißstoffe des Eies (insbesondere des Chorions) gebunden, und nur dieser Betrag der Fettsäure läßt sich durch HCl ersetzen. Setzt man mehr zu, so verläuft alles genau so, wie wenn nur die betreffende Fettsäure allein in der Lösung wäre. Nur bedingt der Überschuß der H-Ionen, daß das Zusammenfließen der Bläschen bei der Membranbildung nicht so schön erfolgt. Das alles harmoniert mit der Ansicht, daß nicht die Wasserstoffionen, sondern nur die undissoziierte Säure ins Ei diffundiert und daß die Fettsäuren viel rascher diffundieren als die Mineralsäuren.

Wirkt die Säure bei der Hervorrufung der Membranbildung chemisch oder rein physikalisch? Ich habe Herrn Hagedoorn veranlaßt, den Temperaturkoeffizienten bei der Membranbildung durch Säure zu bestimmen. Derselbe ist ungefähr 2 für einen Temperaturunterschied von 10° C, was also auf eine chemische Reaktion hinweist. Die Versuche wurden so angestellt, daß das Minimum der Zeit gemessen wurde, welche die Eier in einer Mischung von 50 ccm Seewasser + $2.5 \text{ ccm } \frac{n}{10}$ Buttersäure verbringen mußten, um bei 95% der Eier die Membranbildung hervorzurufen. Es stellte sich heraus, daß diese Zeit bei 10° C zweimal so lang war als bei 20° C. Weitere Bestimmungen bei anderen Temperaturen bestätigten das Resultat.

XIII. Die Rolle der Hydroxytionen bei und nach der Membranbildung durch Säure.

1. Dem Leser des voraufgehenden Kapitels wird es aufgefallen sein, daß die Eier nicht die Membranen bilden, während sie in der fettsäurehaltigen Lösung sind, sondern erst, nachdem sie wieder in das normale Seewasser übertragen werden. Wir wollen nun zeigen, daß das Alkali des Seewassers bei diesen Vorgängen eine Rolle spielt.

Wenn man man nämlich die Eier nicht aus der Säurelösung in Seewasser, sondern in eine neutrale Mischung von NaCl, KCl und CaCl₂ überträgt, so kommt es zu keiner richtigen Membranbildung, sondern nur zur Bildung einzelner meist kleiner Bläschen an der Oberfläche des Eies. Bringt man die Eier aber in eine alkalische Mischung von NaCl, KCl und CaCl₂, so bilden die Eier richtige Membranen. Die alkalische Reaktion des Seewassers spielt also bei der Membranbildung durch Säurebehandlung eine Rolle.

Die Versuche führten aber noch zu einem andern unerwarteten Resultat. Wenn man die Eier aus der Säurelösung in die neutrale Mischung von NaCl, KCl und CaCl₂ bringt, so tritt weder eine Entwicklung derselben ein, noch kommt es zu einem Zerfall derselben. Dieselben gehen vielmehr in den Ruhezustand zurück, in dem sie durch Samen befruchtet werden können. Ich habe solche Eier noch nach zwei Tagen durch Samen befruchten und zur Entwicklung anregen können. Die Furchung verläuft ganz regelmäßig, ein Beweis, daß die Eier im Ruhezustand sich befanden.

Daß die Eier, wenn sie aus der Säurelösung in die neutrale Mischung von NaCl, KCl und CaCl₂ übertragen werden, im Ruhezustand bleiben, kann auch durch folgenden Versuch gezeigt werden. Bringt man die Eier nach der Behandlung mit Fettsäure in Seewasser oder in eine alkalische Lösung von NaCl, KCl und CaCl₂ (wo dieselben eine vollkommene Membran bilden), so genügt eine kurze Behandlung derselben mit neutraler hypertotonischer Lösung, um alle Eier zur Entwicklung zu Larven zu veranlassen. In einem solchen Versuche war es nur nötig, solche Eier 20 bis 40 Minuten in der

neutralen hypertonen Lösung (50 ccm NaCl + 2,2 ccm KCl + 1,5 ccm CaCl₂, alle $\frac{m}{2}$ + 9 ccm 2¹/₂ n NaCl) zu lassen, um alle Eier zur Entwicklung zu Larven zu veranlassen. Die Eier jedoch, welche aus der Säurelösung in die neutrale Lösung von NaCl, KCl und CaCl₂ gebracht waren, konnten durch die neutrale hypertone Lösung auch in 120 Minuten nicht zur Entwicklung gebracht werden. Auch das zeigt wieder, daß diese Eier im wesentlichen im Zustande der Ruhe sich befanden.

2. Damit ist aber vielleicht die Bedeutung der Hydroxyionen für die Eier mit Membranbildung noch nicht erschöpft. Es läßt sich nämlich zeigen, daß die Behandlung der Eier mit Säure, insbesondere, wenn diese Behandlung zur Membranbildung führt, die Eier entweder durchgängiger für Alkali macht, oder ihre Empfindlichkeit für Alkali erhöht. Zwei einfache schlagende Versuche sollen hierfür angeführt werden.

Bei einem Teile der Eier eines Weibchens wurde die Membranbildung in der gewöhnlichen Weise mittels Buttersäure hervorgerufen. Dann wurden diese Eier, und die intakten, nicht mit Säure behandelten Eier, in je 50 ccm $\frac{n}{2}$ NaCl + 1,0 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO übertragen. Vorher waren die Eier durch Waschen in NaCl-Lösung von allen Spuren von Seewasser befreit worden, was nötig ist, da das Kalzium des Seewassers die Wirksamkeit des Alkalis auf das Seeigelei herabsetzt. Die Eier, welche eine Membran besaßen, waren bereits nach drei Stunden alle getötet und viele waren völlige Schatten. Die Eier, welche nicht mit Buttersäure behandelt waren, waren um diese Zeit alle intakt. Selbst 3 Stunden später waren diese Eier noch intakt, und noch nach 18 Stunden konnten einige derselben mit Samen befruchtet werden. Auch solche Eier, welche mit Buttersäure behandelt waren, aber nicht lange genug, um eine Membranbildung zu veranlassen, litten viel rascher unter der Alkalibehandlung, als die nicht vorher mit Säure behandelten Eier.

Ich hatte schon früher mitgeteilt, daß befruchtete Eier rascher durch Natronlauge zytolysiert werden, als unbefruchtete.

Ich untersuchte neuerdings, ob befruchtete Eier und Eier, bei denen eine Membranbildung durch Buttersäure hervorgerufen war, gleich rasch durch Alkali zytolisiert wurden. Ich fand, daß die befruchteten Eier etwas rascher der Alkalizytolyse verfallen, als die Eier, bei denen man eine Membranbildung durch Buttersäure hervorgerufen hat.

Der zweite Nachweis, daß Säurebehandlung der Seeigeleier deren Durchgängigkeit oder Empfindlichkeit gegen Alkali erhöht, war von mir bereits im Jahre 1900 in meiner ersten ausführlichen Mitteilung über künstliche Parthenogenese mitgeteilt worden.¹⁾ Unbefruchtete Seeigeleier (*Arbacia*) wurden in Seewasser gebracht, dessen Alkalinität man durch Zusatz von Kalilauge erhöht hatte, nämlich in 100 ccm Seewasser + 1,0 ccm $\frac{n}{10}$ KHO. Nach etwa 5 Stunden fing fast jedes Ei an sich zu furchen, aber die Entwicklung ging nicht über die ersten Zellteilungen hinaus, und die Eier litten unter diesen Bedingungen. Ein zweiter Teil der Eier desselben Weibchens wurde in Seewasser gebracht, das durch Zusatz von HCl sauer gemacht war. (100 ccm Seewasser + 2 ccm $\frac{n}{10}$ HCl). Sie blieben aber in dieser Lösung nur etwa 10 Minuten und wurden dann in normales Seewasser zurückgebracht. Nach etwa 5 Stunden fingen viele dieser Eier an sich zu furchen. Aber auch hier ging die Furchung nicht weiter wie bei der vorhin erwähnten Behandlung der Eier mit hyperalkalischem Seewasser. Dieser Versuch beweist, daß, wenn man unbefruchtete Seeigeleier kurze Zeit mit Säure behandelt, die geringe Konzentration der HO-Ionen im Seewasser ebenso wirksam wird, wie eine viel höhere Konzentration der Hydroxylionen, wenn die Eier nicht mit Säure vorbehandelt sind. Die Säurebehandlung der Eier erhöht also die Empfindlichkeit oder die Durchgängigkeit derselben für Alkali.

3. Wie ist aber eine solche Wirkung der Säure möglich? Das Seeigelei (und überhaupt jedes Ei) ist, wenn es aus dem Eierstock kommt, mit einem Chorion, d. h. einer aus dem Eierstock stammenden Auflagerung umgeben, die erst quellen

¹⁾ Loeb, Untersuchungen S. 103.

muß, ehe ein Spermatozoon sie durchdringen und an die Oberfläche des Eies gelangen kann. Herr Elder hat vor kurzem im hiesigen Laboratorium gefunden, daß dieses Chorion des Seeigeleies (das im Seewasser langsam quillt), durch Säure rasch quillt und aufgelöst wird.

Es ist nun denkbar, daß das Eizytoplasma an seiner Oberfläche eine Substanz enthält, welche die Diffusion von Alkalimolekülen in das Ei in ähnlicher Weise erschwert, wie das Chorion die Diffusion, oder wie wir in diesem Falle richtiger sagen, die Bewegung der Spermatozoen zu dem Ei erschwert. Wenn nun diese Substanz dem Chorion darin gleicht, daß sie durch Säure rasch zur Quellung oder Lösung gebracht wird, so können wir verstehen, warum das Alkali so viel stärker auf das Ei wirkt, nachdem dasselbe mit Säure behandelt ist,

Da aber die Membranbildung durch das Spermatozoon diese Empfindlichkeit oder Durchgängigkeit des Eies für Alkali ebenfalls oder noch mehr erhöht als die Säurebehandlung, so ergibt sich eine neue Möglichkeit für das Verständnis des Wesens der Entwicklungserregung. Das mit Samen befruchtete Ei kann sich nur unter zwei Bedingungen entwickeln. Es muß erstens freien Sauerstoff in genügender Menge erhalten, und zweitens müssen HO-Ionen wenigstens am Anfang der Entwicklung in das Ei eindringen. Es ist wahrscheinlich, daß zwischen beiden Bedingungen ein Zusammenhang besteht, insofern als die Hydroxylionen für die Oxydationen nötig sind. Wir können geradezu sagen, daß die Ermöglichung der Oxydationen im Ei das Wesen der Entwicklungserregung bildet. Sollte es möglich sein, daß das ruhende unbefruchtete Ei eine Substanz enthält, welche die Diffusion von Sauerstoff und Alkali (und möglicherweise noch anderer Stoffe) in das Ei fast unmöglich macht oder doch erschwert, und daß diese Substanz erst zur Quellung und Lösung gebracht werden muß, ehe diese Diffusion in einem für die Entwicklung ausreichendem Maße erfolgen kann? Die Quellung und Lösung dieser Substanz würde zur Membranbildung führen, und damit wäre der sonst rätselhafte Zusammenhang zwischen Membranbildung und Entwicklungserregung zum Teil wenigstens erklärt. Wir wissen, daß die Oxydationen im unbefruchteten Ei sehr viel schwächer sind als im befruchteten Ei. Die Tatsachen der künstlichen Parthenogenese beweisen ferner, daß das Ei alle

für seine Entwicklung nötigen Stoffe besitzt. Wäre es nun nicht denkbar, daß die Entwicklungserregung zum Teil wenigstens darin besteht, daß sie das Ei für den Sauerstoff und die Hydroxyionen resp. Alkalimoleküle in genügender Weise durchgängig macht? Das Alkali könnte zwei Zwecken dienen, nämlich erstens die Oxydationen befördern und zweitens gewisse Spaltungen beschleunigen.

4. Ein einfacher Versuch zeigt jedoch, daß das unbefruchtete Ei sehr durchgängig für Hydroxyionen sein muß. Bringt man unbefruchtete Eier des Seeigels kurze Zeit (etwa 5 Minuten) in die früher erwähnte alkalische Chlornatriumlösung, und befruchtet man die Eier unmittelbar nach ihrer Übertragung in Seewasser mit Samen, so tötet man damit die meisten dieser Eier. Die Spermatozoen dringen in die Eier ein, und die Kernteilung beginnt in denselben, aber nur wenige entwickeln sich bis zum Blastulastadium, die meisten gehen rasch zugrunde, ohne sich zu furchen. Fügt man aber den Samen erst zu, nachdem die Eier etwa eine Stunde in dem normalen Seewasser gewesen sind, so entwickeln sich alle Eier in normaler Weise. Man muß deshalb wohl annehmen, daß in der hyperalkalischen Chlornatriumlösung schon in wenigen Minuten große Mengen Hydroxyionen in das Ei dringen. Wenn es dann in Seewasser übertragen und hier sofort befruchtet wird, ehe die Hydroxyionen wieder Zeit haben, in das Seewasser zu diffundieren, so wird es meist getötet. Wartet man aber mit dem Samenzusatz, bis die Hydroxyionen aus dem Ei diffundiert sind, und die Eier wieder ihre normale Beschaffenheit angenommen haben, so entwickeln sie sich alle in ganz normaler Weise.

Wenn aber das unbefruchtete Ei für die Hydroxyionen (oder Alkalimoleküle) leicht durchgängig ist, so müssen wir fragen, wie es kommt, daß die künstliche Membranbildung (oder die Befruchtung) die Empfindlichkeit des Eies gegen Hydroxyionen erhöht. Darauf lautet die Antwort, daß die künstliche Membranbildung und die Befruchtung die zur Entwicklung nötigen Oxydationen im Ei auf eine uns noch unbekanntere Weise entfesseln oder ermöglichen. Da nun die Hydroxyionen ebenfalls beschleunigend auf die Oxydationen wirken, so müssen durch einen Überschuß von Hydroxyionen die Oxydationen

im befruchteten Ei rascher über das mit dem Leben verträgliche Maß gesteigert werden, als im unbefruchteten Ei. Die Richtigkeit dieser Annahme läßt sich durch einen eklatanten Versuch dartun. Wenn man nämlich die oxydative Wirkung der hyperalkalischen Chlornatriumlösung auf das befruchtete Ei durch Zusatz von etwas Zyankalium hemmt, so verringert man die Giftigkeit der hyperalkalischen Lösung und die befruchteten Eier bleiben in der hyperalkalischen Lösung ungefähr ebensolange am Leben, wie die unbefruchteten Eier desselben Weibchens.

Wir kommen also zu dem Schluß, daß die Hydroxytionen des Seewassers auch in das unbefruchtete Ei diffundieren, und daß die Membranbildung die Oxydationen im Ei nicht dadurch steigert, daß sie die Durchgängigkeit desselben für Hydroxytionen erhöht, sondern daß sie die für die Entwicklung nötigen Oxydationen auf anderem Wege entfesselt oder möglich macht. Für die Entwicklung des Eies, resp. für die der Entwicklung zugrunde liegenden Oxydationen ist es aber nötig, daß das umgebende Medium eine schwache alkalische Reaktion hat.

XIV. Die Entwicklungserregung des Seeigeleies durch Alkalien.

Wir haben in einem früheren Kapitel gezeigt, daß die ursprüngliche Methode der Entwicklungserregung des Eies durch hypertonsche Lösungen in Wirklichkeit eine Kombination von zwei Variablen war, nämlich hypertonscher Lösung und Konzentration der Hydroxytionen.¹⁾ Nur wenn die Lösung alkalisch war, erwies sich die hypertonsche Lösung als wirksam. Es lag nahe zu vermuten, daß die beiden Agenzien sich zeitlich trennen lassen, und daß die Hydroxytionen ähnlich wie die Fettsäuren wirken. Diese Vermutung bestätigte sich auch. Nur ist die Analogie nicht ganz vollkommen. Die Membranbildung erfolgt selten durch die Behandlung mit Alkali allein. Wenn man aber die Eier erst mit Alkali behandelt und dann mit hyper-

¹⁾ Loeb, Zur Analyse der osmotischen Entwicklungserregung unbefruchteter Seeigeleier, Pflügers Arch. 118, 181, 1907.

tonischem Seewasser, so bildet sich oft eine Membran. Dieselbe liegt dem Zytoplasma oft sehr dicht an. Aber das letztere beobachten wir auch, wenn wir Eier, die 24 bis 48 Stunden in Seewasser gelegen haben, mit Samen befruchten.

Wir wollen zunächst zeigen, daß die beiden Variablen, hypertonische Lösung und Alkali, sich zeitlich bei diesen Versuchen trennen lassen.

Die Eier eines Weibchens wurden in eine neutrale hypertonische Lösung gebracht (50 ccm $\frac{m}{2}$ van't Hoff'sche Lösung + 10 ccm $2\frac{1}{2}n$ NaCl), nachdem sie vorher durch Waschen in $\frac{m}{2}$ NaCl von Seewasser befreit waren. Die Temperatur war 14° C. Nach 70, 100, 130 und 170 Minuten wurde je eine Portion der Eier in 50 ccm Seewasser + 1,5 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO gebracht, und von hier Proben nach verschiedenen Intervallen, 40 bis 160 Minuten, in normales Seewasser zurückgebracht. Von den Eiern, welche nur 70 Minuten in der hypertonischen Lösung gewesen waren, entwickelte sich keines zur Larve, trotz der Behandlung mit hyperalkalischem Seewasser. Dagegen ergaben die Eier, welche 130 und 170 Minuten in der hypertonischen Lösung und dann in hyperalkalischem Seewasser gewesen waren, positive Resultate, d. h. es entwickelte sich ein sehr großer Prozentsatz zum Teil vollkommener Larven. Die Tabelle gibt eine Übersicht über das Resultat. Die linke vertikale Reihe gibt die Expositionsdauer in der hypertonischen Lösung, die obere horizontale Reihe die Expositionsdauer im hyperalkalischen Seewasser.

Expositionsdauer in der hyperton. van't Hoff'schen Lösung	Expositionsdauer im hyperalkal. Seewasser in Minuten				
	40	70	100	130	160
70 Minuten . .	0	0	0	0	0
100 „ . .	0	0	0	0	0
130 „ . .	0	{ einige Larven }	2 Larven	2 Larven	
170 „ . .	zahlreiche Larven	zahlreiche Larven	zahlreiche Larven	zahlreiche Larven	zahlreiche Larven

Von den Eiern, die nur mit der hypertotonischen Lösung behandelt waren, ohne nachher dem hyperalkalischen Seewasser ausgesetzt zu werden, entwickelte sich keins zu einer Larve.

In diesem Falle ging die Behandlung der Eier mit der hypertotonischen Lösung derjenigen mit dem hyperalkalischen Seewasser voran. Kehrt man die Ordnung um und behandelt man die Eier erst mit der alkalischen Lösung und dann mit der hypertotonischen Lösung, so wird die Dauer der Einwirkung der letzteren erheblich verringert. Das entspricht ganz der Erfahrung, die wir bei der Membranbildung durch Säure machten. Ruft man zuerst die Membranbildung durch eine Säure hervor, so braucht man die Eier hinterher nur etwa $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde dem hypertotonischen Seewasser auszusetzen; bei der umgekehrten Reihenfolge müssen die Eier $1\frac{1}{2}$ bis 2 Stunden der hypertotonischen Lösung ausgesetzt werden, um sich entwickeln zu können, und auch dann ist die Entwicklung nicht so schön, wie bei der umgekehrten Reihenfolge.

Zu je 50 ccm einer mit Seewasser isotonischen (halbgramm-molekularen) van't Hoff'schen Lösung (NaCl , KCl , CaCl_2) wurde 0, 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zugesetzt. Die Eier eines Weibchens wurden in diese Lösungen verteilt und 175 Minuten in denselben gelassen. Dann wurden sie in eine neutrale hypertotonische Lösung, nämlich 50 ccm van't Hoff'sche Lösung + 10 ccm $2\frac{1}{2}$ norm. NaCl gebracht, und von hier nach 35 und 50 Minuten in normales Seewasser übertragen. Die Temperatur war 14°C . Die Eier, welche in der neutralen isotonischen van't Hoff'schen Lösung gewesen waren, fürchteten sich weder, noch entwickelten sie sich. Eine Portion dieser Eier blieb $2\frac{3}{4}$ Stunden in der neutralen hypertotonischen Lösung, ohne daß eine Spur einer Entwicklung eintrat. Bei den Eiern dagegen, welche nach der Behandlung mit der alkalischen van't Hoff'schen Lösung 35 resp. 50 Minuten in die hypertotonische Lösung gebracht wurden, trat eine Entwicklung zu Larven ein, aber nur bei solchen Eiern, die infolge der Behandlung mit alkalischen Lösungen eine Membran bildeten. Der Zusatz von 0,5 und 1,0 ccm NaHO gab gute Resultate, 1,5 und 2,0 ccm NaHO schädigte die Eier; vielleicht würden auch diese Lösungen gute

Resultate gegeben haben, wenn die Eier nicht so lange darin verweilt hätten.¹⁾

Um nun die weitere Analogie in der Wirkung von Fettsäure und Alkali klar zu machen, sei erwähnt, daß auch in den Versuchen mit Alkali die hypertonische Lösung nur dann wirksam ist, wenn sie freien Sauerstoff in genügender Menge enthält. Vertreibt man den Sauerstoff in der hypertonischen Lösung durch chemisch reinen Wasserstoff, so bleibt die hypertonische Lösung wirkungslos. (In diesen Versuchen wurde, wie in allen früheren derselben Art, der Wasserstoff aus chemisch reinem Zink und chemisch reiner Schwefelsäure mit Platin- oder Goldchlorid als Katalysator dargestellt. Der H wurde gründlich in konzentrierter Kalilauge und übermangansaurem Kali gewaschen und wurde durch Waschflaschen geleitet, welche Neutralrot enthielten; es wurde so festgestellt, daß der Wasserstoffstrom absolut frei von Säure war.)

„Eine Mischung von 100 ccm neutraler van't Hoff'scher Lösung + 20 ccm $2\frac{1}{2}$ norm. NaCl wurde in zwei Flaschen verteilt. Die eine wurde mit dem Wasserstoffapparat verbunden und in der vorhin beschriebenen Weise von Sauerstoff befreit, die andere Flasche blieb in Berührung mit Luft. Dann wurden die unbefruchteten Eier eines Weibchens, die vorher in der van't Hoff'schen Lösung gewaschen waren, in beide Flaschen verteilt und $2\frac{1}{2}$ Stunden in denselben gelassen. Die Temperatur war 13° C. Hierauf wurde je eine Probe der Eier zur Kontrolle direkt in normales Seewasser übertragen. Von den Kontrolliern, die in der sauerstoffhaltigen hypertonischen Lösung gewesen waren, fingen viele an sich zu furchen; die Furchung ging aber nicht über die ersten Stadien (zwei oder vier Zellen). Die Eier, welche in der sauerstofffreien hypertonischen Lösung gewesen waren, furchten sich nicht und behielten alle ihr normales Aussehen.

Eine zweite Probe der Eier wurde aus der hypertonischen Lösung nicht in Seewasser, sondern in 50 ccm Seewasser + 1,5 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO gebracht und blieb in dieser Lösung 110 Minuten,

¹⁾ Loeb, Über die allgemeinen Methoden der künstlichen Parthenogenese, Pflügers Arch. 118, 572, 1907 und „Über den chemischen Charakter des Befruchtungsvorganges und seine Bedeutung für die Theorie der Lebenserscheinungen“. Leipzig 1908.

ehe sie in normales Seewasser übertragen wurde. Der Unterschied im Verhalten der Eier, welche in der hypertonen Lösung mit Sauerstoff und derjenigen ohne Sauerstoff gewesen waren, war diesmal äußerst auffallend. Von den letzteren entwickelte sich kein Ei, und alle blieben am Leben; von den ersteren entwickelte sich eine große Zahl zu schwimmenden Larven, und diejenigen, welche sich nicht zu Larven entwickelten, gingen im Laufe von 24 Stunden an schwarzer Zytolyse zugrunde.

Nachdem die eben erwähnten zwei Proben aus der hypertonen Lösung genommen waren, wurde die hypertone Lösung, welche bis dahin dem Wasserstoffstrom ausgesetzt war, vom Wasserstoffapparat getrennt und der Berührung mit Luft ausgesetzt. Ein Teil der Eier war in der Lösung geblieben, und nachdem dieselben dann noch weitere 105 Minuten in der hypertonen Lösung, die aber nunmehr freien Sauerstoff enthielt, geblieben waren, wurden sie in 50 ccm + 1,5 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO und von hier 2 Stunden später in normales Seewasser übertragen. Diese Eier bildeten eine große Zahl von schwimmenden Larven.

Dieses Resultat wurde in fünf weiteren Versuchsreihen bestätigt, und es ergab sich ohne Ausnahme, daß die hypertone Lösung auch bei diesem Ersatz der Fettsäure durch Alkali nur dann wirkt, wenn freier Sauerstoff zugegen ist. Von den übrigen Beobachtungen ist vielleicht noch die folgende von Interesse. Die unbefruchteten Eier eines Weibchens wurden, wie in den vorausgehenden Versuchen, in zwei Flaschen gebracht, von denen jede 50 ccm van't Hoff'sche Lösung + 10 ccm $2\frac{1}{2}$ norm. NaCl enthielt. In der einen war die Luft vorher durch H vertrieben worden, während die andere in Berührung mit der Luft blieb. Die Eier blieben 2 Stunden in der hypertonen Lösung und wurden darauf 2 Stunden in eine lufthaltige Lösung von 50 ccm Seewasser + 1,5 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO gebracht und dann in normales Seewasser übertragen. Von den Eiern, welche in der sauerstoffhaltigen hypertonen Lösung gewesen waren, entwickelten sich etwa 5% zu schwimmenden Blastulen, während der Rest an schwarzer Zytolyse zugrunde

ging. Die in der hypertonen sauerstofffreien Lösung gewesenen Eier blieben intakt, sie furchten sich nicht, bildeten keine Larven und gingen nicht zugrunde. Um mich nun zu überzeugen, daß diese Eier in Wirklichkeit und nicht bloß dem Aussehen nach intakt waren, wurde am nächsten Tage zu einer Portion derselben frischer Samen zugefügt. Alle Eier bildeten eine Befruchtungsmembran, furchten sich regelmäßig und entwickelten sich zu normalen Pluteen. Sie waren also in der Tat normal.

Fügt man zu solchen Eiern den Samen unmittelbar oder sehr bald nach dem Aufenthalt in sauerstofffreier Lösung, so entwickeln sie sich nicht so schön. Der Aufenthalt in sauerstofffreien Medien ist für die Eier nicht harmlos, worauf ich schon früher hingewiesen habe, und es dauert einige Zeit, ehe sie sich von den Folgen des Sauerstoffmangels völlig erholen.“¹⁾

Wir haben gesehen, daß die membranbildende Wirkung der Buttersäure nicht an die Gegenwart von freiem Sauerstoff gebunden ist. Es war nun von Interesse festzustellen, ob das gleiche auch für die Alkaliwirkung gilt. Das ist aber nicht der Fall. Die Wirkung der hyperalkalischen Lösung ist bei dieser Methode der künstlichen Parthenogenese an die Gegenwart von freiem Sauerstoff gebunden. Die unbefruchteten Eier eines Weibchens wurden 2 Stunden lang in 50 ccm van't Hoffsche Lösung + 10 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl gebracht und dann in zwei Flaschen mit je 50 ccm Seewasser + $1,5 \frac{n}{10}$ NaHO verteilt. Eine der beiden Flaschen war frei von Sauerstoff. Die Eier wurden absichtlich länger als nötig, nämlich 3 Stunden, in diesen hyperalkalischen Lösungen gelassen. Die Folge war, daß fast alle Eier, die in dem lufthaltigen hyperalkalischen Seewasser gewesen waren, an schwarzer Zytolyse im Laufe der nächsten 24 Stunden zugrunde gingen und nur sehr wenige sich zu Larven entwickelten. Die Eier dagegen, die in dem luftfreien hyperalkalischen Seewasser gewesen waren, blieben alle intakt, d. h. sie gingen nicht zugrunde und entwickelten sich nicht. Sie verhielten sich ungefähr wie die Eier, die 2 Stunden lang der hypertonen Lösung ausgesetzt gewesen waren und

¹⁾ Loeb, Weitere Versuche über die Notwendigkeit von freiem Sauerstoff für die entwicklungserregende Wirkung hypertoner Lösungen, Pfügers Arch. 118, 30, 1907.

dann direkt in normales Seewasser übertragen wurden. Auch diese Eier blieben intakt, sie gingen nicht zugrunde, und sie entwickelten sich nicht. Nur wenige gingen ins Zweizellstadium, ohne sich jedoch weiter zu entwickeln.

Um nun zu ermitteln, ob die letzteren Eier, die in dem hyperalkalischen, luftfreien Seewasser gewesen waren, in der Tat normal waren, wurde eine Portion derselben nach der Herausnahme aus der hyperalkalischen Lösung mit Samen befruchtet. Fast alle Eier entwickelten sich zu Larven, und der Erfolg würde wohl noch besser gewesen sein, hätte man den Samen etwas später zugesetzt, nachdem die Eier sich von der Wirkung des Sauerstoffmangels vollständig erholt hatten.

Man hätte nun denken können, daß in dem vorhin geschilderten Versuche die Eier nur deshalb intakt blieben, weil etwa durch die vorübergehende Sauerstoffentziehung die Wirkung der hypertonen Lösung rückgängig gemacht war. Daß das aber nicht der Fall war, wurde durch folgenden Versuch festgestellt. Nicht alle Eier wurden nach 3 Stunden aus dem luftfreien, hyperalkalischen Seewasser in normales Seewasser übertragen. Ein Teil der Eier blieb in dem hyperalkalischen Seewasser: das letztere wurde aber nunmehr der Luft ausgesetzt. 1 $\frac{1}{2}$ Stunde später wurde eine Portion dieser Eier in normales Seewasser übertragen. Viele dieser Eier fürchteten sich, und 1 $\frac{0}{6}$ derselben entwickelte sich zu Larven.¹⁾

In dem Umstand, daß für die Wirkung von Alkali Sauerstoff nötig ist, unterscheidet sich die Alkaliwirkung von der Säurewirkung; für die Wirkung der Buttersäure ist, wie schon wiederholt erwähnt, die Wirkung von freiem Sauerstoff unnötig. Vielleicht wirkt das Alkali nur indirekt, indem es nämlich nur die Oxydationen beschleunigt und auf diese Weise vielleicht zur Bildung einer Säure oder einer sonstigen zytolytisch wirkenden Substanz führt. Diese Annahme würde es auch erklären, warum das Alkali so viel länger wirken muß als die Säure.

Bei der Kombination, Alkali und hypertone Lösung, bilden die Eier nicht selten eine dicht anliegende Membran und gelegentlich auch normale Befruchtungsmembranen. Es ist merkwürdig, daß gerade diejenigen Eier, welche bei dieser

¹⁾ Loeb, l. c.

Behandlung solche Membranen bilden, sich immer zu Larven entwickeln, während häufig die Eier, welche keine Membranen bilden, nur die ersten Furchungen durchlaufen und dann sich nicht weiter entwickeln. Wenn man zu solchen Eiern Samen zusetzt, so bilden sie eine Befruchtungsmembran. Wir werden darauf später zurückkommen.

XV. Über den Mechanismus der Entstehung der Befruchtungsmembran.

Die bisher mitgeteilten Versuche haben bereits die Bedeutung des Membranbildungsprozesses dargetan, und weitere Tatsachen in derselben Richtung werden in späteren Kapiteln angegeben werden. Dieser Prozeß, den man früher für etwas Nebensächliches angesehen hatte, stellt sich demnach als der wesentliche Akt bei der Entwicklungserregung heraus. Wir wollen nunmehr versuchen, einige weitere Daten über den Mechanismus dieses Vorgangs zu erlangen.

Wir gehen der Einfachheit wegen zunächst von der Annahme aus (die vielleicht später zu modifizieren sein wird), daß das unbefruchtete Ei bereits von einer Oberflächenlamelle umgeben ist, die sich daselbst nach dem Prinzip von Gibbs oder nach den Ansichten von Quincke bilden muß. Diese Lamelle erfährt bei der Befruchtung oder bei der Behandlung des Eies mit einer Fettsäure oder mit Saponin usw. eine Modifikation; sie wird dicker und undurchgängiger. Diese letztere Annahme ist notwendig, weil die Befruchtungsmembran das Eindringen von Spermatozoen in das Ei hindert, während, wie wir später sehen werden, Spermatozoen selbst in die einzelnen Furchungszellen eines ohne Membranbildung zur Furchung gebrachten Eies dringen können.

Die Analyse des Mechanismus der Bildung der Befruchtungsmembran beginnen wir mit der Frage, woher die Flüssigkeit stammt, welche zwischen der Membran und dem Zytoplasma liegt (Fig. 2, Kap. I). Handelt es sich hier um eine aus dem Ei gepreßte Flüssigkeit oder um eine Flüssigkeit, die von außen eingedrungen ist? Wenn es sich nur um eine Sekretion von

seiten des Eies handelte, so sollte der Durchmesser des Zytoplasmas nach der Membranbildung eine Abnahme erfahren. Messungen, welche ich anstellte, ergaben aber, daß bei der Membranbildung das Eizytoplasma keine merkliche Verringerung seines Volumens erfährt. Der wesentliche Betrag der Flüssigkeit, die zwischen dem Zytoplasma und der Membran liegt, muß also von außen, d. h. aus dem Seewasser stammen. Welche Vorstellung müssen wir uns dann über die Entstehung der Befruchtungsmembran bilden?

Die Antwort darauf geben einige Versuche über die osmotischen Eigenschaften der Membran. Im vorigen Jahre machte Herr Dr. E. v. Knafl-Lenz im hiesigen Laboratorium die Beobachtung, daß, wenn man dem Seewasser etwas Blutserum des Kaninchens zusetzt, die Befruchtungsmembran der Seeigelei anscheinend zum Verschwinden gebracht wird.¹⁾ Ich untersuchte die Erscheinung des näheren und fand, daß die Membran wieder vollständig hergestellt wird, wenn man die Eier in normales Seewasser zurückbringt. Es handelte sich also in der Beobachtung von v. Knafl lediglich um ein Kollabieren der Membran in dem serumhaltigen Seewasser, aber nicht um eine Auflösung derselben.²⁾

Dieses Kollabieren wird durch die Annahme verständlich, daß die Membran für Seewasser durchgängig, für die Eiweißkörper des Serums aber undurchgängig ist. Üben nun diese Eiweißkörper einen osmotischen Druck aus, so muß durch den Zusatz von Blutserum zum Seewasser ein osmotischer Überdruck in dem letzteren entstehen, der zum Herausdiffundieren der zwischen der Membran und dem Zytoplasma befindlichen Flüssigkeit führt: dadurch kollabiert die Membran.

Die Richtigkeit dieser Ansicht wird erstens dadurch bewiesen, daß jede beliebige andere kolloidale Substanz ebenso das Kollabieren der Membran bewirkt, wie der Zusatz von Blutserum, z. B. der weiße Dotter des Hühnereies, oder Gerbsäure. Zweitens läßt sich zeigen, daß die Befruchtungsmembran für

¹⁾ E. v. Knafl-Lenz, Über die Beziehungen zwischen Lipoidverflüssigung und Zytolyse. Pflügers Arch. **123**, 279, 1908.

²⁾ Loeb, Über die osmotischen Eigenschaften und die Entstehung der Befruchtungsmembran beim Seeigelei, Arch. f. Entwicklungsmechanik **26**, 82, 1908.

Seewasser ziemlich leicht durchgängig ist. Wenn man nämlich das Seewasser durch den Zusatz von destilliertem Wasser verdünnt, oder wenn man seine Konzentration durch den Zusatz von NaCl erhöht, so ändert sich nur der Durchmesser des Zytoplasmas, während der Durchmesser der Befruchtungsmembran unverändert bleibt. Das beweist, daß nur das Protoplasma die Erscheinung der Semipermeabilität zeigt, während die Befruchtungsmembran für Salze ziemlich leicht durchgängig ist.¹⁾

Diese Daten geben uns den Schlüssel für das Verständnis des Mechanismus der Membranbildung beim Ei. „Die Befruchtungsmembran hat eine vollkommene Kugelform. Das beweist, daß die Membran im Zustand der Spannung ist. Da nun die Versuche, welche wir erwähnt haben, beweisen, daß die Befruchtungsmembran bei *Strongylocentrotus* für Seewasser leicht durchgängig ist, so muß im Membranraum ein osmotischer Überdruck herrschen, welcher der Spannung der Membran das Gleichgewicht hält. Diesen Überdruck muß eine aus dem Ei stammende vermutlich kolloidale Substanz liefern, welche im Membranraum enthalten ist, und welche nicht imstande ist, durch die Membran zu diffundieren. Die Existenz einer solchen kolloidalen, nicht diffundierbaren Substanz im Membranraum erklärt auch die früher erwähnte Tatsache, daß die durch Serumzusatz zum Seewasser zum Kollabieren gebrachte Membran wieder hergestellt wird und ihren normalen Spannungszustand erhält, wenn man das Ei in normales Seewasser zurückbringt. Durch diese Annahme können wir auch eine andere Tatsache verstehen lernen, daß nämlich eine gewisse Menge Serum oder Eiweiß dem Seewasser zugesetzt werden muß, ehe die Membran zu kollabieren beginnt.“²⁾

Was folgt hieraus für die Entstehung der Membran? Wie wir schon im ersten Kapitel erwähnten, kann man beim langsamen Verlauf der Membranbildung beobachten, daß der Anfang dieses Prozesses in einem Rauwerden der Oberfläche des Eies besteht, und daß dieses Rauwerden durch die Bildung zahlreicher winziger Bläschen bedingt ist. Diese Bildung von

¹⁾ Die Membran scheint bei verschiedenen Formen der Seeigel verschieden leicht durchgängig zu sein, so daß andere Formen ein quantitativ vielleicht etwas anderes Verhalten zeigen könnten.

²⁾ Loeb, l. c.

Bläschen scheint mir nun (im Zusammenhang mit den osmotischen Eigenschaften der Membran) darauf zu beruhen, daß eine kolloide Substanz, welche unter der Oberflächenlamelle liegt, plötzlich quillt (durch Absorption von Seewasser) und schließlich verflüssigt wird. Da die Oberflächenlamelle des Eies für Seewasser durchgängig ist, so genügt das, um die Bläschenbildung und die Bildung der Befruchtungsmembran zu bedingen. Gleichzeitig ändert sich auch die Beschaffenheit der Oberflächenlamelle, indem dieselbe dicker und für die Spermatozoen undurchgängig wird.

Wir können nun die hier angenommene Quellung und Verflüssigung einer vorher festen kolloidalen Substanz im Seeigeelei nicht direkt beobachten. Wir können aber diese Lücke durch Beobachtungen über die Reifung an den Eiern gewisser Mollusken und Anneliden ausfüllen. Fig. 34 gibt ein Bild eines unreifen Molluskeneies, nämlich des Eies von *Lottia gigantea*. In diesem Zustand kann das Ei nicht durch ein Spermatozoon befruchtet werden. Dasselbe hat eine regelmäßige Kontur, die dadurch bedingt ist, daß dieses Ei mit einer festen Membran, dem sogenannten Chorion, umgeben ist. Wird diese Membran entfernt, so nimmt das Ei Kugelform an (Fig. 36). Die Mittel nun, welche die Membranbildung beim Seeigeelei veranlassen, bedingen auch die Beseitigung des Chorions bei *Lottia*, und wir sind daher hier in der Lage, die Wirkung der membranbildenden Mittel direkt zu beobachten. Wenn wir ein unreifes Ei von *Lottia* in 5 ccm Seewasser bringen, dem wir etwa sechs Tropfen einer $\frac{1}{4}$ prozentigen Lösung von Saponin (in Seewasser) zugesetzt haben, so geht in etwa 4 Minuten das Ei aus dem in Fig. 34 gezeichneten Zustand in den in Fig. 35 gezeichneten über, und in etwa weiteren 4 Minuten ist das Chorion ganz geschwunden und das Ei kugelförmig geworden. Wie ein Vergleich der Figuren 34 und 35 zeigt, hat das Saponin bewirkt, daß das Chorion im Seewasser durch Imbibition stark quillt und schließlich verflüssigt wird.

Ich bin nun geneigt, mir vorzustellen, daß bei der Membranbildung eine an der Oberfläche des Eies gelegene Substanz in ähnlicher Weise zum Quellen und zur Verflüssigung gebracht wird wie bei der Auflösung des Chorions durch Saponin. Wir werden in der Tat sehen, daß Saponin beim Seeigeelei die

Membranbildung bewirkt (siehe nächstes Kapitel). Herr Elder hat, wie schon erwähnt, beobachtet, daß das Seeigelei ebenfalls von einem Chorion umgeben ist, und daß das letztere

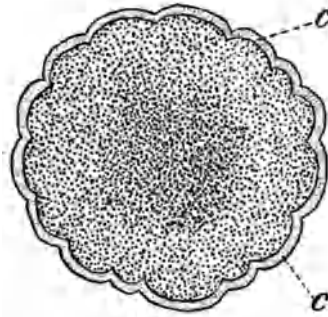


Fig. 34.

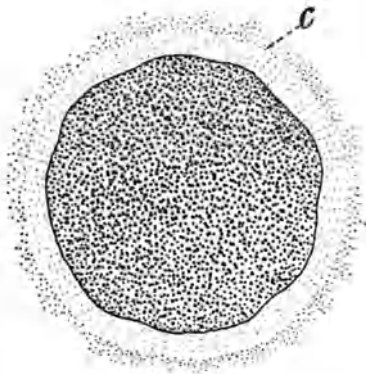


Fig. 35.

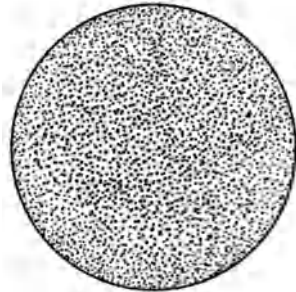


Fig. 36.

Anflösung des Chorions beim Molluskenei (*Lottia gigantea*)
mittels Saponin.

Fig. 34 zeigt das Ei vor der Behandlung mit Saponin. *c* ist das Chorion. Fig. 35. Dasselbe Ei wenige Minuten nach dem Zusatz von Saponin. Das Chorion *c* ist stark gequollen und in Lösung begriffen. Fig. 36. Das Chorion ist ganz gelöst und das Ei ist kugelförmig geworden. In diesem Zustand ist es für das Spermatozoon durchgängig.

rasch durch Buttersäure zum Quellen und zur Lösung gebracht wird. Es ist deshalb keine gewaltsame Annahme, daß das Seeigelei an der Oberfläche (aber unter der Oberflächenlamelle) eine Substanz besitzt, welche durch Säuren und andere Stoffe,

ähnlich wie das Chorion, zum Quellen und zur Verflüssigung gebracht wird, und daß diese Quellung und Verflüssigung die Grundlage des Membranbildungsprozesses bildet.

Bei meinen Versuchen habe ich oft Gelegenheit gehabt, die Membranbildung an Eiern zu beobachten, welche nicht kugelförmig waren, und deren Oberfläche irgend eine andere oft sehr unregelmäßige Krümmung besaß. In solchen Eiern war die Krümmung der Eimembran am Anfang genau so wie die des Eies. Das beweist, daß das Primäre bei der Membranbildung die Quellung einer an der Oberfläche des Eies gelegenen Substanz ist, ähnlich wie die Quellung des Chorions. Diese gequollene Eisubstanz wird dann verflüssigt. Daß später diese Masse völlig flüssig ist, geht daraus hervor, daß die Larve im Blastulastadium in derselben umherschwimmt; ferner beweist das vorhin beschriebene Kollabieren der Membran ebenfalls den flüssigen Charakter dieser Masse.

Die Existenz einer kolloiden Substanz im Membranraum läßt sich durch die unmittelbare Beobachtung bestätigen. Man sieht nämlich, daß die Flüssigkeit zwischen Membran und Zytoplasma Bestandteile von einem etwas größeren Lichtbrechungsvermögen enthält als das Seewasser, und ich vermute, daß diese Substanzen später den Belag um das Ei bilden, der vor der Zweiteilung und um die Zeit der ersten Furchung und auch später noch so deutlich wird. Herbst bezeichnet diesen Belag als Verbindungsmembran.¹⁾

Ich halte es für möglich, daß die helle sogenannte Verbindungsmembran, die sich um das Zytoplasma des befruchteten Eies bildet, durch das Kolloid gebildet wird, dessen osmotischer Druck die Ursache der Membranbildung ist.

Wir haben schon erwähnt und werden im nächsten Kapitel noch eingehender zeigen, daß dieselben Stoffe, z. B. Benzol, Saponin usw., sowohl Membranbildung wie Zytolyse hervorrufen können.

Sie tun das erstere, wenn sie nur Zeit haben, auf die Oberfläche des Eies zu wirken: sie bewirken Zytolyse, wenn ihre Wirkung sich auch auf die tieferen Schichten des Eies erstreckt.

¹⁾ Man sieht diesen Belag in Fig. 8—14 (Kap. I) als feine Membran, welche das Zytoplasma oder die Zellen dicht umgibt.

Die Fälle von Zytolyse liefern nun eine sehr schöne Bestätigung unserer Theorie. Da nämlich um so mehr Kolloid gelöst werden muß, je größer der Bruchteil des Eies ist, welcher der Wirkung der membranbildenden Stoffe anheimfällt, so sollte bei der Zytolyse auch ein größerer osmotischer Überdruck entstehen, als bei der einfachen Membranbildung, und dementsprechend sollte in diesem Falle der Durchmesser der Membran viel größer sein. Das trifft auch zu.

Wenn man nämlich unbefruchtete Seeigeleier in eine schwache Saponinlösung (in Seewasser) bringt, so tritt nach einigen Minuten die normale Membranbildung ein; läßt man aber die Eier etwas länger in der Lösung, so tritt Zytolyse der Eier ein, und der Durchmesser der Membran kann auf das Doppelte zunehmen.¹⁾ Dieselbe Erscheinung tritt auch ein, wenn man befruchtete Eier der Saponinwirkung aussetzt. Wenn man aber den Inhalt durch Erhitzen zum Gerinnen bringt, ehe man die Eier dem Saponin oder einem ähnlich wirkenden Körper aussetzt, so tritt diese Volumzunahme nicht mehr ein. Das scheint darauf hinzudeuten, daß der den osmotischen Überdruck erzeugende kolloidale Stoff ein Eiweißkörper ist.

Es ist ferner zu beachten, daß die Befruchtungsmembran in Benzol, Äther, Alkohol, Saponin und ähnlichen Stoffen unlöslich ist. Dieselbe ist also kein Lipoid.

Wir haben im vorigen Kapitel gesehen, daß die entwicklungsregende Wirkung der hypertonen Lösungen an die Gegenwart von freiem Sauerstoff gebunden ist. Wir können nun mit Sicherheit behaupten, daß die Membranbildung nicht an die Gegenwart von freiem Sauerstoff gebunden ist. Wie ich schon vor drei Jahren mitteilte, wird die Membranbildung im Ei durch KCN nicht gehemmt. Ich ließ unbefruchtete Seeigeleier bei 15° C eine Reihe von Stunden (bis zu 24 Stunden) in einer Mischung von 50 ccm Seewasser + 2 ccm $\frac{1}{20}$ ‰ KCN und fügte dann Samen zu. Die Eier bildeten in dem zyanalkaliumhaltigen Seewasser doch sofort eine vollkommene Befruchtungsmembran.²⁾ Die Entwicklung der Eier wurde in einer solchen

¹⁾ Siehe Fig. 40 und 43 im nächsten Kapitel.

²⁾ Loeb, Der chemische Charakter des Befruchtungsvorganges. Biochem. Zeitschr. 1, 191, 1906.

Lösung aber völlig gehemmt. Die Entwicklung der Eier erfordert freien Sauerstoff, die Membranbildung dagegen nicht. Dieses Resultat steht in gutem Zusammenhang mit der Annahme, daß es sich bei dem Membranbildungsprozeß wesentlich um eine physikalische Änderung, z. B. eine Verflüssigung eines Stoffes, handelt. Freilich könnte dieses physikalische Resultat durch voraufgehende chemische Änderungen bestimmt sein.

Wir haben am Anfang dieses Kapitels die Annahme gemacht, daß die Befruchtungsmembran nur eine Modifikation einer schon präexistierenden Oberflächenlamelle des Eies ist. Eine zweite Möglichkeit, die nur kurz erwähnt werden soll, ist die, daß es eine Art Niederschlagsmembran ist, indem die Oberfläche der aus dem Ei fließenden Tröpfchen in Berührung mit Seewasser diese Membran bildet. Ich halte diese Möglichkeit für mindestens ebenso beachtenswert wie die oben gemachte Annahme, daß die Befruchtungsmembran, wenn auch in einer modifizierten Form vorgebildet ist. Nur der Einfachheit halber habe ich die letztere Möglichkeit hier vorangestellt.

XVI. Membranbildung und Zytolyse.

1. Wir wollen in diesem Kapitel zeigen, daß alle hämolytischen Mittel auch die Membranbildung hervorrufen. Gewöhnlich finden wir, daß eine kurze Behandlung des Eies mit diesen Mitteln nur die Membranbildung bedingt, eine längere Behandlung dagegen die Zytolyse. Nach Köppe gibt es außer Elektrizität und Wärme 5 hämolytisch wirkende Agenzien, nämlich 1. gewisse spezifische Stoffe, wie Glukoside (z. B. Saponin) oder gallensaure Salze, 2. eine Reihe fettlösender Stoffe, wie Benzol, Äther und Alkohol, 3. destilliertes Wasser, 4. Wasserstoffionen, 5. Hydroxylionen. Wir werden zeigen, daß alle diese Stoffe die Membranbildung und bei richtiger Nachbehandlung die Entwicklung des Seeigeleies (und der Eier anderer Formen, wie wir später sehen werden) hervorrufen. Wir können deshalb kurz sagen, daß alle hämolytischen Agenzien entwicklungsregend wirken und daß die Entwicklungserregung in einer oberflächlichen oder partiellen Zytolyse des Eies besteht.

Ich wurde zuerst auf den Zusammenhang zwischen Membranbildung und Zytolyse aufmerksam, als ich 1904 Versuche darüber anstellte, wie es komme, daß bei meiner ursprünglichen Methode der osmotischen Entwicklungserregung keine Membran gebildet werde. Es stellte sich im Laufe dieser Untersuchungen heraus, daß bei genügend hohem osmotischen Druck der Lösung, z. B. in $1\frac{1}{2}$ N Lösungen von NaCl oder Rohrzucker, die unbefruchteten Eier eine prachtvolle Befruchtungsmembran bilden, daß aber dieser Membranbildung fast sofort eine Zytolyse des ganzen Eies folgt.¹⁾ Bringt man die Eier in destilliertes Wasser, so tritt eine ähnliche Erscheinung ein, sie bilden ebenfalls eine Membran und werden dann in Schatten verwandelt.

Meine Aufmerksamkeit wurde kurz darauf wieder auf den Zusammenhang zwischen Membranbildung und Zytolyse gelenkt, als ich Versuche über die Wirkung von Benzol und Amylen auf das unbefruchtete Seeigellei anstellte. Auch hier ergab sich, daß die erste Wirkung dieser Kohlenwasserstoffe darin bestand, daß sie, wie schon Herbst beobachtet hatte, die Bildung einer Befruchtungsmembran hervorriefen, daß aber dieser Bildung der Befruchtungsmembran alsbald die Zytolyse des Eies folgte.²⁾ Ich fand, daß wenn man die Eier zeitig genug aus dem benzol- oder amylenhaltigen Seewasser herausnimmt, sie nachher, nach kurzer Behandlung mit einer hypertonischen Lösung, zur Entwicklung zu normalen Larven veranlaßt werden können. Bei den Versuchen über die Hervorrufung der Membranbildung durch die höheren Fettsäuren ergab sich ein ähnliches Resultat, worauf wir noch zurückkommen werden.³⁾

Wir wollen nun der Reihe nach die membranbildende Wirkung verschiedener zytolytischer Agenzien besprechen und beginnen mit der ersten Gruppe, nämlich den spezifischen hämolytisch wirkenden Stoffen, wie den Glukosiden (Saponin, Solanin, Digitalin) und den gallensauren Salzen und Seifen: anhangsweise gehört dahin auch die Wirkung von artfremdem Serum. Diese letztere aber wollen wir in einem besonderen Kapitel behandeln.

1) Loeb, Über Befruchtung, künstliche Parthenogenese und Zytolyse des Seeigelleies. Pflügers Arch. **103**, 257, 1904. — Untersuchungen S. 288.

2) Loeb, Über eine verbesserte Methode der künstlichen Parthenogenese. Untersuchungen S. 340.

3) Ibid. S. 342.

Wir beginnen mit der Beschreibung der Wirkung von Saponin auf das Seeigelei.

2. In Fig. 37 bis 43 geben wir Kamerazeichnungen der Veränderungen eines Eies in einer Saponinlösung (8 Tropfen einer $\frac{1}{4}$ proz. Saponinlösung in Seewasser zu 5 ccm Seewasser). Fig. 37 gibt die Größe und das Aussehen des Eies unmittelbar nach seiner Übertragung in die Saponinlösung (um 9 Uhr 7 Minuten). Nach 4 Minuten begann die Membranbildung (Fig. 38, 39) und in Fig. 40 ist eine normale Befruchtungsmembran gebildet. 5 Minuten später beginnt die Zytolyse, und zwar handelt es sich hier um einen Vorgang, der im Beginn mit der Membranbildung Ähnlichkeit hat. In Fig. 41 bei G findet nämlich ein Ausfließen einer klaren Masse aus dem Zytoplasma statt, ähnlich wie bei der Membranbildung. Dann tritt rasch die Aufhellung und Quellung des ganzen Eies ein, das letztere ist in einen Schatten verwandelt (Fig. 42 und 43). Die Variationen, die man bei dem Beobachten vieler Eier in der Saponinlösung bemerkt, zeigten sich hauptsächlich bei der Membranbildung. In manchen Fällen tritt die Bildung der Blasen, die um 9,12 und 9,13 hier gezeichnet ist, nicht ein. Statt dessen geht das Ei aus dem um 9,07 (Fig. 37) gezeichneten Stadium des unbefruchteten Eies direkt in das um 9,15 gezeichnete Stadium der Membranbildung (Fig. 40) über. Als Zwischenstadium beobachtet man nur ein Rauwerden der Oberfläche des Eies, das bedingt ist durch die Bildung unzähliger kleiner Bläschen, die sofort gleichmäßig verschmelzen und zur Bildung der Oberflächenmembran Veranlassung geben; dieselbe liegt anfangs dem Zytoplasma dicht an, infolge des osmotischen Überdrucks dringt aber immer mehr Seewasser in den Membranraum ein, bis die Spannung der Membran dem osmotischen Überdruck das Gleichgewicht hält.

Aus der Beobachtung dieser Zeichnungen gewinnt man den Eindruck, daß die Saponinwirkung in zwei getrennten Etappen verläuft, die nicht kontinuierlich ineinander übergehen; die eine Etappe ist die vermutlich an der Oberfläche stattfindende Wirkung, welche zur Membranbildung führt, die zweite ist eine offenbar im Inneren des Eies stattfindende Wirkung, welche zur Zytolyse führt. Man könnte sich vorstellen, daß zwei verschiedene Kolloide durch das Saponin verflüssigt werden.



Fig. 37.

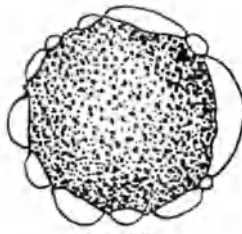


Fig. 38.

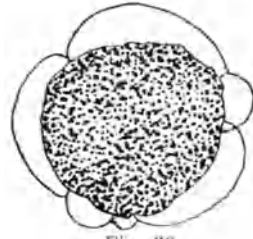


Fig. 39.

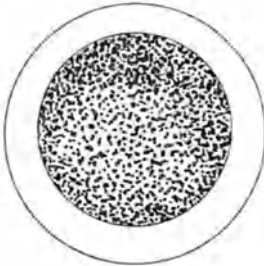


Fig. 40.

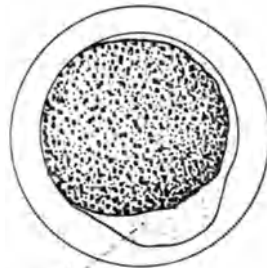


Fig. 41.

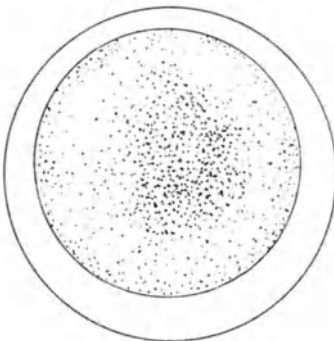


Fig. 42.

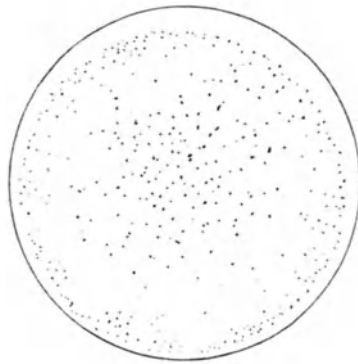


Fig. 43.

Bildung der Befruchtungsmembran und Zytolyse des Seeigeleies
mittels Saponin.

Fig. 37. Das Ei am Beginn der Saponineinwirkung um 9 Uhr 7 Minuten.
Fig. 38, 39 und 40. Bildung der Befruchtungsmembran. Das in Fig. 40
dargestellte Stadium der vollendeten Membranbildung war um 9 Uhr
15 Minuten erreicht. (Wenn das Ei in diesem Stadium der Einwirkung
des Saponins entzogen wird, kann es sich entwickeln.) Um 9 Uhr
20 Min. begann die Zytolyse. Fig. 41, 42 und 43 sind fortgeschrittene
Stadien der Saponinzytolyse.

Das eine liegt nahe der Oberflächenlamelle und seine Verflüssigung führt zur Membranbildung. Das zweite liegt im Innern und die Verflüssigung des letzteren führt zur Zytolyse. In beiden Fällen ist die Verflüssigung mit einer Quellung und Volumzunahme verbunden. Es war nun dieser Umstand, den wir im Auge hatten, als wir im Kapitel IX den Zerfall der Eier, der einige Stunden nach der künstlichen Membranbildung eintritt (falls man die Eier nicht einer hypertonen Lösung oder dem Sauerstoffmangel usw. aussetzt), als Zytolyse bezeichneten. Fig. 41 könnte nämlich ebensogut als eine Zeichnung gelten, welche den Anfang des Zerfalls bezeichnet, der im Seegelei nach der künstlichen Membranbildung mit Buttersäure eintritt. Wir wiesen damals schon darauf hin, daß dieser Fall mit der Zytolyse Ähnlichkeit hat und schlossen daraus, daß die künstliche Membranbildung in dem Ei auch den Anfang der Zytolyse erweckt.

Eine Stütze für diese Auffassung finden wir nun in der Tatsache, daß, wenn man die Eier mit Saponin behandelt, bis die Membranbildung eintritt (Fig. 40), und sie dann viermal bis sechsmal in reinem Seewasser wäscht, bis sie von den letzten Spuren des Saponins befreit sind, sie sich genau so verhalten wie die Eier, bei denen man die künstliche Membran mit Fettsäure hervorgerufen hat. Läßt man sie im Seewasser, so beginnt die Entwicklung, und es hängt von der Temperatur ab, wie weit sie sich entwickeln, ehe der Zerfall beginnt.

Behandelt man sie jedoch hinterher etwa 40 Minuten (bei 15° C) mit hypertonischem Seewasser, so entwickeln sie sich zu Larven.

Folgendes Beispiel möge das erläutern. 4 Tropfen einer Saponinlösung in Seewasser wurden zu 5 ccm Seewasser mit Eiern zugesetzt. Nach 5 Minuten begann die Membranbildung, und 3 Minuten später hatten alle Eier Membranen. Die Eier wurden dann in 200 ccm Seewasser (das frei von Saponin war) gewaschen, und dieser Prozeß des Waschens wurde viermal wiederholt. Dann wurden sie in 50 ccm Seewasser + $6\frac{1}{2}$ ccm $2\frac{1}{2}$ N NaCl gebracht. Nach 15, 25, 33, 45, 55, 65 und 93 Minuten wurde je eine Portion der Eier in normales Seewasser zurückgebracht. Die Eier, welche nur 15, 25 oder 35 Minuten in hypertonischem Seewasser gewesen waren, zerfielen alle. Von

den Eiern, welche 45 Minuten in der hypertonischen Lösung gewesen waren, entwickelten sich einige zu Larven; von denjenigen, welche 55 Minuten in der hypertonischen Lösung gewesen waren, entwickelten sich 10⁰/₀, von den nach 65 Minuten herausgenommenen 60⁰/₀, von den nach 93 Minuten herausgenommenen 80⁰/₀.

Zur Kontrolle wurden Eier, bei denen die Membranbildung durch Buttersäurebehandlung hervorgerufen war, in derselben Weise behandelt; die Resultate waren ähnlich. Die Lebensdauer der Buttersäurelarven war jedoch etwas größer als die der Saponinlarven.¹⁾

Wir wissen, daß Solanin und Digitalin ähnliche hämolytische Wirkungen besitzen wie Saponin. Wir konnten auch zeigen, daß Seeigeleier, bei denen man eine Membranbildung mit diesen Stoffen hervorruft, hinterher zur Entwicklung zu Larven veranlaßt werden können.

Die zytolytische Wirkung von gallensauren Salzen ist wohlbekannt. Ein Gemisch von glykochol- und taurocholsaurem Natron, welches Herr Dr. v. Knaffl hergestellt hatte, wurde in Seewasser gelöst. Wurden Eier in eine solche Lösung gebracht, so trat bald eine Membranbildung ein. Die Membran bildete sich (wie im Falle der Saponinlösung), während die Eier in der Lösung der gallensauren Salze waren. Der Membranbildung folgte rasch die Zytolyse der Eier. Brachte man die Eier jedoch rechtzeitig in normales Seewasser zurück, so blieb die Zytolyse aus. Wenn man die Eier zeitig aus der Lösung der gallensauren Salze in normales Seewasser zurückbrachte (d. h. nachdem sie eine Membran gebildet hatten, aber ehe sie alle zytolytisch zerstört waren), und wenn man sie im Seewasser ließ, so entwickelten sie sich nicht. Behandelte man sie aber kurze Zeit mit hypertonischem Seewasser, so entwickelten sie sich zu Larven. Die Eier leiden bei der Hervorrufung der Membranbildung durch gallensaure Salze mehr als bei der Membranbildung durch Saponin.

In beiden Fällen entwickelten sich bei der kurzen Behandlung der Eier mit hypertonischem Seewasser nur solche

¹⁾ Loeb, Über die Hervorrufung der Membranbildung und Entwicklung beim Seeigelei durch Blutserum von Kaninchen und durch zytolytische Agenzien, Pfügers Arch. **122**, 199, 1908.

Eier, welche eine Membran gebildet hatten, eine Tatsache, die ja auch für die mit Fettsäure behandelten Eier zutrifft.¹⁾

3. Bereits im Jahre 1905 stellte ich Versuche über die Membranbildung und Entwicklungserregung des Eies mit Seifen an; durch einen Zufall führten diese Versuche damals nicht zum Ziel, weil, wie sich herausstellte, die Seifenlösung chemisch modifiziert war. Eine frische Lösung von Natriumoleat, die ich neuerdings erhielt, gab das erwartete Resultat. Denn da Seifen gute hämolytische Agenzien sind, so war mit Sicherheit ein positives Resultat dieser Versuche vorherzusehen. Ich will erst kurz die zytolytische Wirkung der Seifen schildern und dann die entwicklungserregende Wirkung derselben diskutieren.

Da Seife durch Kalzium gefällt wird, war es notwendig, dieselbe in $\frac{n}{2}$ NaCl zu lösen, anstatt in Seewasser. Bringt man nun die unbefruchteten Eier von *Strongylocentrotus purpuratus* (die vorher durch Waschen in $\frac{n}{2}$ NaCl von Seewasser befreit waren) in 50 ccm neutrales $\frac{n}{2}$ NaCl, dem man 0,2 ccm $\frac{n}{10}$ Natriumoleat zugesetzt hat, so tritt in der Lösung im allgemeinen weder eine Membranbildung noch eine Zytolyse der Eier ein. Die letzteren werden nur eckig. Bringt man sie aber nach einigen Minuten in Seewasser, so bildet eine große Zahl derselben sofort Membranen, und auf diese Membranbildung folgt bei einigen Eiern eine Zytolyse. Je länger die Eier in der Seifenlösung bleiben, um so größer wird der Prozentsatz derselben, die nach der Übertragung in Seewasser Membranen bilden und der Zytolyse verfallen. Für die Eier mancher Seeigel ist 0,2 ccm Natriumoleat in 50 ccm NaCl zu wenig und man muß etwa 0,3 ccm Seife zusetzen.

Warum verursacht die Seifenlösung erst die Membranbildung, nachdem die Eier in das Seewasser zurückgebracht sind? Darauf lautet die Antwort: daß Seewasser die Membranbildung infolge seiner alkalischen Reaktion veranlaßt. Die Seifenlösung macht das Ei entweder durchgängiger für Alkalien, oder die Wirkungen beider Stoffe addieren sich. Das

¹⁾ Loeb, l. c.

kann man durch eine Reihe sehr schlagender Versuche zeigen. Unbefruchtete Eier wurden in 50 ccm $\frac{n}{2}$ NaCl + 0,2 ccm $\frac{n}{10}$ Natriumoleat gebracht. Nach $3\frac{1}{2}$ Minuten wurde eine Portion derselben in Seewasser übertragen. Die Mehrzahl der Eier bildete sofort Membranen und viele verfielen nach der Membranbildung der Zytolyse. Eine zweite Portion wurde in 50 ccm Seewasser übertragen, das durch Zusatz von 0,5 ccm $\frac{n}{10}$ HCl schwach sauer gemacht war. (0,4 ccm $\frac{n}{10}$ HCl genügte, um mit Neutralrot den Farbumschlag im Seewasser herbeizuführen.) Kein einziges der in schwach saures Seewasser übertragenen Eier bildete eine Membran oder verfiel der Zytolyse. Selbst der Zusatz von 0,3 ccm oder noch etwas weniger HCl genügte schon, um die Membranbildung und Zytolyse der Eier nach der Übertragung derselben in Seewasser zu hemmen. Andererseits wurde die zytolytische Wirkung des Seewassers durch Zusatz von Alkali stark vermehrt. Der folgende Versuch mag als Beispiel dienen. Unbefruchtete Eier wurden in 50 ccm $\frac{n}{2}$ NaCl + 0,2 ccm $\frac{n}{10}$ Natriumoleat gebracht. Nach 3 Minuten wurden die Eier in folgende Lösungen übertragen: 50 ccm Seewasser + 0,5, 0,3, 0,1, 0 ccm $\frac{n}{10}$ HCl; 0,5, 1,0, 1,5 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO. Die Eier, welche in das Seewasser übertragen wurden, dem Säure zugesetzt worden war, bildeten keine oder fast keine Membranen, und keine Zytolyse trat ein. Von den Eiern, welche in normales Seewasser übertragen wurden, bildeten 95% Membranen, und etwa 1% derselben verfiel der Zytolyse. Die Eier, welche in 50 ccm Seewasser mit 0,5 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO übertragen wurden, bildeten alle Membranen und 90% derselben zytolysierten. Die Eier, welche in Seewasser mit mehr NaHO übertragen worden waren, verfielen alle der Zytolyse.

Wenn der Gedankengang richtig war, so mußte es auch gelingen, die Membranbildung und Zytolyse der Eier in der Seifenlösung zu veranlassen, wenn man die letztere nur alkalisch

machte. Das trifft auch zu. Unbefruchtete Eier wurden in folgende Lösungen verteilt:

1. 25 ccm $\frac{n}{2}$ NaCl + 0,1 ccm $\frac{n}{10}$ Natriumoleat

2. 25 „ „ „ + 0,1 „ „ „ + 0,2 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO

3. 25 „ „ „ + 0,2 „ „ „ NaHO

In Lösung 1 wurden die Eier eckig, aber fast keins bildete eine Membran; in Lösung 2 bildeten 50% Membranen, die sehr fein waren und bald zerrissen, und viele Eier verfielen der Zytolyse; in Lösung 3 blieben die Eier völlig intakt.

Man kann aber auch Zytolyse der Eier in der Seifenlösung herbeiführen, indem man die Konzentration der Seifenlösung ziemlich hoch wählt. Bringt man die Eier in 50 ccm $\frac{n}{2}$ NaCl

+ 1,0 ccm $\frac{n}{10}$ Natriumoleat, so beginnt die Membranbildung und Zytolyse der Eier fast sofort. Ich vermute, daß eine solche Lösung eine alkalische Reaktion hat. Setzt man HCl im Überschuß zu dieser Mischung, so wird die Membranbildung nicht gehemmt; in diesem Falle bildet sich freie Ölsäure, die, wie ich schon vor einigen Jahren beobachtet hatte, ebenfalls Membranbildung und Zytolyse bei den Eiern veranlaßt.

Daß eine alkalische Lösung von NaCl ohne Seife nur eine relativ geringe zytolytische Wirkung hat, haben wir bereits gesehen. Der Zusatz von 0,2 ccm $\frac{n}{10}$ Natriumoleat + 0,4 ccm

$\frac{n}{10}$ NaHO zu 50 ccm NaCl wirkt ungefähr ebenso stark, wie

der Zusatz von 2,0 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO ohne Seife.

Von der entwicklungsregenden Wirkung der Seifen kann man sich nun leicht überzeugen. Es ist nur nötig, die Eier nach kurzer Zeit aus der Seifenlösung in normales Seewasser zu übertragen und sie hinterher (nach wiederholtem Waschen) mit hypertonischem Seewasser zu behandeln. Folgendes Beispiel möge zur Illustration dienen.

Unbefruchtete Eier wurden in 50 ccm $\frac{n}{2}$ NaCl + 0,2 ccm

Natriumoleat gebracht und von hier nach 2 bis 3 Minuten in Seewasser übertragen. Die Mehrzahl der Eier bildete Membranen, und nur wenige verfielen der Zytolyse. Nach wiederholtem Waschen wurden die Eier eine Stunde später in hypertones Seewasser gebracht und von hier nach 30 bis 50 Minuten in normales Seewasser übertragen. Eine beträchtliche Zahl der Eier, welche eine Membran gebildet hatten, entwickelte sich zu normalen Larven.

Diese Versuche beweisen, daß die Membranbildung durch Seife ebenfalls die Entwicklung anregen kann; praktisch ist die Methode wenig empfehlenswert, weil die zytolytische Wirkung der Seifen so stark ist, und die Eier bei der Behandlung mit Seife eine viel stärkere Tendenz zur Zytolyse erhalten als bei der Behandlung mit den niederen Fettsäuren.

4. Eine weitere Gruppe hämolytischer Agenzien bilden die fettlösenden Stoffe, Benzol, Toluol, Amylen, Chloroform, Aldehyde, Äther, Alkohol usw. Wir haben bereits früher erwähnt, daß Benzol, Toluol und Amylen in Seewasser gelöst — sie sind nur in Spuren löslich — Membranbildung der Eier hervorrufen, und daß dieser Membranbildung fast sofort Zytolyse folgt. Deshalb sind die spezifisch fettlösenden Stoffe für die Entwicklungs-erregung wenig geeignet. Im Prinzip liegen die Dinge aber genau so wie in der Saponingruppe: Arbeitet man sehr rasch, und nimmt man die Eier, sobald die Membranbildung beginnt, aus dem benzol- oder amylenhaltigen Seewasser, und bringt man sie in normales Seewasser zurück, so kann man es bewirken, daß ein gewisser Prozentsatz der Eier nur Membranen bildet, daß sie aber vor der Zytolyse bewahrt bleiben. Solche Eier können zur Entwicklung zu Larven veranlaßt werden, wenn man sie hinterher mit hypertonischem Seewasser behandelt. Behandelt man sie nicht mit hypertonischem Seewasser, so fangen sie an sich zu entwickeln, aber sie zerfallen dann, ohne das Larvenstadium zu erreichen. Dieser Zerfall ist eine verspätete Zytolyse.

Bei der Wichtigkeit des Gegenstandes wollen wir noch die Zytolyse des Seeigeleies unter dem Einfluß einiger anderer Agenzien dieser Gruppe beschreiben. Fig. 44 bis 49 geben das Verhalten des Seeigeleies in einer Mischung von 45 ccm See-

wasser und 5 cem $\frac{m}{100}$ Salizylaldehyd wieder. Erst bildet sich eine schöne Befruchtungsmembran (Fig. 44 bis 47), dann beginnt

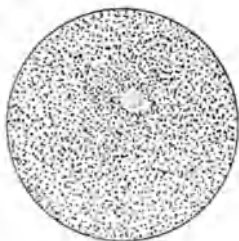


Fig. 44.

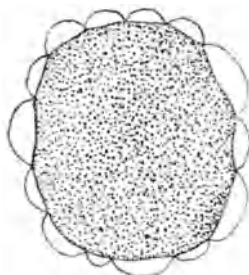


Fig. 45.

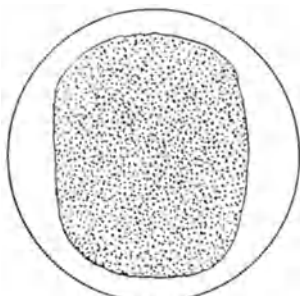


Fig. 46.

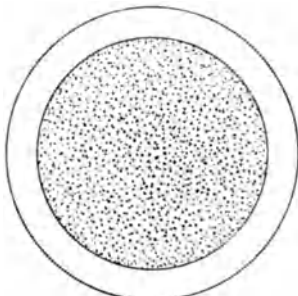


Fig. 47.

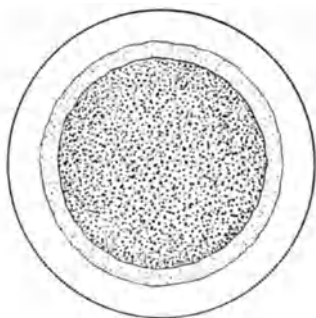


Fig. 48.

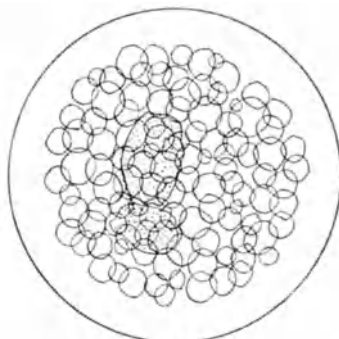


Fig. 49.

Membranbildung und Zytolyse des Seeigelees unter dem Einfluß von Salizylaldehyd.

Fig. 44 bis 47. Aufeinanderfolgende Stadien in der Bildung der Membran.
Fig. 48 beginnende, Fig. 49 vollendete Zytolyse.

die Zytolyse in Fig. 48 mit einem Ausfließen einer hellen Substanz aus dem Zytoplasma, und bald darauf (Fig. 49) ist das Ei in einen Schatten verwandelt. Also auch hier verläuft der Prozeß der Zytolyse in zwei Etappen, erst eine Membranbildung, dann das Ausfließen einer zweiten Substanz aus dem Zytoplasma, und bald darauf völlige Aufhellung des Inhalts und die Bildung großer klarer Tropfen (Fig. 49).

Bringt man die Eier in eine Mischung von 10 ccm Seewasser + 10 ccm $2\frac{1}{2}$ N Propylalkohol, so tritt erst die Bildung einer Befruchtungsmembran ein. Nimmt man die Eier in diesem

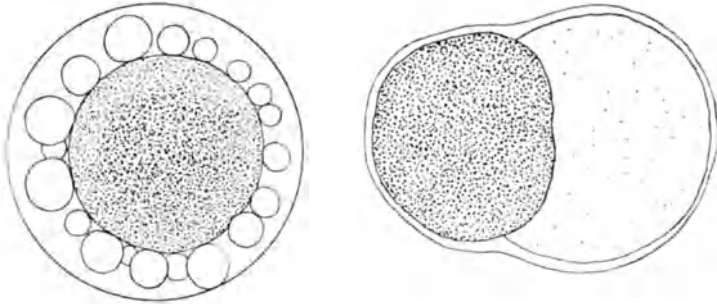


Fig. 50 und 51.

Membranbildung und beginnende Zytolyse bei zwei verschiedenen Eiern eines Seeigels unter dem Einfluß von Propylalkohol.

Die Zytolyse beginnt in Fig. 50 mit dem Austritt vieler kleiner Tröpfchen, in Fig. 51 mit dem Austritt eines einzigen großen Tropfens aus dem Zytoplasma.

Stadium aus der Lösung, und wäscht man sie in Seewasser, so können sich einige derselben entwickeln, wenn man sie hinterher mit hypertonischem Seewasser behandelt. Läßt man die Eier aber in der Lösung von Alkohol, so tritt bald die Zytolyse ein. Fig. 50 und 51 geben die Anfänge dieser Zytolyse, die in einem Falle (Fig. 50) in dem Austreten vieler heller Tröpfchen aus dem Ei besteht, im andern Falle (Fig. 51) im Austritt eines großen Tropfens. Im Grunde handelt es sich nur um zwei Modifikationen desselben Prozesses. Es sei noch erwähnt, daß, wenn man zu je 4 ccm Propylalkohol 1 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl zufügt, das Resultat der Versuche dasselbe bleibt.

5. Wir kommen nun zur Besprechung der zytolytischen Wirkung des destillierten Wassers. Für die Theorie ist gerade

diese Art der Zytolyse von großer Bedeutung. Die Zeichnungen 52 bis 56 geben das Verhalten des unbefruchteten Seeigeleies in destilliertem Wasser wieder. Man sieht, daß in den ersten 5 Minuten das Ei langsam, aber stetig an Volumen zunimmt, daß sein Aussehen aber dasselbe bleibt. Dann aber wird es

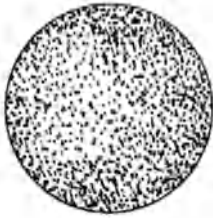


Fig. 52.

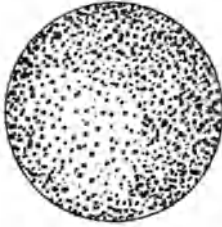


Fig. 53.

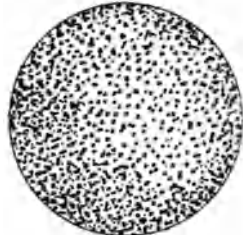


Fig. 54.

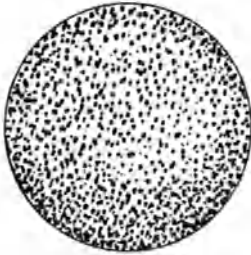


Fig. 55.

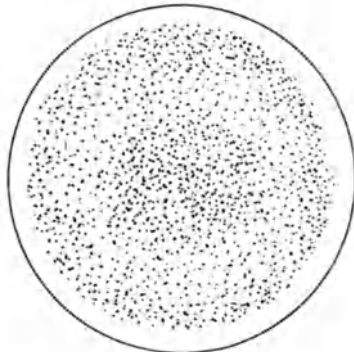


Fig. 56.

Schwellung und Zytolyse des Seeigeleies in destilliertem Wasser.
 Fig. 52 bis 55. Langsame, aber stetige Volumzunahme des Eies in destilliertem Wasser innerhalb 5 Minuten. Fig. 56. Plötzliche Membranbildung, Schwellung und Zytolyse des Eies in der sechsten Minute. Man sieht, daß die Zytolyse nicht durch ein Zerreißen der Oberflächenlamelle bedingt ist.

ganz plötzlich innerhalb einer Minute in einen Schatten verwandelt; dabei bildet es eine Membran und schwillt plötzlich enorm an. Es muß also in dieser Minute eine plötzliche Zustandsveränderung eingetreten sein. Nach Köppe ist jede Zelle mit einer Lipoidmembran umgeben und diese zerreißt infolge des Schwellens des Zellinhalts. Man sieht aber, daß

diese Ansicht hier nicht zutrifft; die Membran bleibt gerade bestehen, und der Umstand, daß diese Membran in allen lipidlösenden Stoffen unlöslich ist, ist ebenfalls keine Stütze der Ansicht Köppes. v. Knaffl hat die Ansicht ausgesprochen, daß das destillierte Wasser eine chemische Wirkung auf das Innere des Eies ausübt, und daß diese Wirkung für die Zytolyse in Betracht kommt.¹⁾ Das würde die lange Latenzperiode und die Plötzlichkeit des Eintritts der Zytolyse nach Ablauf dieser Periode erklären.

6. Auch die Temperaturerhöhung ist ein zytolytisches Agens. Herr Dr. v. Knaffl fand im hiesigen Institut, daß durch Erwärmung unbefruchteter Seeigeleier auf 41° C fast momentan Zytolyse derselben eintritt. Bei niedrigeren Temperaturen ist längere Zeit für die Zytolyse erforderlich.²⁾ Ich fand, daß man durch bloße Erwärmung auf 34° oder 35° C beim Seeigelei oft — aber nicht immer — die Bildung einer typischen Befruchtungsmembran hervorrufen kann.³⁾ Kühlt man die Eier dann rasch ab, dann kommt es zu keiner Zytolyse. Solche Eier sind nicht mehr entwicklungsfähig, da die Temperatur von 34° C sie tötet. Seesterneier aber, bei denen ebenfalls durch Erwärmung eine Membranbildung hervorgerufen werden kann, können höhere Temperaturen ertragen und entwickeln sich unter diesen Bedingungen (nach den Versuchen von Ralph S. Lillie, auf die wir später zurückkommen).

7. Wir wollen in wenigen Worten auf die Wirkung der Säuren und Alkalien zurückkommen. Daß die Säuren die Membranbildung veranlassen, ist bereits ausführlich geschildert worden. Was die Zytolyse der Seeigeleier durch Säure betrifft, so habe ich nur mit den höheren Fettsäuren, von der Heptylsäure an, d. h. mit Heptyl-, Capryl-, Nonyl- und Caprinsäure, Zytolyse erzielt; dieser Zytolyse ging stets die Bildung einer Befruchtungsmembran voraus. Die Zytolyse fand statt, während die Eier in der Lösung waren. Gewöhnlich wurden die Versuche in $\frac{n}{500}$ oder $\frac{n}{1000}$ Lösung der Säure angestellt, die durch Zusatz von etwas NaCl

¹⁾ E. v. Knaffl-Lenz, Über die Beziehungen zwischen Lipoidverflüssigung und Zytolyse. Pflügers Arch. **123**, 279, 1908.

²⁾ Ibid.

³⁾ Loeb, Pflügers Arch. **122**, 199.

mit dem Seewasser isosmotisch gemacht war. Merkwürdigerweise förderte der Zusatz von etwas Ca die membranbildende Wirkung der Säuren sehr merklich. Auch Ölsäure (durch NaCl mit dem Seewasser isosmotisch gemacht) verursachte die Membranbildung und Zytolyse des Seeigeleies. Mit den niederen Fettsäuren — von der Capronsäure an abwärts — habe ich bis jetzt zwar die Membranbildung erzielt, aber keine rasche Zytolyse. Daß aber dieser Membranbildung anscheinend eine langsame Zytolyse folgt, ist ja bereits geschildert worden; wir haben auch gezeigt, daß diese langsame Zytolyse gehemmt werden muß, wenn man parthenogenetische Larven erzielen will.

Die membranbildende und entwicklungsregende Wirkung der Alkalien ist bereits besprochen worden, und wir haben auch bereits der zytolytischen Wirkungen der Alkalilösungen gedacht. Hier sei nur noch betont, daß Ca die zytolytische Wirkung der Alkalien beim Seeigelei hemmt; aber ich bezweifle, daß das gleiche für die Eier von *Lottia* gilt (nach Beobachtungen von Herrn v. Knaffl und mir).

8. Wir wollen schließlich noch den Mechanismus der Zytolyse kurz berühren. Daß Stoffe wie Saponin, Benzol eine verflüssigende und quellungserregende Wirkung ausüben, läßt sich an dem Chorion des Molluskeneies und Annelideneies unmittelbar beobachten. Dieses Quellen oder die Absorption von Flüssigkeit und die Aufhellung des vorher dunklen Zellinhalts sind für die Zytolyse typisch. Daß es sich nirgends um die Auflösung der angeblichen Lipoidmembran des Eies oder der Zelle handelt, wie Köppe und mit ihm viele Autoren annahmen, wird dadurch bewiesen, daß gerade das Gegenteil beim Seeigelei stattfindet. Es wird hier gerade eine straffere Membran, die Befruchtungsmembran, gebildet oder vom Ei abgehoben, und dieselbe ist weder in Benzol noch in der Lösung irgendeines anderen „lipoidlösenden“ Stoffes löslich.

v. Knaffl hat eine andere Vorstellung über den Mechanismus der Zytolyse entwickelt, die ich hier wörtlich wiedergeben will. „Es kann als sicher angenommen werden . . ., daß das Protoplasma reich an Lipoiden ist, und daß jeder chemische oder physikalische Eingriff, der eine Verflüssigung oder Lösung der Protoplasmalipide hervorruft, das Ei dadurch zur Zytolyse veranlaßt, daß das nunmehr lipoidfreie Protoplasma

durch Wasseraufnahme quillt, wobei es in manchen Fällen zum Platzen der Membran kommen kann.“ Zur weiteren Erläuterung mögen auch die folgenden Schlußfolgerungen v. Knaffls erwähnt werden: „Das Protoplasma ist reich an Lipoiden, es ist wahrscheinlich der Hauptsache nach eine Emulsion aus diesen und Proteinen. Jeder physikalische und chemische Eingriff, der imstande ist, die Lipide zu verflüssigen, ruft Zytolyse des Eies hervor. Das Protein des Eies kann nur dann wesentlich quellen oder sich lösen, wenn der Aggregatzustand der Lipide durch chemische oder physikalische Agenzien verändert wurde. Der Mechanismus der Zytolyse besteht darin, daß die Lipide verflüssigt werden, und hierauf das lipoidfreie Protein durch Wasseraufnahme quillt oder sich löst . . . Es bestätigt sich daher die Loeb'sche Ansicht, daß die Membranbildung durch Verflüssigung der Lipide ausgelöst wird.“¹⁾ (Ich hatte früher die Bildung der Befruchtungsmembran auf eine Verflüssigung der Lipide an der Oberfläche des Eies zurückgeführt).²⁾

Wir wollen nun auf die Versuche, auf welche v. Knaffl seine Ansicht gründet, näher eingehen. Wenn v. Knaffl das unbefruchtete Seeigelei auf 41° C erhitzte, so trat Zytolyse desselben ein; an der Oberfläche der Eier fanden sich viele stark lichtbrechende Kügelchen, ähnlich wie in Fig. 50. Diese Kügelchen sind seiner Ansicht nach Lipide, da dieselben durch Benzol, Chloroform und Alkali gelöst und zum Verschwinden gebracht wurden. Azeton brachte sie nicht zum Verschwinden, woraus v. Knaffl schließt, daß sie aus Lecithin bestehen. In dem Umstand, daß bei der Zytolyse des Eies dieses Austreten der hellen Tröpfchen beobachtet wird, welche in Benzol löslich sind, sieht er eine Stütze der Annahme, daß es sich bei der Membranbildung und Zytolyse in letzter Instanz um eine Lipidlösung oder einen Austritt von Lipoiden aus dem Ei handelt.

Dieser Austritt der Lipide könnte nun in der Tat die für die Zytolyse charakteristische Aufhellung des Eies erklären. Besteht nämlich das Protoplasma aus einer Emulsion, wobei die Wände der Bläschen durch feste Lipide gebildet sind, so

¹⁾ v. Knaffl, l. c.

²⁾ Loeb, Über den chemischen Charakter des Befruchtungsvorganges. Roux's Abhandlungen und Vorträge, Leipzig 1908.

muß eine Beseitigung dieser Wände ein Zusammenfließen der vielen kleinen Bläschen zu größeren Blasen bedingen. Dadurch muß aber weniger durchfallendes Licht reflektiert werden und das Ei heller erscheinen. Ein Blick auf Fig. 49 zeigt in der Tat, daß das zytolysierte Ei aus größeren Tröpfchen besteht. Ich habe an die Möglichkeit gedacht, daß diesem Austritt der hellen Tröpfchen bei der Zytolyse des ziemlich pigmentfreien Eies von *S. purpuratus* bei den roten Blutkörperchen der Austritt von Hämoglobin entspricht. Man sieht dann, daß es nicht nötig ist, für diesen letzteren Fall eine Zerreißen der Oberflächlamelle des roten Blutkörperchens anzunehmen. Das zweite Element in v. Knafls Hypothese ist die Annahme, daß es ein Eiweißstoff ist, der die Quellung bedingt. Hierfür bringt er meiner Ansicht nach einen sehr schlagenden Grund an. Bringt man nämlich das Protoplasma des Eies (ehe man es der Einwirkung zytolytischer Agenzien unterwirft) durch HgCl_2 oder durch Säure oder Erhitzen zum Gerinnen, so bringt Benzol oder destilliertes Wasser nur eine Aufhellung, aber keine Quellung mehr zustande. Nur das flüssige Eiweiß ist imstande, einen osmotischen Druck auszuüben und die enorme Flüssigkeitsabsorption zu bedingen, die für die Membranbildung und Zytolyse charakteristisch ist.

Statt die Annahme zu machen, daß das Protoplasma eine Emulsion von Eiweiß in relativ festen Lipoiden ist und daß die Zerstörung dieser Emulsion die Zytolyse bedingt, ist noch eine andere Möglichkeit vorhanden, nämlich daß Lipoid und Eiweiß in loser chemischer Verbindung sind. Die Trennung dieser Verbindung würde dann das Eiweiß quellbarer machen. Freilich dürfte dabei die Aufhellung, die bei der Zytolyse erfolgt, nicht so einfach ihre Erklärung finden, wie bei der Annahme, daß die kleinen Tropfen einer Emulsion zu größeren Tropfen zusammenfließen.

Aber es ist für den Zweck unserer Arbeit nicht nötig, daß wir uns auf eine Entscheidung über die „Lipoidkontrolle“ bei der Zytolyse einlassen. Wir können direkt beobachten, daß die zytolytischen Stoffe das Chorion, das den Eiern aufliegt, zum Quellen und dann zur teilweisen und vollständigen Lösung bringen. Es ist nur nötig für uns, diese Beobachtung zu benutzen, um auch die Membranbildung

zu verstehen, nämlich, daß im Zytoplasma des Eies selbst nahe seiner Oberfläche, eine Substanz vorhanden ist, welche mit einem der Stoffe im Chorion identisch oder nahe verwandt ist und welche zum Quellen oder zur Verflüssigung gebracht werden muß, ehe das Ei sich entwickeln kann.

Die Quellung und Lösung einer solchen Substanz im Innern des Eies bedingt die Zytolyse und daher kommt es, daß alle zytolytischen Stoffe oder Agenzien auch membranbildend und damit entwicklungserregend wirken.

Wir verstehen es auch jetzt, warum jede Anregung der Membranbildung und damit der Entwicklung des Eies eine Tendenz zur Zytolyse in demselben zurückläßt, die erst beseitigt werden muß, ehe das Ei sich zu einer normalen Larve entwickeln kann.

Ich habe in früheren Arbeiten wiederholt die Ansicht ausgesprochen, daß auch das Spermatozoon dadurch die Entwicklung des Eies anregt, daß es eine Substanz ins Ei trägt, welche zytolytisch wirkt; insbesondere war an eine höhere Fettsäure zu denken, weil ja das Spermatozoon Fette enthält. Dann aber bleibt die Tatsache zu erklären, daß sich an die Membranbildung durch ein Spermatozoon nie eine Zytolyse des Eies anschließt. Wir werden aber im letzten Kapitel sehen, daß das Spermatozoon noch eine andere — etwa oxydationsbeschleunigende — Substanz in das Ei trägt, welche die Tendenz zur Zytolyse unterdrückt; ähnlich wie die hypertonische Lösung dies tut, nur ohne die schädlichen Nebenwirkungen der letzteren.

XVII. Die Entwicklungserregung des Seeigeleies ohne Membranbildung.

Ich habe schon mehrfach erwähnt, daß, wenn man Seeigeleier, die mehr als einen Tag im Seewasser bei Zimmertemperatur gewesen sind, durch Samen befruchtet, die Bildung der Befruchtungsmembran unterbleiben kann, daß aber die Eier sich dennoch entwickeln. Warum diese Eier sich so abweichend verhalten, läßt sich nicht bestimmt sagen; es hängt wohl damit zusammen, daß auch im unbefruchteten Ei chemische Änderungen stattfinden, und daß dieselben in ein bis

zwei Tagen imstande sind, die Bildung der Membran anscheinend aufzuheben oder stark zu hemmen. Ehe es nämlich zum scheinbaren Verlust der Fähigkeit kommt, eine Membran zu bilden, beobachtet man ein Stadium, in welchem zwar eine Membran beim Eindringen des Spermatozoons gebildet wird, in welchem diese Membran jedoch dem Ei relativ dicht anliegt.

Diese Tatsachen müssen wir im Auge behalten, wenn wir nicht in Irrtümer verfallen wollen bei der Beurteilung der künstlichen Parthenogenese ohne Membranbildung. Wir nehmen an, daß in diesem Falle auch die Änderungen im Ei stattfinden, welche zur Membranbildung führen, daß dieselben aber quantitativ geringer sind, als das für die Membranbildung nötig ist. Alles was eine geringe periphere Zytolyse des Eies verursacht, wird eine derartige Entwicklung veranlassen können. Diese Bedingung findet statt bei der älteren Methode der rein osmotischen Entwicklungserregung des Eies, wie wir schon früher sahen. Wenn man unbefruchtete Seeigeleier' direkt in hypertenisches Seewasser bringt und dort eine Zeitlang läßt, so können sie sich hinterher, wenn sie in normales Seewasser gebracht werden, zu Larven entwickeln; diese Entwicklung aber erfolgt im allgemeinen ohne deutliche Membranbildung oder ohne Membranbildung überhaupt.

Eine zweite interessantere Methode ist die Behandlung der Eier mit Blutserum.

Wir werden später sehen, daß es möglich ist, mit artfremdem Blutserum die Bildung der typischen Befruchtungsmembran im Ei zu veranlassen. Geschieht nichts weiter mit dem Ei, so beginnt die Entwicklung, aber das Ei geht bald darauf zugrunde. Behandelt man das Ei aber hinterher kurze Zeit mit hypertenischem Seewasser, so tritt eine normale Entwicklung des Eies zur Blastula, Gastrula und zum Pluteus ein.

Man kann nun eine andere Form der Entwicklungserregung durch Serum beobachten, bei der keine Membranbildung eintritt, bei der aber auch keine Behandlung des Eies mit hypertenischem Seewasser nötig ist. Ich will einen derartigen Versuch hier mitteilen. Die unbefruchteten Eier eines Seeigels wurden in eine Mischung von 1 ccm Schweineserum und 1 ccm mit Seewasser isotonischem SrCl_2 gebracht. Nach 5 Minuten wurde die Lösung abgesaugt und durch Seewasser ersetzt, und

dieser Prozeß wurde viermal wiederholt. Die Eier blieben 4 Stunden lang im Uhrsälchen und wurden dann in eine größere Schale mit Seewasser übertragen. Nur eine kleine Zahl der Eier hatte Membranen gebildet, und diese gingen nach einiger Zeit in den ersten Furchungsstadien zugrunde. Von den andern Eiern aber, die keine Membran gebildet hatten, fingen einige an, sich zu furchen, und diese entwickelten sich zu normalen schwimmenden Larven. Ähnliche Resultate wurden auch mit einer Mischung von Seewasser und Schweineserum ohne Zusatz von SrCl_2 erzielt.¹⁾

Ich glaube, daß diese Versuche das Verhältnis der Entwicklungserregung mit und ohne Membranbildung klar auseinander setzen. Die Eier, welche bei der Behandlung mit Serum Membranen bildeten, fingen an, sich zu entwickeln: gingen aber dann zugrunde. Das entspricht unserer früheren Annahme, daß solche Eier infolge der relativ ausgedehnten oberflächlichen Zytolyse nur durch eine geeignete Nachbehandlung zur Entwicklung gebracht werden können. Ich vermute nun, daß bei Eiern, welche sich ohne Membranbildung entwickelten, das Ei gerade genug modifiziert wurde, um die Entwicklung zu gestatten, aber nicht genug, um die Membranbildung zu veranlassen. Der geringere Grad der Zytolyse erlaubte den Eiern, sich sofort normal zu entwickeln, ohne daß eine Behandlung mit Zyankalium oder hypertonischem Seewasser nötig gewesen wäre.

Sehr interessant sind die folgenden noch nicht veröffentlichten Versuche. Unbefruchtete Eier (ohne Membran) wurden in $\frac{m}{2}$ Natriumbutyratlösung gebracht und nach verschiedenen Intervallen herausgenommen. Die Lösung war stark alkalisch und erforderte $4,2 \text{ ccm } \frac{n}{10} \text{ HCl}$ (pro 50 ccm Lösung), um mit Neutralrot den Farbumschlag von Gelb zu Rot zu geben.

Eine große Zahl von Eiern bildete eine Membran, aber diese Eier verfielen meist (wenn nicht alle) der Zytolyse. Von den nach 3 bis 4 Stunden herausgenommenen Eiern entwickelte sich aber eine kleine Zahl (etwa 1%) zu schwimmenden Larven. Diese hatten keine Membran oder nur eine eng an-

¹⁾ Loeb, Pflügers Arch. **124**, 50, 1908.

liegende Membran. Der Versuch wurde wiederholt mit einer Natriumbutyratlösung mit stark verminderter Alkalinität. Die Zytolyse (und Membranbildung) war vermindert, aber die Entwicklungserregung fand auch hier statt (natürlich erst, nachdem die Eier in normales Seewasser übertragen waren). Von den Eiern, welche ca. 6 bis 7 Stunden in der Natriumbutyratlösung gewesen waren, entwickelten sich ca. 2⁰/₀ zu schwimmenden Larven ohne Membranbildung. Ich vermute, daß in diesem Fall eine Entwicklung ohne Zellteilung stattfindet. Die Versuche deuten ebenfalls daraufhin, daß sich die Entwicklungserregung mit Membranbildung nur quantitativ von der ohne Membranbildung unterscheidet. Die materielle Veränderung an der Oberfläche des Eies ist in beiden Fällen von der gleichen Art, aber quantitativ geringer ohne als mit Membranbildung. Infolgedessen können die Eier, bei denen diese Veränderung in geringerem Grade erfolgt (aber doch ausreichend für die Entwicklung), sich bei Zimmertemperatur zu Larven entwickeln, während die Eier mit Membranen zu stark gelitten haben, um sich sofort entwickeln zu können. Um das letztere zu ermöglichen, müssen erst besondere Stoffe im Ei gebildet werden. Das Spermatozoon trägt beide Stoffe ins Ei, die membranbildende Substanz und eine Substanz, welche die mit der Membranbildung verbundene schädigende Wirkung hemmt.

Viel leichter als bei den Eiern der kalifornischen Seeigel scheint die Entwicklungserregung ohne Membranbildung bei den Seeigeln in Neapel zu gelingen. Die verschiedenen Autoren, welche in Neapel meine Versuche über künstliche Parthenogenese wiederholten, erhielten nicht so günstige Resultate wie ich sie in Woods Hole erhalten hatte. Als daher im Jahre 1902 mein früherer Schüler und damaliger Kollege, Dr. E. P. Lyon, nach Neapel ging, bat ich ihn, die Versuche über künstliche Parthenogenese bei Seeigeln in Neapel mit allen mir damals bekannten Methoden aufzunehmen. Es gelang Lyon, durch Behandlung der Eier von *Arbacia pustulata* und *Strongylocentrotus lividus* mit hypertonischem Seewasser künstliche Parthenogenese hervorzurufen.¹⁾ Er versuchte auch die Wirkung von Säuren.

¹⁾ E. P. Lyon, Experiments in Artificial Parthenogenesis, Am. Journ. of Physiol. 9, 308, 1903.

„Loeb fand, daß HCl eine wirksame Substanz ist, um künstliche Parthenogenese beim Seestern hervorzurufen, daß aber dieser Stoff bei *Arbacia punctulata* in Woods Hole wirkungslos ist. Aber sonderbarerweise fand ich, daß es eins der besten Agenzien für künstliche Parthenogenese bei *Arbacia pustulata* in Neapel ist. Gewöhnlich wurden 2, 3, 4, 5, 6 und 7 ccm einer $\frac{n}{10}$ HCl-Lösung in Seewasser zu je 100 ccm Seewasser zugefügt. Eier wurden in diese Lösungen gebracht und nach 2 bis 15 Minuten aus der Lösung genommen. Einige der besten Resultate wurden erlangt mit 2 ccm Säure in 100 ccm Seewasser bei einer Exposition von 10 bis 15 Minuten; 3 ccm Säure, Expositions-dauer 7 bis 12 Minuten; 4 ccm Säure, Expositions-dauer 9 Minuten; 7 ccm Säure, Expositions-dauer 5 Minuten . . . In den besten Versuchen entwickelten sich 10% der Eier zu schwimmenden Larven. Viele dieser Eier schwammen an der Oberfläche des Gefäßes, wie Larven, die aus befruchteten Eiern entstehen.“ Diese Methode gab aber keine positiven Resultate bei *Strongylocentrotus lividus* in Neapel. Es gelang Lyon aber, ein paar Larven von den unbefruchteten Eiern von *Strongylocentrotus lividus* durch Behandlung mit kohlensäurehaltigem Seewasser zu erzielen. Die Bedeutung der Membranbildung für die Entwicklung war damals nicht bekannt, aber ich glaube nicht, daß die Eier in Lyons Versuchen Membranen bildeten. Es handelte sich wohl um eine durch Säure angeregte Entwicklung ohne Membranbildung.

Ich möchte nun hier darauf hinweisen, daß man durch bloße Säurebehandlung die Eier von *S. purpuratus* und *franciscanus* in Pacific Grove nicht zur Larvenbildung veranlassen kann. Es besteht zwischen den Eiern der europäischen und kalifornischen Seeigel in dieser Hinsicht ein quantitativer Unterschied. Das zeigt sich auch darin, daß die unbefruchteten Eier der europäischen Seeigel und auch die der Seeigel in Woods Hole bei längerem Liegen in Seewasser anfangen können sich zu furchen; sie gehen ins Zwei- oder Vierzellenstadium, aber nicht weiter. Bei den Eiern von *S. purpuratus* in Pacific Grove tritt etwas derartiges nicht ein.¹⁾

¹⁾ Es gibt aber in Pacific Grove eine Form von Seeigeln aus der Ordnung der Clypeastridea, bei denen ich nach vorläufigen (aber noch nicht sicher gestellten) Beobachtungen den Eindruck gewonnen habe, daß sie sich spontan parthenogenetisch entwickeln können.

Diesen Unterschied im Verhalten der Eier von *Strongylocentrotus* in Neapel und in Kalifornien bestätigt auch eine neuere Arbeit von Herbst¹⁾, auf die wir später zurückkommen. Herbst brachte die Eier von *Sphaerechinus* in 50 ccm Seewasser + 3 ccm $\frac{n}{10}$ Essigsäure und ließ sie 2 bis 8 Minuten in dieser Lösung. Die Eier bildeten keine Membran (sie waren vielleicht viel zu lange in der angesäuerten Lösung), aber einige dieser Eier entwickelten sich zu völlig normalen Larven, nachdem sie in normales Seewasser zurückgebracht wurden, ohne daß es nötig war, diese Eier erst noch mit hypertonischem Seewasser zu behandeln.

Delage hat neuerdings ein Verfahren mitgeteilt, das nach seinen Angaben günstige Resultate für Seeigel gibt. Er nimmt 50 ccm einer Mischung von Zuckerlösung und NaCl-Lösung und fügt 23 Tropfen einer $\frac{n}{10}$ Gerbsäurelösung und 30 Tropfen einer $\frac{n}{10}$ Ammoniaklösung zu. Die Eier bleiben 1 Stunde in dieser Lösung und werden dann in Seewasser übertragen. Seine Zuckerlösung ist 1,135 N, also nach dem, was wir in Kapitel XI gesehen haben, stark hypertonisch. Auch seine NaCl-Lösung ist meiner Erfahrung nach hypertonisch, da dieselbe 0,62 N ist.²⁾

Die Eier entwickelten sich ohne Membranbildung. Leider macht Delage keine Angabe über den Modus der Furchung der so behandelten Eier. War diese Furchung normal? Oder handelte es sich um eine Entwicklung ohne Furchung oder mit schlechter Furchung? Die Arbeit Delages beginnt mit folgendem Satz: „Die Entdeckung einer Methode der Parthenogenese, welche allen denen unvergleichlich überlegen ist, die andere und ich selber für möglich hielten, hat mich in die Lage gesetzt, festzustellen, daß die Mehrzahl der Faktoren dieses Vorganges, welche man bis jetzt für wesentlich hielt, das nicht sind und mir erlaubt, die Unzulänglichkeit jener Theorien zu erkennen, welche die Parthenogenese durch jene Faktoren

¹⁾ Herbst, Vererbungsstudien IV. Arch. f. Entwicklungsmechanik **22**, 473, 1906.

²⁾ Delage, Les vrais facteurs de la parthénogenèse expérimentale. Arch. de Zoologie expériment., 4. Serie, **7**, 446, 1908.

erklärten.“ Ich bedaure, erklären zu müssen, daß dieser Satz in allen Punkten unrichtig ist. Man versteht nicht, worin denn die Methode Delages allen anderen so sehr überlegen ist. Die Samenbefruchtung beginnt mit der Membranbildung und gerade dieser wichtigste Umstand ist bei der Methode Delages vernachlässigt. Bei meiner Methode der Membranbildung und nachheriger Behandlung der Eier mit hypertotonischer Lösung ist es ein Leichtes, 99% bis 100% der Eier zur Entwicklung zu bringen. Delages Methode gibt offenbar ein viel schlechteres Resultat, da er nur angibt, daß er in einigen Versuchen „viele“ Larven erzielte. Wenn alle Eier sich entwickelt hätten, so hätte er das wohl angegeben. Über die Furchung macht er, wie gesagt, überhaupt keine Angaben. Delages Methode ist nicht nur kein Fortschritt, sondern ein Rückschritt. Es handelt sich, wie ich glaube, um eine der vielen möglichen Methoden, die eine Modifikation der Oberfläche des Eies (leichte Zytolyse) bedingen, ohne zu einer Membranbildung zu führen. Im wesentlichen arbeitet er mit hypertotonischen, hyperalkalischen Lösungen: gelegentlich auch mit abnormen, isotonischen, aber stets mit hyperalkalischen Lösungen. Nur in den Versuchen mit hypertotonischen Lösungen erhielt er brauchbare Resultate.

Was den zweiten Teil von Delages Behauptung betrifft, daß er gezeigt habe, daß gewisse Faktoren, die man früher für wesentlich hielt, nunmehr von ihm als unwesentlich erkannt seien, so handelt es sich um ein Mißverständnis von seiten Delages. Weil ich gefunden hatte, daß die hypertotonischen Lösungen nur dann wirksam sind, wenn sie freien Sauerstoff enthalten, so nahm er irrigerweise an, daß ich behauptete, daß jede Art der Entwicklungserregung des Eies freien Sauerstoff erfordere. Delage hat aber übersehen, daß ich schon vor 3 Jahren den Nachweis geführt habe, daß der wesentlichste Akt der Entwicklungserregung, nämlich die Hervorrufung der Membranbildung, auch in der Abwesenheit von Sauerstoff möglich ist. Er hat ferner übersehen, daß ich gezeigt hatte, daß die Seeigeleier nach der künstlichen Membranbildung mit einer Fettsäure durch einen mehrstündigen Sauerstoffmangel zur Entwicklung gebracht werden können. Er weist nun darauf hin, daß, wenn man Seesterneier mit CO_2 zur Entwicklung anregt, kein Sauerstoff nötig sei, oder daß gerade ein vorüber-

gehender Sauerstoffmangel die Entwicklung begünstige. Das ist aber doch nur eine Bestätigung meiner früheren Versuche und Ansichten!

Der zweite Faktor, den man bisher als wesentlich für die Parthenogenese des Seeigeleies angesehen habe und dessen Unwesentlichkeit er nunmehr nachgewiesen habe, ist die hypertotonische Lösung. Nun hat aber Lyon bereits 1903 gezeigt, daß die Seeigeleier in Neapel durch Säuren und Zyankalium zur Entwicklung veranlaßt werden können, ohne daß es nötig ist, dieselben mit einer hypertotonischen Lösung zu behandeln; und ich hatte bereits im März 1906 gezeigt, daß die Seeigeleier in Pacific Grove nach der künstlichen Membranbildung durch eine Behandlung mit sauerstoffarmem isotonischem Seewasser zur Entwicklung gebracht werden können!¹⁾ Nun ist aber Delage ein sonderbarer Irrtum bei dem vermeintlich neuen Nachweis passiert, daß die hypertotonische Lösung für die Entwicklungserregung des Seeigeleies nicht nötig sei. Er hat nämlich in allen Fällen, in denen er eine Zuckerlösung benutzte, mit hypertotonischen Lösungen gearbeitet. Mit diesen Lösungen aber erzielte er seine besten, d. h. brauchbare Resultate.²⁾

Auf Delages Hypothesen ist es wohl kaum nötig einzugehen. Er geht auf die alten Ideen der Fällung von Kolloiden, insbesondere durch die elektrische Ladung von Ionen zurück, die ich in meinen ersten Arbeiten vorübergehend berücksichtigt, dann aber wegen ihrer Unhaltbarkeit nicht weiter erwähnt habe. Auch Fischer und Ostwald haben vor Delage solche Ideen geäußert. Auf die Ansichten der letzteren Autoren kommen wir später zurück.

¹⁾ Ich hatte schon im Jahre 1900 mitgeteilt, daß Annelideneier und Seesterncier durch isotonische Lösungen zur Entwicklung gebracht werden können.

²⁾ Siehe auch meine beiden kritischen Notizen zu den Äußerungen von Delage in *Compt. rend. de l'Acad. des Sciences* **145**, 943, 1907, und **146**, 246, 1908.

XVIII. Über die chemischen Bedingungen der Reifung der Eier.

1. Ehe wir nun die Versuche über die künstliche Parthenogenese bei anderen Formen als den Seeigeln besprechen, müssen wir auf die Reifungserscheinungen der Eier eingehen. Wir haben in der Einleitung erwähnt, daß der eigentlichen Entwicklung, d. h. Furchung des Eies, eine „Reifung“ desselben vorausgehen muß. Diese Reifung ist ein Vorgang, der äußerlich in der Reduktion des Eikerns durch zweimalige Teilung und dem Auswerfen von zwei dieser Teilstücken — den Polkörperchen — aus dem Ei besteht. Dieser Reifungsprozeß zeigt nun eine Analogie mit dem Befruchtungsvorgang insofern, als er in manchen Eiern erst durch das Eindringen des Spermatozoons ins Ei veranlaßt wird, während in anderen Eiern die Reifung spontan — sei es im Eierstock (Seeigel) oder nach der Entleerung ins Seewasser (Seestern) — vor sich geht, und zwar ehe das Spermatozoon in das Ei eindringt oder eindringen kann. Während man im Eierstock des Seeigels häufig oder meistens reife Eier findet, ist das bei Seesternen sehr selten der Fall; dagegen reifen die Eier des Seesterns meist rasch, wenn man sie in Seewasser bringt. Wenn die Eier des Seesterns aus dem Ovarium genommen werden, haben sie im allgemeinen einen großen, deutlich sichtbaren Kern. Die Reifung besteht in der Reduktion der Größe des Kerns durch zweimalige Teilung und das Auswerfen der Polkörperchen. Die Zeit, welche vergeht, ehe diese Vorgänge im Seewasser eintreten, ist für die Eier verschiedener Seesterne verschieden, was wohl darauf zurückzuführen ist, daß die Eier verschiedener Weibchen nicht alle in demselben Reifezustand sich befinden. Versuche, welche ich vor einigen Jahren über die Reifung der Seesterneier (*Asterias Forbesii*) im Seewasser anstellte, ergaben das Resultat, daß zwei im Seewasser enthaltene Stoffe die Reifung beschleunigen, nämlich die Hydroxylionen und der Sauerstoff. Macht man das Seewasser durch Zusatz von Säure neutral oder schwach sauer, so bleibt die Reifung, die sonst rasch eintritt, meist aus. Verteilt man die Eier desselben Seesterns in Lösungen, welche sich nur durch die Konzen-

tration der HO-Ionen unterscheiden, so kann man bemerken, daß die Geschwindigkeit, mit der die Reifung eintritt, innerhalb gewisser Grenzen mit der Konzentration der HO-Ionen zunimmt. Wir werden später sehen, daß es bei den reifen Eiern des Seesterns gelingt, durch Säure die Entwicklung anzuregen; dasselbe Mittel also, welches beim reifen Ei die weitere Entwicklung anregt, hemmt die Reifung des Eies.

Es fiel mir nun bald auf, daß in verschiedenen Schalen der Prozentsatz der reifenden Eier desselben Weibchens auch bei derselben Konzentration der Hydroxylionen nicht immer der gleiche war. Das wies auf die Existenz einer anderen Variablen hin, die neben der Konzentration der Hydroxylionen hier in Betracht kommt. Es stellte sich bald heraus, daß, wo die Eier auf einem Haufen lagen, die Reifung langsamer erfolgte, als wo die Eier in einer dünnen Schicht ausgebreitet lagen. Das erweckte die Vermutung, daß die Sauerstoffversorgung der Eier für die Reifung von Bedeutung sei. Versuche, in denen der Sauerstoff des Seewassers durch Wasserstoff verdrängt wurde, sowie Versuche, in denen KCN zum Seewasser zugesetzt wurde, ergaben, daß in solchen Fällen die Reifung der Eier unterblieb, trotz der Gegenwart der Hydroxylionen.¹⁾

2. Bei vielen Anneliden dringt das Spermatozoon in das unreife Ei ein und veranlaßt hier das Auswerfen der Polkörperchen und weiterhin die Entwicklung. Die Eier von Polynoe können aber auch im Seewasser ohne Spermatozoon zur Reifung gebracht werden, wenn man dem Seewasser etwas NaHO zusetzt, nämlich etwa $1,5 \text{ ccm } \frac{n}{10} \text{ NaHO}$ zu 50 ccm Seewasser. Die Eier von Polynoë haben, wenn sie dem Tier entnommen werden, eine unregelmäßige Form; sie sind von einem dicken Chorion umgeben und haben einen großen Kern. In normalem Seewasser löst oder verflüssigt sich das Chorion im Laufe von mehreren Stunden (bei 15° C), die Eier werden kugelförmig, und der große sichtbare Kern wird unsichtbar. Die Reifung des Eies beginnt, wird aber nicht vollendet, da es nicht zur Ausscheidung der Polkörperchen kommt. Erhöht

¹⁾ Loeb, Über Eireifung, natürlichen Tod und Verlängerung des Lebens beim unbefruchteten Seesternei usw. Pflügers Arch. **93**, 59, 1902. — Untersuchungen S. 237.

man aber die Konzentration der Hydroxylionen im Seewasser (durch Zufügung von NaHO), so werden auch die Polkörperchen ausgeworfen, und die Eier können sich in einer solchen Lösung zu Larven entwickeln. Fügt man aber kein Alkali zum Seewasser, so gehen die Eier im Laufe der nächsten 24 Stunden zugrunde, indem sie in kleine Tröpfchen oder Fragmente zerfallen. Aus diesen Versuchen folgt, daß die in normalem Seewasser vorhandene geringe Konzentration der Hydroxylionen die Reifungsvorgänge im Ei in den Gang setzt, daß sie aber nicht ausreicht, dem Ei die Vollendung dieser Prozesse zu gestatten. Man kann aber dieselbe Wirkung auch mittels Saponin hervorrufen. Wenn man eine Spur von Saponin in Seewasser löst und die Eier von Polynoë (die einige Stunden im Seewasser waren) etwa 1 Minute in eine äußerst schwache Saponinlösung bringt und sie hinterher durch sorgfältiges Waschen von allen Spuren von Saponin befreit, so bilden die Eier eine prachtvolle Befruchtungsmembran und werfen nach 5 bis 30 Minuten die Polkörperchen aus.¹⁾

Bei den Eiern einer anderen Annelide, Chätopterus, beginnt die Reifung im Seewasser, sie kann aber nicht zu Ende geführt werden, wenn nicht ein Spermatozoon eintritt. Wie schon erwähnt, beobachtete Mead, daß das Hinzufügen von etwas Kalium zum Seewasser die Reifung zu Ende führt. Bei *Thalassema* dringt das Spermatozoon ebenfalls in das unreife Ei ein und verursacht das Auswerfen der Polkörperchen sowohl wie die Entwicklung. Lefevre fand, daß Behandlung der Eier mit Säure sowohl deren Reifung als auch deren Entwicklung hervorruft.²⁾

Es ist bemerkenswert, daß nach unseren bisherigen Erfahrungen bei denjenigen Eiern, bei welchen das Eindringen eines Spermatozoons sowohl die Reifung als auch die Entwicklung hervorruft, dieselben chemischen Stoffe, welche die künstliche Reifung hervorrufen, auch die Entwicklung hervorrufen; während das bei den Seesterneiern, bei denen das Spermatozoon erst nach der Reifung ins Ei tritt, anscheinend nicht der Fall ist.

¹⁾ Loeb, Über die Entwicklungserregung unbefruchteter Anneliden-eier (Polynoë) mittels Saponin und Solanin. Pflügers Arch. **122**, 448, 1908.

²⁾ Lefevre, Artificial Parthenogenesis in *Thalassema mellita*. Journ. of Experimental Zoology **4**, 91, 1907.

3. In der Natur ist es so eingerichtet, daß die Eier bei Ablage (im allgemeinen, wenn nicht immer) sofort befruchtungsfähig sind. Was wir also bei diesen Versuchen durch künstliche Mittel erreichen, muß bei dem natürlichen Ablauf der Dinge durch den Organismus geleistet werden. Ich habe angefangen, diese Mittel zu untersuchen, und es scheint mir, als ob es sich um Wirkungen des Blutes resp. der Zirkulationsflüssigkeiten handelte. Wenn ein Beobachter zufällig Eier erhält, die im Organismus schon nahezu zur Reife gebracht sind, so wird er natürlich beobachten können, daß sie auch ohne die von uns benutzten Hilfsmittel den Reifeprozess vollenden können. Es wäre aber irrig, aus einer gelegentlichen Beobachtung zu schließen, wie das Mathews tut, daß Alkali nicht nötig sei für die Reifung, weil er in einem Falle beobachtete, daß (alle?) Eier eines Seesterns in einer angeblich neutralen NaCl-Lösung ihre Reifung vollendeten. Das hat doch nichts Überraschendes, da ja die Eier desselben Weibchens bei Seesternen sehr verschiedene Reifegrade zeigen, indem einige sofort, andere langsam und wieder andere spät oder gar nicht in Seewasser reifen; während man durch passende Erhöhung der Konzentration der Hydroxylionen die Reifung ausnahmslos beschleunigen kann.

Die Physiologie wird eines Tages die Frage beantworten müssen, wie es kommt, daß bei manchen Eiern die Anregung zur Reifung auch für die Entwicklungserregung genügt, während bei anderen Eiern nach Ablauf der Reifung das Ei in ein Ruhestadium gerät, aus dem es erst durch die Befruchtung geweckt wird. Die Versuche über das Keimen ölhaltiger Samen geben uns eine Einsicht in eine der hier vorhandenen Möglichkeiten. Wenn nämlich zur Aktivierung eines oder mehrerer für die Entwicklung und Nukleinsynthese nötigen Enzymen ein Stoff (z. B. eine Säure) erst gebildet werden muß, so läßt sich verstehen, daß das Fehlen dieses Stoffes eine Pause im Lebenszyklus des Organismus bedingen muß. Das Hereinbringen dieses Stoffes von außen, oder die Anregung zur Bildung dieses Stoffes im Innern der Zelle, wirkt dann entwicklungsregend.

4. Es scheint ganz allgemein der Fall zu sein, daß Behandlung der im Ovozytenstadium befindlichen Eier mit Natronlauge deren Reifung veranlaßt; ich habe nämlich ähnliche Resultate wie die bei Polynoë erwähnten bei den Eiern von Nereis.

und bei den Eiern von *Sipunculus* erhalten. Unreife Eier, die im Seewasser nicht zur Reife gebracht werden konnten, wurden zur Reife gebracht, wenn sie einige Stunden bei etwa 15° C hyperalkalischen Lösungen ausgesetzt wurden. Bei dem Reifen der Eier von *Nereis* machte ich eine Beobachtung, welche vielleicht für den Mechanismus der Reifeerscheinungen und der Membranbildung von Bedeutung ist. Beim unreifen Ei von *Nereis* ist ein grünlich-blaues Pigment gleichmäßig über die ganze Oberfläche verteilt. Diese Pigmentschicht enthält viele kleine, stark lichtbrechende Tröpfchen, wie ich vermute, Fetttröpfchen. Behandelt man nun die Eier mit hyperalkalischem Seewasser, so daß sie reifen, so bemerkt man folgende Veränderungen: erstens wird eine Membran abgehoben, vergleichbar der Befruchtungsmembran des Seeigels; zweitens findet — aber viel später als die Membranbildung — ein Zusammenfließen der zahlreichen Tröpfchen (Fetttröpfchen?) zu wenigen größeren Tröpfchen statt; drittens zieht sich die grünliche Masse, welche vorher einen gleichmäßigen Belag über das ganze Ei bildete, samt den Fetttröpfchen in eine Hemisphäre des Eies zurück. Es kommt zur Bildung von zwei Phasen an der Oberfläche des Eies, von denen eine anscheinend relativ fett- und pigmentfrei, die andere deutlich fett- und pigmenthaltig ist.

Diese Beobachtung führte mich zuerst auf die Vermutung, ob nicht vielleicht die Bedeutung der fettlösenden Stoffe sowie teilweise auch die des Alkalis bei der Reifung der Eier und der Membranbildung in der Verflüssigung fester Fetttlamellen besteht? Beim Ei der *Nereis* kommt es zu einem Zusammenfließen der Tröpfchen und zu einem Zurückziehen der größeren Tropfen und der Pigmentmasse auf eine Hemisphäre des Eies, wie wir das ja aus der Wirkung der Oberflächenspannung leicht begreifen können. Zwischen der künstlichen Einleitung der Reifung und der Hervorrufung der Membranbildung besteht offenbar eine weitgehende Analogie. In beiden Fällen scheinen Lösungsvorgänge des Chorions resp. einer an der Oberfläche des Eies gelegenen Substanz eine Rolle zu spielen. Für die Kernreduktion kommen aber Oxydationsvorgänge in Betracht. Die Reifungserscheinungen am Kern bestehen aus zwei hintereinander folgenden Kernteilungsprozessen, und für diese Prozesse ist offenbar freier Sauerstoff nötig. Das Alkali dient bei der

Reifung offenbar für zwei Prozesse, nämlich erstens für das Zusammenfließen der zwischen der Oberflächenlamelle und dem Protoplasma gelegenen Tröpfchen; dabei könnte das Alkali ver-seifend wirken, und die Seife könnte durch Änderung der Oberflächen-spannung wirken. Diese Wirkung teilt die Natronlauge mit dem Benzol. Zweitens aber übt das Alkali vermutlich eine Wirkung aus, die dem Benzol nicht zukommt, indem es die Oxydationsvorgänge beschleunigt.

Man gewinnt fast den Eindruck, als ob die mechanische Änderung die Möglichkeit zu den Oxydationen und sonstigen Verwendungen des Fettes oder Lezithins gewährte, welche der Reife des Eies zugrunde liegen; sei es, daß die Lipoide erst in diesem gelösten Zustande für die Hydrolyse und Verbrennung geeignet werden; oder sei es, daß mit der Beseitigung der festen Fettschicht der Sauerstoff leichter in das Ei eindringen kann; oder sei es, daß beide und noch andere Möglichkeiten zutreffen.

XIX. Versuche an Seesterneiern.

1. Die Versuche über die künstliche Parthenogenese an anderen Formen ist im wesentlichen eine Rekapitulation der Erfahrungen, welche wir an den Eiern der Seeigel gewonnen haben. Wir finden, daß nicht alle die Methoden, welche wir bei dem Seeigeli anwendeten, mit dem gleichen Erfolg bei den Eiern aller Formen anwendbar sind; aber die eine oder die andere dieser Methoden führt im allgemeinen, wenn auch mit Modifikationen, bei den Eiern anderer Arten zum Ziel. Das stimmt mit der bei der heterogenen Hybridisation gemachten Erfahrung überein, daß die verschiedensten, vermutlich alle beliebigen Spermatozoen das Ei zur Entwicklung anregen können. Das ist nur unter der Annahme verständlich, daß in den verschiedenen Spermatozoen derselbe Stoff, oder ein derselben chemischen Gruppe angehöriger Stoff (z. B. eine höhere Fettsäure) die Entwicklungserregung bedingt.

Ich beginne mit Versuchen an den Eiern eines kalifornischen

Seesterns, *Asterina*¹⁾, dessen Eier nach dem Eindringen eines Spermatozoons eine prachtvolle Befruchtungsmembran bilden.

Es wurde zunächst festgestellt, daß die Bildung der Befruchtungsmembran durch dieselben Mittel bei den Eiern von *Asterina* hervorgerufen werden kann, wie bei den Seeigeleiern, nur sind andere Konzentrationen dieser Stoffe nötig.

Werden die reifen Eier von *Asterina* in 50 ccm Seewasser gebracht, das mit 1 ccm Benzol oder Amylen geschüttelt wurde, so bilden alle sofort Membranen, die in ihrem Aussehen gänzlich den nach dem Eintritt von Spermatozoen gebildeten Membranen gleichen. Werden die Eier nicht unmittelbar nach der Membranbildung aus dem Benzol- oder Amylen-Seewasser herausgenommen, so unterliegen sie der Zytolyse.

Wird an Stelle der Kohlenwasserstoffverbindungen eine Fettsäure angewendet, so bildet sich keine Membran, solange die Eier von *Asterina* sich in dem angesäuerten Seewasser befinden; doch wird die Membran sofort gebildet, nachdem die Eier wieder in normales Seewasser übergeführt sind, vorausgesetzt, daß die Periode der Säurewirkung richtig getroffen war. Wenn die Eier 2 Minuten in einer Mischung von 50 ccm Seewasser + 5 ccm $\frac{n}{10}$ Essigsäure gebracht wurden, so bildeten sie nach der Übertragung in normales Seewasser prachtvolle Membranen. Buttersäure und Capronsäure wirkten ähnlich, HCl und HNO₃ dagegen wirkten schwächer oder gar nicht.

Wenn die Eier von *Asterina* aus dem Ovarium genommen werden, so sind sie, wie wir sehen, unreif, d. h. sie haben einen zu großen Kern. Solche Eier können nicht durch Samen befruchtet werden; ebensowenig gelingt es bei solchen Eiern durch Fettsäure die Befruchtungsmembran hervorzurufen. Die Befruchtung sowohl wie die künstliche Membranbildung gelingt erst nach der Auflösung des großen Kerns (nachdem er äußerlich unsichtbar geworden ist) und nach Beginn des Auswerfens der Polkörperchen.

Nach der künstlichen Membranbildung fangen die Seesternerier an, sich zu entwickeln. Aber hierbei zeigen sie einen

¹⁾ Loeb, Künstliche Membranbildung und chemische Befruchtung bei einem Seestern (*Asterina*), Untersuchungen S. 349. Univ. of Calif. Publ. Physiol. 2, 1905.

fundamentalen Unterschied in ihrem Verhalten von den Seeigeleiern, bei denen man eine Fettsäuremembran hervorgerufen hat. Während bei den Seeigeleiern (in Kalifornien) nach der Membranbildung das Ei bei Zimmertemperatur nicht ohne weiteres imstande ist, sich zu einer Larve zu entwickeln — die mit der Membranbildung vorhandene Schädigung muß erst überwunden werden —, ist das Seesternei in einer günstigeren Lage. Ein Teil der Seesterneier, welche infolge der Behandlung mit Buttersäure eine Membran gebildet haben, furchen sich regelmäßig und entwickeln sich zu normalen Larven; die anderen aber zerfallen, wie die Seeigeleier, nach der Membranbildung. Ein Beispiel soll das klar machen.

In einem Versuche begannen die Eier einer *Asterina* zwischen 10,30 und 10,40 vormittags ihre Polkörperchen auszustoßen. Zu dieser Zeit wurde ein Teil der Eier mit Sperma befruchtet, während ein anderer $1\frac{1}{2}$ bis $1\frac{1}{2}$ Minuten der Wirkung von 6 ccm $\frac{n}{10}$ Buttersäure + 50 ccm Seewasser ausgesetzt wurde. In beiden Gruppen bildeten alle Eier — wenige unreife abgerechnet — eine typische Befruchtungsmembran. In etwa 2 Stunden gingen alle mit Sperma befruchteten Eier in das Zweizellenstadium über, und ungefähr gleichzeitig fingen etwa 10% der mit Buttersäure behandelten ebenfalls an, sich zu furchen. Die Furchung ging in beiden Gruppen weiter. 5 Stunden nach der Behandlung mit Buttersäure resp. mit Samen war die Situation folgendermaßen: Die mit Sperma befruchteten Eier waren alle in dem 16-Zellenstadium. Von den mit Buttersäure behandelten waren nur 10% gefurcht; diese befanden sich im 8- bis 16-Zellenstadium. Der Rest war ungefurcht und zeigte keine Veränderung. Sehr bald nachher trat jedoch eine Änderung hier ein. Kleine, klare Tröpfchen wurden unregelmäßig an der Oberfläche des Eies gebildet, denen vergleichbar, welche bei der Erwärmung der Seeigeleier oder bei der Alkoholzytolyse austreten. Alle die *Asterinaeier*, welche diese Tropfenbildung zeigten, gingen zugrunde. Manchmal zeigte nur ein Teil des *Asterinaeies* diese Tropfenbildung. In diesem Falle zerfiel nur der Teil des Eies, welcher die Tropfenbildung an der Oberfläche zeigte. Die Eier, welche keine Tropfenbildung zeigten und sich normal furchten (also 10% der Eier mit Buttersäuremembran), entwickelten sich

zu normalen Larven, genau so wie die mit Samen befruchteten Eier, welche sich alle zu normalen Larven entwickelten.

Man sieht sehr deutlich, daß zwischen dem Verhalten der Seeigeleier und der Eier von *Asterina* nach der künstlichen Membranbildung nur ein gradueller Unterschied besteht. Während die Eier von *Strongylocentrotus purpuratus* alle nach der Membranbildung zugrunde gehen — wenn man sie nicht etwa 3 bis 6 Stunden in sauerstoffarmes oder zyanalkiumhaltiges Seewasser bringt und so die sofortige Entwicklung hemmt, oder wenn man sie nicht etwa 35 bis 40 Minuten lang mit hypertonischem Seewasser behandelt —, geht nur ein Teil der Eier von *Asterina* in dem Falle zugrunde, der Rest dagegen kann sich auch bei Zimmertemperatur entwickeln. Die Eier der Seeigel in Neapel scheinen eine Stellung zwischen diesen beiden einzunehmen, da nach der Angabe von Herbst ein kleiner Prozentsatz der Eier der dortigen Seeigel imstande ist, sich nach der künstlichen Membranbildung ohne weiteres zu entwickeln. Der graduelle Unterschied scheint sich auf die relative Widerstandsfähigkeit oder Erholungsfähigkeit zu beziehen, welche die Eier verschiedener Formen gegen die Tendenz zur Zytolyse zeigen, welche durch die Membranbildung anscheinend bedingt ist.

2. Ein Beweis für die Richtigkeit dieser Behauptung liegt in neueren Versuchen von Ralph Lillie. Dieser Autor arbeitete an einer Seesternform des Atlantischen Ozeans, *Asterias Forbesii*. Er fand, daß eine kurze Erwärmung der Eier dieses Seesterns auf 35° bis 38° C dieselben veranlaßt, eine typische Befruchtungsmembran zu bilden. Die hierzu nötige Expositionsdauer war für 35° etwa 70 Sekunden, für 36° etwa 40 bis 50 Sekunden, für 37° etwa 30 Sekunden und für 38° etwa 20 Sekunden. (Diese Eier vertragen höhere Temperaturgrade als die Eier von *Strongylocentrotus purpuratus*, welche bei der Temperatur, welche die Membranbildung hervorruft [34° bis 35° C], zu rasch getötet werden, um sich nachher noch entwickeln zu können.) Lillie beobachtete nun, daß ein Teil der Seesternerier, bei welchen er durch die Temperaturerhöhung eine Membranbildung hervorrief, sich hinterher ohne jeden weiteren Eingriff entwickelte. Der Zeitpunkt der Membranbildung mußte jedoch, wie in meinen Versuchen mit *Asterina*, sorgfältig gewählt werden;

nämlich der Zeitpunkt ist günstig, wenn die Eier bereit sind, das erste Polkörperchen abzugeben.

Wenn aber Lillie die Eier nach der künstlichen Membranbildung eine Zeit lang in Seewasser brachte, dem so viel KCN zugesetzt war, daß die Lösung in bezug auf KCN etwa $\frac{n}{2000}$ war, so entwickelten sich viel mehr Eier, als ohne diese Behandlung.¹⁾

Das ist nun genau dasselbe Resultat, das ich bei den Seeigeleiern nach der künstlichen Membranbildung erhielt. (Siehe Kap. IX.)

In der Beurteilung seiner Versuche ist nun Lillie dadurch in die Irre gegangen, daß er meine Versuche mit Zyankalium übersehen hat; und daß er ebenfalls meinen früher geführten Nachweis übersehen hat, daß die Membranbildung auch in der Abwesenheit von Sauerstoff erfolgen kann. Dieser Vorgang der Membranbildung ist eben nur eine Art Zytolyse und deshalb nicht an die Gegenwart von Sauerstoff gebunden. Lillie aber schließt folgendermaßen: „Da die wesentliche Wirkung des Zyankaliums darin besteht, intrazelluläre Oxydationen zu verhindern, so schließen wir, daß anaerobische Prozesse eine wichtige Rolle in der Reihe von Änderungen führen, welche den Anstoß für die Entwicklung des Seesterneies geben.“ Dieser Schluß ist irrig, wie die Versuche für das Seeigelei gezeigt haben. Die Unterdrückung der Oxydationen im Ei unmittelbar nach der Membranbildung hilft dem letzteren vielmehr nur in der Weise, daß damit dem Ei Zeit gegeben wird, sich von den schädlichen Nebenwirkungen des Membranbildungsprozesses zu erholen, ehe es anfängt, sich zu entwickeln. Der Beweis für die Richtigkeit dieser Anschauung liegt eben darin, daß eine kurze Behandlung des Eies mit hypertonischer Lösung diese sekundären Nebenwirkungen noch viel besser und rascher beseitigt als die Zyankaliumbehandlung. Für die Wirksamkeit der hypertonischen Lösung ist aber Sauerstoff absolut erforderlich. Es besteht also nicht, wie Lillie annimmt, ein Gegensatz im

¹⁾ R. S. Lillie, Momentary Elevation of Temperature as a Means of Producing Artificial Parthenogenesis in Starfish Eggs and the Condition of its Action. Journ. of Experimental Zoology 5, 375, 1908.

Verhalten der Seeigel- und Seesterneier, sondern völlige Übereinstimmung.

3. Meine ersten Versuche an Seesterneiern waren 1901 angestellt worden. Neilson und ich fanden, daß die Eier von *Asterias Forbesii* dadurch zur Entwicklung gebracht werden können, daß man dieselben nach der Reifung 3 bis 20 Minuten in Seewasser bringt, dem man etwas Säure zusetzt (100 ccm Seewasser + 3 bis 5 ccm $\frac{n}{10}$ HCl oder HNO₃). Werden die Eier dann in normales Seewasser übertragen, so fängt ein Teil derselben an, sich zu Larven zu entwickeln.¹⁾

Delage fand²⁾, daß die reifen Eier von *Asterias glacialis* sich zu Larven entwickeln, wenn man statt der von uns benutzten Säuren Kohlensäure benutzt. Er bringt die Eier nach der Reifung auf 5 bis 45 Minuten in Seewasser, das mit CO₂ gesättigt war. Die Kohlensäure ist, wie meine und Godlewskis Versuche gezeigt haben, eine für die Membranbildung geeignete Säure; sie diffundiert leicht ins Ei und bringt hier diejenigen Veränderungen hervor, welche der Membranbildung zugrunde liegen. Die Entwicklungserregung durch CO₂ bei den Eiern von *Asterias* ist der Entwicklungserregung der Seeigeleier durch denselben Stoff oder eine einbasische Fettsäure an die Seite zu stellen.

Diese Annahme wird unterstützt durch die Beobachtung von Delage, daß die Zahl der Asteriasseier, welche sich nach der Kohlensäurebehandlung entwickeln, noch vermehrt wird, wenn man aus der Lösung den Sauerstoff entfernt (Delage, 1907). Das entspricht der von mir beim Seeigelei gemachten Beobachtung, daß nach der Membranbildung der Sauerstoffmangel dem Ei Gelegenheit gibt, sich von der drohenden Zytolyse zu erholen. Dasselbe findet auch beim Seesternei statt, bei dem aber die schädlichen Nebenwirkungen offenbar

¹⁾ Loeb und Neilson, Pflügers Arch. **87**, 594, 1901; Untersuchungen S. 278.

²⁾ Yves Delage, Nouvelles recherches de la parthénogenèse expérimentale chez *Asterias glacialis*. Arch. Zoologie expériment. **1902**, 213.—Élevage des larves parthénogénétiques d'*Asterias glacialis*, ibid. **1904**, 27.—Nouvelles expériences de parthénogenèse expérimentale, ibid. **1905**, CLXIV.—Compt. rend. **145**, 218, 1907.

nicht so stark sind wie beim Seeigelei. So ist es also verständlich, daß, wenn die Seesterneier während und einige Zeit nach der CO_2 -Einwirkung ohne Sauerstoff gehalten werden, mehr Eier sich entwickeln, als wenn Sauerstoff sofort zugelassen wird. Der Grund liegt darin, daß die CO_2 -Behandlung im Ei eine Tendenz zur Zytolyse anregt. Beginnen Eier sich in diesem Zustande zu entwickeln, so können einige das Larvenstadium erreichen, während viele zugrunde gehen; hindert man aber die Entwicklung einige Zeit, so können sich alle Eier von der drohenden Zytolyse erholen.

Leider hat Delage meine Versuche über die günstige Wirkung des Sauerstoffmangels und des KCN nach der Membranbildung beim Seeigelei übersehen und hat deshalb nicht bemerkt, daß seine Resultate mit meinen Versuchen harmonieren. Seine auf ungenügende Kenntnis meiner Arbeiten basierte Polemik muß diejenigen Autoren, welche meine Arbeiten nicht gelesen haben, in die Irre führen.

4. Im Anhang seien hier Versuche von A. P. Mathews erwähnt, welche einstweilen keiner bestimmten Deutung zugänglich sind. Wie wir schon erwähnten, besitzen die Seesterneier eine gewisse Tendenz, sich ohne nachweisbaren äußeren Eingriff spontan zu Larven zu entwickeln. Der Prozentsatz dieser „natürlich“ parthenogenetischen Eier ist schwankend und stets sehr klein. Ich habe auch oft bemerkt, daß solche Eier plötzlich in einen Haufen von Zellen auf einmal verfallen, was vielleicht darauf hindeutet, daß eine Kernteilung ohne eine Zellteilung stattgefunden hat. Ich bezweifle, ob solche Larven sich über das Blastula- oder Gastrula-Stadium hinaus entwickeln. Mathews fand nun, daß die Zahl der sich entwickelnden Larven bei *Asterias Forbesii* vermehrt werden kann, wenn man dieselben schüttelt. Der Betrag des Schüttelns, der hierzu erforderlich ist, schwankt bei verschiedenen Kulturen: manchmal ist sehr kräftiges Schütteln in einem Reagensglase erforderlich, und manchmal genügt auch das bloße Übertragen der Eier von einem Gefäß in ein anderes mittels einer Pipette. Die beste Zeit zum Erzielen dieses Resultats ist etwa 3 Stunden nach der Entfernung der Eier aus dem Ovarium, vermutlich weil sie dann reif sind.

Den Schlüssel zum Verständnis dieser Versuche gibt viel-

leicht die Beobachtung von Mathews, daß solche Eier eine Befruchtungsmembran bilden und dann wie befruchtete Eier aussehen.¹⁾ In der Bildung dieser Membran müssen wir also wohl den Anstoß zur Entwicklung bei diesen Versuchen erblicken. Wie aber kann bloßes Schütteln die Membranbildung hervorrufen? Ich glaube, daß wir das verstehen können unter der Annahme, daß es sich dabei um ein Zusammenfließen von vorher (durch eine feste oder flüssige Lamelle) getrennten Tröpfchen handelt. Es ist denkbar, daß bei den Eiern gewisser Formen die Lamellen, welche das Zusammenfließen dieser Tröpfchen hindern, leichter beseitigt werden, als bei den Eiern anderer Formen, und bei den Eiern der ersteren Formen könnte dann bloßes Schütteln genügen, um die Membranbildung und damit die Entwicklung hervorzurufen.

Diese Annahme findet eine Stütze in einer Beobachtung, welche ich neuerdings gemacht habe. Wenn man das Ovarium eines Seesterns einem mäßigen Druck unterwirft und dann die Eier aus demselben austreten läßt, so findet man, daß eine mehr oder weniger große Zahl derselben eine Membran gebildet hat, geschwollen und zytolysiert ist. Ich glaube, daß diese Beobachtung unter der Annahme verständlich wird, daß der Druck auf das Ei eine in demselben vorhandene, an der Grenze der Haltbarkeit stehende Emulsion zerstört. Diese Membranbildung unter den Bedingungen dieses Versuchs spricht für die Vermutung, daß die Befruchtungsmembran bereits an der Oberfläche des unbefruchteten Eies präformiert ist.

Ich möchte im Zusammenhang hiermit noch eine von verschiedenen Autoren, insbesondere Delage, geäußerte Bemerkung richtigstellen, daß „jeder Reiz das Ei zur Entwicklung bringt“. Für das Seeigellei ist dieser Ausspruch natürlich unrichtig, und er ist auch für dieses Ei von keinem Autor aufgestellt worden. Wohl aber hat man derartiges für das Seesternei behauptet. Der Ausdruck ist in den Grenzen richtig, in denen er auch für die Vorgänge der Zytolyse richtig ist. Zytolyse kann durch sehr verschiedene Agenzien herbeigeführt werden, durch Entladungsschläge, gewisse Chemikalien, durch

¹⁾ A. P. Mathews, Artificial Parthenogenesis Produced by Mechanical Agitation. Am. Journ. of Physiol. 6, 142, 1901.

Erwärmung und durch osmotische Einwirkungen. Der Grund liegt wohl darin, daß vielleicht die Zytolyse einfach darauf zurückzuführen ist, daß das Zusammenfließen kleiner Tröpfchen einer Emulsion zu größeren möglich wird und daß sehr verschiedene Eingriffe dieses Resultat herbeiführen, da eben nur die Beseitigung trennender Lamellen hierzu nötig ist. Die Membranbildung scheint einen ähnlichen Prozeß zur Grundlage zu haben. Aber es ist deshalb doch ebenso falsch, zu sagen, daß „jeder beliebige Eingriff“ die Eier des Seesterns zur Entwicklung veranlaßt, als es falsch wäre zu behaupten, daß jeder beliebige Eingriff die Zytolyse oder Hämolyse bedingt.

XX. Versuche an Annelideneiern.

1. Auch hier wollen wir die Resultate der neueren Versuche zuerst besprechen, aus demselben Grunde, der uns zu diesem Verfahren bei den Seesterneiern führte, weil naturgemäß die neueren Versuche nach besseren und wissenschaftlich klareren Methoden durchgeführt sind, als die älteren. Aber selbst mit diesen Vorzügen sind die Versuche an Anneliden noch nicht so vollkommen wie die an Echinodermen. Man erhält bei den Anneliden zu oft eine Entwicklung, bei der zuerst die Furchung der Zellen ausbleibt, bei der zuerst also Kernteilungen ohne Zellteilungen stattfinden. Die Ursache hierzu muß in technischen Unvollkommenheiten der jetzigen Methoden gesucht werden. Aber die Methoden reichen aus, um zu zeigen, daß die Agenzien für die künstliche Parthenogenese bei dem Annelidenei mit denen für das Seeigellei im Prinzip identisch sind.

Wir haben bereits erwähnt, daß die Eier von Polynoë, einer Annelide der kalifornischen Küste, wenn sie aus dem Tier genommen werden, unreif sind; dieselben sind von einem dicken Chorion umgeben und haben einen großen Kern. Im Seewasser löst sich das Chorion im Laufe mehrerer Stunden, das Ei wird kugelförmig und der Kern wird unsichtbar. Die Reifung geht aber ohne weiteren Anstoß nicht weiter. Ich brachte nun Eier von Polynoë in Seewasser und ließ sie dort bei 15° C etwa 2 bis 4 Stunden, bis sie abgerundet waren. Dann wurden sie in ein Uhrschildchen mit 4 ccm Seewasser

gebracht, dem 15 Tropfen einer sehr schwachen Saponinlösung in Seewasser zugesetzt wurden. Die Eier nun, welche 1 Minute mit Saponin behandelt und dann gewaschen waren, bildeten eine prachtvolle Befruchtungsmembran und fingen in 5 bis 30 Minuten an, die Polkörperchen auszuwerfen. In etwa 18 bis 24 Stunden entwickelten sich viele Eier zu schwimmenden Larven. Viele entwickelten sich ohne Furchung, einige mit Furchung. Oft sah man Eier, die im Zweizellstadium oder im Vierzellstadium stehen geblieben waren, als Larven umherschwimmen, dabei bestanden sie immer noch bloß aus zwei Zellen. Die Eier entwickelten sich sehr langsam, in etwa 18 bis 24 Stunden, zu Larven.¹⁾ Bei derselben Temperatur erreichten die befruchteten Eier das Trochophorenstadium in 8 Stunden. Aber diese Versuche, durch bloße Hervorrufung der Membranbildung durch Saponin (oder Solanin) die Eier von Polynoë zur Entwicklung anzuregen, gelangen nicht immer, und oft war die Zahl der sich entwickelnden Larven sehr klein.

Ich vermutete nun, daß hier die Verhältnisse ähnlich liegen wie beim Seeigelei, und daß der Vorgang der Membranbildung die Eier in einem geschädigten Zustand, d. h. mit einer Tendenz zur Zytolyse, zurückläßt. Ich versuchte deshalb, ob Behandlung dieser Eier nach der Membranbildung mit hypertonischem Seewasser die Entwicklung normaler macht. Das ist nun der Fall. Da das Spermatozoon in das unreife Ei eindringt, so unterwarf ich in diesen Versuchen die frisch aus dem Tier genommenen unreifen Eier der Saponinbehandlung. Zu 5 ccm Seewasser wurden 2 Tropfen einer sehr schwachen Saponinlösung zugesetzt, und die Eier wurden nach 4 Minuten in normales Seewasser übertragen und durch viermaliges Waschen von Saponin befreit. In der Saponinlösung bildeten die Eier keine Membranen, aber das Chorion wurde aufgelöst und die Eier rundeten sich ab. Dann wurden die Eier in hypertenisches Seewasser gebracht, (50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl) und von hier wurde nach 1 Stunde, 1^h 44', 2^h 20', 2^h 42' und 3 Stunden je eine Portion der Eier in normales Seewasser zurückgebracht. In der hypertensischen Lösung

¹⁾ Loeb, Über die Entwicklungserregung unbefruchteter Annelideneier (Polynoë) mittels Saponin und Solanin. Pflügers Arch. **122**, 448, 1908.

bildeten alle die Befruchtungsmembran, eine Nachwirkung der Saponinbehandlung. Aber auch die zur Kontrolle in normales Seewasser gebrachten Eier bildeten hier die Membran.

Die Kontrolleier wie die nur 1 Stunde mit hypertonischem Seewasser behandelten Eier fürchten sich nicht und entwickelten sich in diesem Versuche nicht zu Larven. Die 2 Stunden und 20 Minuten lang mit hypertonischem Seewasser behandelten Eier dagegen fürchten sich fast alle und waren bereits 4 Stunden nach der Herausnahme aus dem hypertonschen Seewasser im 8- bis 16-Zellstadium. 4 Stunden später hatten diese Eier das Trochophorenstadium erreicht und schwammen lebhaft umher. Eier, welche nur mit hypertonischem Seewasser behandelt worden waren, ohne daß man die Membranbildung mit Saponin hervorgerufen hätte, entwickelten sich nicht zu Larven. Dieser Versuch wurde wiederholt und es wurde so festgestellt, daß zwar die Hervorrufung der Membranbildung durch Saponin die Entwicklung der Polynoëier zu Larven anregen kann, daß aber eine nachherige Behandlung dieser Eier mit hypertonischem Seewasser viel mehr Eier zur Entwicklung veranlaßt, daß viel mehr Eier sich unter Furchung entwickeln, und daß die Geschwindigkeit der Entwicklung erhöht wird. Die Analogie im Verhalten der Eier von Polynoë und der Seeigeleier ist deutlich.

2. Es gibt noch eine zweite Methode der Entwicklungserregung der unbefruchteten Eier von Polynoë, nämlich durch Erhöhung der Alkalinität des Seewassers.¹⁾

Erhöht man die Konzentration der Hydroxylionen im Seewasser durch Zusatz von etwas Natronlauge, so kann man die unbefruchteten Eier von Polynoë nicht nur zur Reifung, sondern einen kleinen Prozentsatz derselben zur Furchung und einen etwas größeren Prozentsatz und oft alle zur Entwicklung zu Larven veranlassen. In einem Versuche wurden die unbefruchteten Eier eines Weibchens in 50 ccm Seewasser + 1,5 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO gebracht und dauernd in dieser Lösung gelassen. 4 Stunden später hatten alle diese Eier sehr deut-

¹⁾ Loeb, Über die allgemeinen Methoden der künstlichen Parthenogenese. Pflügers Arch. 118, 1907.

liche Membranen gebildet und die beiden Polkörperchen ausgeworfen. Nach 8 Stunden war eine kleine Zahl der Eier im Zweizellstadium — die Furchung war vollkommen normal — der Rest blieb ungefurcht. 24 bis 48 Stunden nach Beginn des Versuches waren die meisten dieser Eier zu schwimmenden Larven entwickelt. Die äußerlich sichtbare Furchung war aber nicht über das 2- oder 4-Zellstadium hinausgegangen. Die Kontrolleier, welche in normalem Seewasser geblieben waren, waren nicht gereift und im Laufe von 24 Stunden zerfallen. Dieser (oft wiederholte) Versuch beweist also, daß die unbefruchteten Eier von Polynoë zur Reife und zur Entwicklung von Larven veranlaßt werden können, wenn man sie dauernd in 50 ccm Seewasser + $1,5 \text{ ccm } \frac{n}{10} \text{ NaHO}$ bringt.

Allein noch eine wichtige Bedingung muß hinzugefügt werden: nämlich günstige Sauerstoffversorgung. Nur die Eier, welche in einem lose bedeckten Uhrschildchen gehalten wurden, entwickelten sich in großer Zahl; die Eier, welche im Hauptgefäß blieben, in dem sie durch eine 2 cm hohe Wasserschicht von der Luft getrennt waren, reiften und entwickelten sich in viel geringerer Zahl. Vielleicht erfolgt auch im Uhrschildchen die Neutralisation der überschüssigen Lauge durch die Kohlensäure der Luft rascher als im Hauptgefäß. Ich überzeugte mich aber, daß, wenn man nach verschiedenen Intervallen solche Eier aus dem hyperalkalischen in normales Seewasser überträgt, es nur dann zur Larvenbildung kommt, wenn die Eier mindestens 4 bis 6 Stunden im hyperalkalischen Seewasser gewesen waren; und selbst dann sind noch die Resultate viel schlechter, als wenn die Eier dauernd in der hyperalkalischen Lösung bleiben.

Die Entwicklung der unbefruchteten Eier von Polynoë unterschied sich in wesentlichen Punkten von der Entwicklung der befruchteten Eier, zunächst in bezug auf die Geschwindigkeit der Entwicklung, die größer war bei den befruchteten als bei den unbefruchteten Eiern. Zweitens besteht ein Unterschied der äußerlich wahrnehmbaren Furchung in beiden Arten von Eiern. In bezug auf Form, Färbung und Lebensdauer scheinen aber beide Arten gleich zu sein.

Nach den Erfahrungen am Seeigeli war es nötig, zu

untersuchen, wie die Erhöhung des osmotischen Druckes auf die Entwicklungsregung unbefruchteter Eier von Polynoë wirkt. Es ließ sich leicht ermitteln, daß wie beim Seeigeli eine neutrale hypertonische Lösung die Entwicklung des Polynoëies nicht anzuregen vermag, daß diese aber durch eine alkalische hypertonische Lösung möglich ist. Zu je 50 ccm einer neutralen $\frac{m}{2}$ van't Hoff'schen Lösung + 9 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl wurden 0 und 0,5 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zugefügt. Die Eier blieben 2 Stunden in diesen Lösungen und wurden dann in normales Seewasser übertragen. Die aus der neutralen hypertonischen Lösung in normales Seewasser übertragenen Eier bildeten meist keine Membran, warfen die Polkörperchen nicht aus und furchten und entwickelten sich nicht. Von den Eiern dagegen, welche in der alkalischen hypertonischen Lösung gewesen waren, furchte sich im Laufe von wenigen Stunden etwa 1 Prozent in völlig regelmäßiger Weise bis zum Achtzellstadium, und die Mehrzahl der Eier entwickelte sich zu schwimmenden Larven. Die Entwicklung der Eier war meist rascher als bei der Behandlung unbefruchteter Eier mit dem hyperalkalischen, aber in bezug auf Konzentration normalen Seewasser.

Auch Eier, welche länger als 2 Stunden, nämlich bis zu 6 Stunden, in der neutralen hypertonischen Lösung gewesen waren, entwickelten sich nicht, wenn man sie hinterher in normales Seewasser brachte. Brachte man aber unbefruchtete Eier von Polynoë erst 2 Stunden in eine neutrale hypertonische Lösung und dann auf 4 Stunden in hyperalkalisches isotonisches Seewasser, so entwickelten sie sich nach der Übertragung in normales Seewasser in großer Zahl zu schwimmenden Larven. Wurden aber Eier auf 4 Stunden in das hyperalkalische Seewasser gebracht, ohne daß sie der hypertonischen Lösung ausgesetzt wurden, so entwickelten sich meist keine oder nur wenige Eier.¹⁾

Es war aus diesen Versuchen offenbar, daß eine dauernde Übertragung der unbefruchteten Eier von Polynoë in hyperalkalisches Seewasser genügt, um die chemischen Prozesse der Nukleinsynthese und Entwicklung im Ei, wenn auch langsam,

¹⁾ Loeb, Über die allgemeinen Methoden der künstlichen Parthenogenese. Pflügers Arch. **118**, 1907.

anzuregen und zu erhalten, und daß eine Kombination dieses Eingriffes mit der Behandlung der Eier mit einer neutralen hypertonen Lösung sich als noch wirksamer erweist.

Es ist kaum nötig, auf die weitgehende Analogie zwischen der Wirkung von Alkali und hypertonischem Seewasser bei Seeigeleiern und den Eiern von *Polynoë* hinzuweisen. Das Alkali führt (wie das Saponin) bei den Eiern von *Polynoë* zur Auflösung des Chorions und zur Membranbildung. Die Auswerfung der Polkörperchen und die Entwicklung folgen. Die Behandlung der Eier mit hypertonischem Seewasser verbessert aber die Wirkung der alkalischen Lösung. Der wesentliche Unterschied zwischen Seeigeleiern und *Polynoë*eiern besteht darin, daß die Behandlung mit Alkali schon für eine allerdings unvollkommene Entwicklungserregung des Eies von *Polynoë* genügt, während das für das Ei von *Strongylocentrotus purpuratus* oder *franciscanus* nicht zutrifft. Ich vermute aber, daß die Eier der Seeigel in Neapel und der französischen Küste durch Alkali allein zur Entwicklung angeregt werden können, und daß sie in dieser Hinsicht eine Mittelstellung zwischen den Eiern der kalifornischen Seeigel und denen von *Polynoë* einnehmen. Dagegen ist es bis jetzt noch nicht gelungen, die Eier von *Polynoë* durch Behandlung mit Säuren zur Entwicklung zu veranlassen. Ich vermute jedoch, daß eine Fortsetzung von Versuchen in dieser Richtung zum Resultate führen wird.

Ich vermute auch, daß eine bessere Ausbildung der Methoden der künstlichen Parthenogenese bei den Eiern von *Polynoë* möglich ist, und daß es dann gelingen wird, die Wirkung des Spermatozoons hier ebenso vollkommen nachzuahmen wie beim Seeigelei.

3. Die Literatur über die Hervorrufung der Entwicklung unbefruchteter Eier durch Säuren ist neuerdings durch eine sehr wichtige Arbeit von G. Lefevre bereichert worden.¹⁾ Lefevres Versuche sind an den Eiern einer marinen Annelide, *Thalassema mellita*, in North Carolina angestellt worden. Die Eier dieses Wurmes werden im Oozytenstadium befruchtet

¹⁾ G. Lefevre, Artificial Parthenogenesis in *Thalassema mellita*. Journ. of Experim. Zoolog. 4, 91, 1907.

(wie diejenigen von Polynoë). Das Eindringen des Spermatozoons führt zur Bildung einer Befruchtungsmembran, dann werden die beiden Polkörperchen ausgeworfen, und nach diesen Reifungsvorgängen beginnt die Furchung und Entwicklung des Eies. Lefevre hat nun gefunden, daß, wenn das unreife Ei von *Thalassema* mit Säure (gleichviel welcher Säure)¹⁾ behandelt wird, es nach der Übertragung in Seewasser eine Membran bildet, die Polkörperchen auswirft und sich oft in völlig normaler Weise furcht und zur normalen Larve entwickelt. Die besten Resultate wurden mit folgenden Säuremischungen erzielt:

17 ccm	$\frac{n}{10}$ HNO ₃	83 ccm	Seewasser	Expositionsdauer	5 Min.
15 ccm	$\frac{n}{10}$ HCl	85 ccm	„	„	5 „
10 ccm	$\frac{n}{10}$ H ₂ SO ₄	90 ccm	„	„	8 „
12 ccm	$\frac{n}{10}$ Oxalsäure	88 ccm	„	„	8 „
15 ccm	$\frac{n}{10}$ Essigsäure	85 ccm	„	„	5 „

Die Eier von *Thalassema* bilden unter dem Einfluß der Säure, nachdem sie in normales Seewasser zurückgebracht sind, eine typische Befruchtungsmembran, wie die Seeigeleier; aber während die letzteren nach dem Membranbildungsprozeß eine kurze Zeit in hypertonesches Seewasser gebracht werden müssen, um sich zu entwickeln, ist das für die Eier von *Thalassema* nicht nötig. Lefevre fand, daß es nicht einmal förderlich für die Entwicklung dieser Form ist. In dieser Hinsicht verhalten sich also die Eier von *Thalassema* wie die Eier von *Asterina*. Alle Eier von *Thalassema* bilden bei der Säurebehandlung die Befruchtungsmembran, aber nicht alle entwickeln sich. In den günstigsten Fällen entwickeln sich 60% der Eier.

Die Geschwindigkeit der Reifung und des Eintritts der

¹⁾ Er bemerkt ausdrücklich, daß Kohlensäure genau wie jede andere Säure wirkt, nicht besser und nicht schlechter.

Furchung war erheblich geringer als im Falle der Samenbefruchtung. Während bei der Samenbefruchtung das erste Polkörperchen in 20 Minuten nach dem Eintritt des Spermatozoons ausgeworfen wird, tritt der gleiche Vorgang bei der Behandlung der Eier mit Säure erst ein, nachdem die Eier 45 bis 90 Minuten aus dem säurehaltigen Seewasser in normales Seewasser zurückgebracht sind. Die erste Furchung tritt in 50 bis 60 Minuten nach dem Eintritt des Samens ein, während der gleiche Vorgang erst 2 bis $3\frac{1}{2}$ Stunden nach der Säurebehandlung bei unbefruchteten Eiern eintritt.

Es handelt sich wohl darum, daß die durch die künstliche Membranbildung erweckte Tendenz zur Zytolyse hemmend auf die Entwicklung wirkt.

In bezug auf das Verhalten der Polkörperchen hat Lefevre eine interessante Beobachtung mitgeteilt. Während im allgemeinen bei Samenbefruchtung das erste Polkörperchen, nachdem es vom Ei abgegeben ist, sich nur einmal furcht und das zweite Polkörperchen sich nicht furcht, beobachtete Lefevre, daß bei den mit Säure behandelten Eiern beide Polkörperchen eine Reihe von mitotischen Furchungen durchmachten und Miniaturembryonen von 16 Zellen bildeten. Er vergleicht diese Tatsache mit der Beobachtung von Francotte, daß bei einer *Turbellaria*, *Prostheceraeus*, das erste Polkörperchen relativ groß ist und durch ein Spermatozoon befruchtet werden kann und sich dann bis zur *Gastrula* entwickelt. Die Furchung war meist normal und die Larven waren ebenfalls normal, nur erhoben sie sich nicht an die Oberfläche des Wassers wie die Larven, die aus befruchteten Eiern entstehen. Sie fielen dadurch den Bakterien leichter zum Opfer.¹⁾

4. Endlich seien auch noch kurz meine älteren und der Methode nach unvollkommeneren Versuche über die künstliche Parthenogenese an Annelideneiern erwähnt. Im Jahre 1900 gelang es mir, schwimmende Larven aus den unbefruchteten Eiern von *Chätopterus*, einer marinen Annelide in Woods Hole, dadurch hervorzurufen, daß der Kaliumgehalt des Seewassers

¹⁾ Ich zitiere diese Angaben über die Polkörperchen, obwohl ich den Verdacht nicht unterdrücken kann, daß es sich hier um einen Irrtum handelt.

erhöht wurde.¹⁾ Das war im wesentlichen die Methode, welche Mead schon angewendet hatte, um das Auswerfen der Polkörperchen in diesem Ei zu veranlassen. Ich hatte schon beobachtet, daß bei dieser Methode der Entwicklungserregung die Eier sich zu schwimmenden Larven entwickeln, ohne daß eine Furchung stattfindet. Diese Beobachtung hat F. Lillie später nach der histologischen Seite hin weiter geführt.²⁾ Scott³⁾ und Treadwell haben dann ähnliche Resultate bei der künstlichen Parthenogenese an anderen Anneliden beobachtet. Es handelt sich in allen diesen Versuchen um unvollkommene Methoden der künstlichen Parthenogenese.

Auf Grund der voraufgehenden Versuche an Polynoë bin ich geneigt zu glauben, daß eine Weiterführung dieser Versuche mit den neueren Methoden zu einem normaleren Typus der parthenogenetischen Entwicklung dieser Eier führen würde. Auch mit Säure gelang es mir damals, die Eier von Chätopterus zur Entwicklung zu veranlassen.

Fischer und ich haben bei den Eiern von Amphitrite künstliche Parthenogenese dadurch hervorgerufen, daß wir dieselben in Seewasser brachten, dessen Kalziumgehalt etwas erhöht war.⁴⁾

Bullot brachte die Eier von Ophelia, einer Annelide der kalifornischen Küste, dadurch zur Entwicklung, daß er dieselben etwa 2 Stunden in hypertonisches Seewasser brachte. Bei diesen Eiern trat regelmäßige Furchung ein.⁵⁾

Diese älteren Versuche seien nur wegen der Vollständigkeit hier erwähnt.

¹⁾ Loeb, Versuche über künstliche Parthenogenese bei Anneliden (Chätopterus) und die Natur des Befruchtungsprozesses. *Am. Journ. of Physiol.* **4**, 423, 1901. (Untersuchungen S. 167.)

²⁾ F. R. Lillie, Differentiation without Cleavage in the Egg of the Annelid *Chaetopterus pergamentaceus*. *Arch. f. Entwicklungsmechanik* **14**, 477, 1902.

³⁾ Scott, Morphology of the Parthenogenetic Development of Amphitrite. *Journ. of Experim. Zool.* **3**, 1906.

⁴⁾ Loeb und Fischer, *Pflügers Arch.* **87**, 594, 1901. (Untersuchungen S. 278.) — M. H. Fischer, Further experiments on Artificial Parthenogenesis in Annelids. *Am. Journ. of Physiol.* **7**, 301, 1902.

⁵⁾ Bullot, Artificial Parthenogenesis and Regular Segmentation in an Annelid (*Ophelia*). *Arch. f. Entwicklungsmechanik* **18**, 161, 1904.

XXI. Versuche an Molluskeneiern.

Die Versuche an Molluskeneiern sind noch sehr spärlich. Im Jahre 1902 gelang es Kostanecki, die ersten Furchungsvorgänge (2 bis 4 Zellen) bei den unbefruchteten Eiern einer Molluske (*Macra*) dadurch hervorzurufen, daß er dieselben 2 Stunden lang hypertonischem Seewasser aussetzte.¹⁾ Im Jahre 1903 zeigte ich, daß es möglich ist, die unbefruchteten Eier anderer Mollusken, *Lottia gigantea* und mehrerer Formen von *Acmaea*, durch Behandlung mit hypertonischem Seewasser zu schwimmenden Larven zu veranlassen.²⁾ Die Methode bestand im allgemeinen darin, daß solche Eier 2 Stunden lang in eine Mischung von 50 ccm Seewasser + 10 ccm $2\frac{1}{2}n$ NaCl gebracht wurden. Die Zahl der sich entwickelnden Larven war stets klein (etwa nur 2 bis 5 Prozent der Eier) und ihre Lebensfähigkeit gering. Sie zerfielen meist nach 36 bis 48 Stunden. Nachdem ich nun die Rolle der Hydroxylionen bei der Entwicklungserregung der Seeigeleier erkannt hatte, lag es nahe, zu untersuchen, ob auch die osmotische Entwicklungserregung von *Lottia* eine Wirkung von zwei Agenzien ist, nämlich der Konzentration der Hydroxylionen und der Erhöhung des osmotischen Druckes. Das ist nun der Fall. In je 50 ccm $\frac{m}{2}$ (neutraler) van't Hoff'scher Lösung + 12 ccm $2\frac{1}{2}n$ NaCl wurden 0, 0,1, 0,2, 0,4 und 0,8 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zugefügt, und die vorher in neutraler Lösung gewaschenen Eier einer *Lottia* wurden in dieser Lösung verteilt (Temperatur $17\frac{1}{2}^{\circ}$ C). Nach $1\frac{3}{4}$, $2\frac{1}{4}$, $2\frac{3}{4}$, $3\frac{1}{4}$ und $3\frac{3}{4}$ Stunden wurde je eine Probe der Eier in normales Seewasser übertragen. Die mit der neutralen hypertonsischen Lösung behandelten Eier entwickelten sich nicht, und das gleiche war der Fall für die Eier, die mit 0,1 ccm NaHO behandelt waren. Von den Eiern, welche in den Lösungen mit mehr NaHO behandelt waren, entwickelten sich eine gewisse

¹⁾ Kostanecki, Zytologische Studien an künstlich parthenogenetisch sich entwickelnden Eiern von *Macra*. Arch. f. mikroskop. Anat. u. Entwicklungsgesch. **64**, 1904.

²⁾ Loeb, University of California Publications **1**, 1903. (Untersuchungen über künstliche Parthenogenese S. 283).

Zahl zu Larven, die je nach der Alkalinität der Lösung und der Zeitdauer des Verweilens der Eier in der Lösung verschieden war. Die Eier, welche $2\frac{1}{4}$ Stunden in der hypertonen Lösung mit 0,8 und $2\frac{3}{4}$ Stunden in der Lösung mit 0,4 NaHO gewesen waren, entwickelten sich praktisch alle zu Larven.¹⁾

Man sieht also, daß auch bei den Eiern von *Lottia* wie bei den Seeigeleiern und den Eiern von *Polynoë* die hypertone Lösung im allgemeinen nur dann wirksam ist, wenn ihre Konzentration der Hydroxylionen eine gewisse Grenze, nämlich 10^{-6} übersteigt! Es ist ferner auch klar, daß, wenn die Konzentration der HO-Ionen in der hypertonen Lösung höher ist als im Seewasser, die Zahl der sich bildenden Larven auch zunimmt. Es fiel aber hier, wie bei den Versuchen mit Seeigeleiern, auf, daß die zur Hervorrufung der Larven optimale Konzentration der Hydroxylionen bei den Eiern verschiedener Weibchen sehr großen Schwankungen unterliegt.

Der zweite Umstand, der bei diesen Versuchen ebenfalls auffiel, war die Bedeutung des Sauerstoffs. In flachen (aber gegen Verdunstung des Seewassers geschützten) Schalen, in denen die Eier nahe der Oberfläche des Wassers liegen, ist die Zahl der sich entwickelnden Eier erheblich größer als in Gefäßen, in denen die Eier mit einer hohen Schicht Seewasser bedeckt sind.

Endlich ist noch von Interesse, daß bei dieser Form keine sichtbare Membranbildung stattfindet. In dieser Hinsicht verhalten sich die Eier verschieden von den Eiern, von denen bisher die Rede gewesen ist.

Die Versuche, die Wirkung des Alkali und der Erhöhung des osmotischen Druckes zeitlich zu trennen, wie das beim Seeigel und bei *Polynoë* möglich ist, sind bis jetzt bei *Lottia* noch nicht gelungen. Auch Behandlung der Eier mit Alkali allein führte nicht zur Entwicklung.

Neuerdings hat *Kostanecki* die Beobachtung veröffentlicht, daß die Eier sich ohne Furchung zu Larven entwickeln.²⁾ Ich kann aus eigener Beobachtung diese Angabe bestätigen.

¹⁾ Loeb, Über die allgemeinen Methoden der künstlichen Parthenogenese I. c.

²⁾ *Kostanecki*, Zur Morphologie der künstlich parthenogenetischen Entwicklung bei *Macra*. Arch. f. mikroskop. Anat. u. Entwicklungsgesch. 72, 327, 1908.

XXII. Über die Beziehungen zwischen der Lösung des Chorions und der Entwicklungserregung des Eies.

Wir haben schon bei der Besprechung der Wirkung der Säure auf das Seeigelei darauf hingewiesen, daß das dem Seeigelei aufgelagerte Chorion (d. h. die aus dem Eierstock stammende membranartige Ablagerung auf der Oberfläche des Eies, s. Fig. 34) durch Säure zur Quellung und Lösung gebracht wird; und wir haben ebenfalls auf die Möglichkeit hingewiesen, daß die Säure in ähnlicher Weise einen Stoff des Zytoplasmas modifiziert und auf diese Weise die Membranbildung veranlaßt. Ich will nun hier kurz zeigen, daß anscheinend alle die Stoffe, welche künstliche Parthenogenese bei einer Form bedingen, auch bei den Eiern dieser Form das Chorion aufzulösen imstande sind.

Das schlagendste Beispiel in dieser Hinsicht sind vielleicht die Eier von Polynoë. Das Chorion derselben wird durch Alkalien, aber nicht durch Säuren gelöst. Es ist mir nun bis jetzt nicht gelungen, die Eier dieser Form durch Säuren zur Entwicklung zu bringen, während diese Entwicklungserregung mit Alkalien leicht und prompt gelingt.

Am besten eignet sich das Ei der Molluske *Lottia gigantea* für Untersuchungen über das Chorion, weil dasselbe selbst nach tagelangem Liegen in Seewasser nicht quillt und nicht verflüssigt wird. Solange das Chorion bei dieser Form nicht gequollen ist, kann kein Spermatozoon an das Zytoplasma des Eies gelangen, und das letztere kann nicht befruchtet werden. Man kann aber das Chorion dieses Eies zur Quellung und Lösung bringen, wenn man dem Seewasser etwas NaHO zusetzt, z. B. 1,0 ccm zu 50 ccm Seewasser. Bei 15°C wird das Chorion in etwa 4 bis 6 Stunden in dieser Mischung beseitigt.

Wir haben nun schon bei den Versuchen über die Entwicklungserregung des Seeigeleies durch Alkali gesehen, daß die Alkaliwirkung nur bei der Gegenwart von freiem Sauerstoff stattfindet. Es ließ sich auch zeigen, daß freier Sauerstoff für die Auflösung des Chorions durch Alkali nötig ist. Brachte man nämlich die Eier von *Lottia* 4 bis 6 Stunden lang in

alkalisches Seewasser (50 ccm Seewasser + 1,0 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO), aus dem man den Sauerstoff durch einen Strom von sehr sorgfältig gereinigtem Wasserstoff vertrieben hatte, so wurde das Chorion nicht gelöst. Brachte man solche Eier aber hinterher in sauerstoffhaltiges alkalisches Seewasser, so wurde das Chorion gelöst und die Eier konnten mit Samen befruchtet werden. Zusatz von KCN zu dem hyperalkalischen Seewasser hemmte ebenfalls die Verflüssigung des Chorions.¹⁾

Von ganz besonderem Interesse war aber die Frage, ob auch hypertonisches Seewasser das Chorion von *Lottia* zum Quellen und zur Auflösung bringt. Wir haben ja gesehen, daß hypertonisches Seewasser die Entwicklung des unbefruchteten Seeigeleies und des Eies von *Lottia* veranlassen kann. Es findet dabei eine Entwicklungserregung ohne Membranbildung statt. Diese Entwicklungserregung setzt sich aus zwei Faktoren zusammen: der Wirkung der HO-Ionen und der Erhöhung des osmotischen Druckes des Seewassers. Vielleicht dient die hypertonische Lösung u. a. dazu, die Empfindlichkeit des Eies für die Hydroxylionen zu erhöhen. Da keine Membranbildung stattfindet, so nehmen wir an, daß zwar dieselbe oberflächliche Änderung des Eies wie bei der Membranbildung, jedoch nicht in demselben Maße, stattfindet. Die Versuche ergaben nun, daß hypertonisches Seewasser das Chorion der Eier von *Lottia* zum Quellen und zur Auflösung bringt. Die hypertonische Lösung wirkt also in dem Sinne, als ob sie die Wirksamkeit der Hydroxylionen des Seewassers verstärkte.

Endlich konnte ich mich auch überzeugen, daß auch das Benzol das Chorion der Eier von *Lottia* rasch löst.

Es ist mir nicht gelungen, die künstliche Parthenogenese bei den Eiern von *Lottia* durch Säuren anzuregen; ebensowenig gelingt es aber auch, das Chorion bei den Eiern dieser Tiere durch Säure zum Quellen und zur Auflösung zu bringen.

Man darf unter diesen Umständen wohl daran denken, daß der Membranbildung die Lösung eines Stoffes im Zytoplasma zugrunde liegt, der chemisch sich ähnlich verhält, wie ein im Chorion desselben Eies enthaltener Stoff.

¹⁾ Loeb, Untersuchungen S. 369.

XXIII. Über die Entwicklungsfähigkeit der parthenogenetischen Eier.

Das Beispiel der Tiere, die sich wie die Blattläuse, gewisse Krustazeen, oder gewisse Schmetterlinge, viele Generationen hindurch parthenogenetisch fortpflanzen, läßt keinen Zweifel darüber, daß parthenogenetische Larven in gewissen Formen ebenso lebensfähig sind, wie die durch Samenbefruchtung entstandenen. Ein besonders deutliches Beispiel liefern auch die Bienen und geselligen Wespen, bei denen die stets parthenogenetisch entstandenen Männchen ebenfalls den Weibchen an Entwicklungsfähigkeit nicht nachstehen. Bei den Seidenspinnern scheint aber bereits ein Unterschied zu bestehen. Nur die Sommereier scheinen sich parthenogenetisch zu entwickeln, und auch bei diesen scheinen die sich entwickelnden Larven nur ausnahmsweise ihre volle Reife zu erreichen. Nach allem, was wir bisher besprochen haben, darf man vielleicht schließen, daß bei den Bieneneiern und den Eiern der Aphiden die im Ei gebildeten Stoffe ausreichen, die Entwicklung in die richtigen Bahnen zu lenken, während bei den Eiern der Seidenspinner noch eine zweite Variable im Spiel ist, die einstweilen ebenfalls unbekannt ist; bei einzelnen Eiern mag der Zufall diese Variable in der richtigen Größenordnung treffen, und dann kann eine normale Entwicklung stattfinden, sonst nicht.

Was nun die künstliche Parthenogenese betrifft, so haben wir gesehen, daß bei der richtigen Methode — Membranbildung durch eine Fettsäure, Nachbehandlung mit hypertonischem Seewasser, oder mit Hemmung der Entwicklung — bei Seeigeleiern eine normale Furchung und Entwicklung möglich ist. Es ist ein leichtes, alle Eier mit dieser Methode zur Entwicklung zu bringen. Bei der Nachbehandlung mit hypertonischem Seewasser ist die erste Furchung nicht immer vollkommen. Das liegt wohl daran, daß die Zeit, während welcher die Eier in der hypertonen Lösung bleiben müssen, anscheinend auch individuell schwankt, und daß die geringste Überschreitung der richtigen Expositionsdauer abnorme Furchungsvorgänge hervorruft. Diese Abnormitäten haben ihren Grund vielleicht darin, daß bei den mit Säure vorbehandelten membranbesitzenden Eiern

eine ganz kurze Überschreitung der Expositionsdauer multiple Astrophärenbildung oder abnorme Protoplasmabewegungen im Ei veranlaßt, wodurch eine abnorme Verteilung der Chromosomen bedingt wird. Vielleicht auch ist die Diffusion von Sauerstoff in die einzelnen Eier etwas verschieden, und das bedingt die beobachteten individuellen Variationen. Man verfährt so, daß man in Intervallen von 2 bis 4 Minuten einige Eier aus der hypertonen Lösung in normales Seewasser zurückbringt. Auf diese Weise wird man in den Portionen, die rechtzeitig aus der hypertonen Lösung genommen werden, eine Reihe sich normal furchender und normal entwickelnder Eier finden, deren Zahl schwankt und manchmal sehr groß sein kann.

Solche Eier entwickeln sich zu normalen Pluteen, die an der Oberfläche des Seewassers schwimmen. Sie leben ebenso lange wie die Pluteen, welche aus unbefruchteten Eiern gezüchtet werden. In beiden Fällen verhungern die Larven im Laboratorium, wenn man nicht besondere Fütterungsversuche macht. Der Hungertod tritt bei den chemisch zur Entwicklung gebrachten Larven nicht früher ein, als bei den durch Samenbefruchtung gezüchteten.

Nimmt man sich die Mühe, die Larven in Seewasser zu züchten, das Diatomeen und Algen enthält, so kann man sie länger am Leben erhalten. Wir haben auf diese Weise die parthenogenetischen Larven des Seeigels 6 Wochen lang am Leben erhalten. Delage hat sich viele Mühe gegeben, die parthenogenetischen Larven des Seeigels zu züchten. Es ist ihm neuerdings gelungen, zwei Larven bis über die Metamorphose hin aufzuzüchten. Diese Larven hatten am 26. August 1908 die Ambulakralfüße gebildet und krochen am Glase entlang. Sie waren über 1 mm groß.¹⁾ Damit ist denn wohl der letzte Grund genommen, an der Lebensfähigkeit der durch chemische Befruchtung erzielten Larven zu zweifeln. Nach einer neueren Mitteilung von Delage sind diese Larven anfangs 1909 gestorben. Das eine der Tiere war ein Männchen und hatte Spermatozoen.²⁾

¹⁾ Delage, Compt. rend. de l'Académie des Sciences **144**, 452, 1907.

²⁾ Delage, ibid. **148**, 453, 1909.

XXIV. Über die Hervorrufung der Membranbildung beim Seeigelei mit artfremdem Blute, insbesondere dem Blute von Säugetieren.

Ich habe mich vielfach bemüht, aus dem Samen einen Stoff zu isolieren, welcher die Membranbildung beim Seeigelei hervorrufen könnte. Das ist mir nun bis jetzt nicht gelungen, wohl aber ist es mir gelungen, zu zeigen, daß ein solcher Stoff im Blute und in den Körperflüssigkeiten vieler Tiere vorhanden ist, welche im natürlichen System weit vom Seeigel getrennt sind.¹⁾

Ich hatte mir lange vorgenommen, den Versuch zu machen, Eier durch Körpersäfte, insbesondere durch Blutserum, zu befruchten. Es ist ja kein Grund vorhanden, warum die für die Entwicklungserregung geeigneten Stoffe nur im Samen vorhanden sein sollen. Die ganze Bedeutung des Samens könnte ja dadurch verständlich werden, daß die befruchtenden Stoffe relativ unlöslich in dem Seewasser oder den Körpersäften sind und deshalb nur dann in das Ei gelangen können, wenn ein Motor — wie er in der Ziliertätigkeit des Spermatozoons gegeben ist — diese Stoffe ins Ei befördert. In dem Falle war aber zu erwarten, daß gelegentlich die befruchtende Substanz in einer etwas löslicheren Form auftritt. Diese Vermutung erwies sich auch als korrekt. Nach längerem Herumprobieren gelang es mir zuerst, mit dem Blutserum von gewissen Würmern, nämlich den Gephyreen, die Membranbildung bei unbefruchteten Seeigeleiern hervorzurufen und diese Eier zur Entwicklung anzuregen.

„Wenn man einen Einschnitt in den Körper einer Sipunculide macht — *Dendrostoma* wurde meist in unseren Versuchen benutzt —, so erhält man die Flüssigkeit der Körperhöhle eines solchen Tieres. Diese Flüssigkeit enthält zahlreiche

¹⁾ Loeb, Über die Hervorrufung der Membranbildung beim Seeigelei durch das Blut gewisser Würmer (Sipunculiden). *Pflügers Arch.* **118**, 36, 1907. — Über die Hervorrufung der Membranbildung und Entwicklung beim Seeigelei durch das Blutserum des Kaninchens. *Pflügers Arch.* **122**, 196, 1908. — Weitere Versuche über die Entwicklungserregung des Seeigeleies durch das Blutserum von Säugetieren. *Pflügers Arch.* **124**, 37, 1908.

Blutkörperchen und die Geschlechtszellen, Samen oder Eier. Für unsere Versuche wurde meist nur der Körperinhalt weiblicher Würmer benutzt. Gewöhnlich wurde je 1 ccm dieser Flüssigkeit mit etwa 50—200 ccm Seewasser verdünnt. Die Lösung wurde dann durch Zentrifugieren völlig geklärt und nur das von festen, geformten Bestandteilen freie, völlig wasserklare Serum wurde zu den Versuchen benutzt. Wenn man nun unbefruchtete Eier eines Weibchens mit etwa 3 ccm Seewasser in ein Uhrschälchen brachte und 1 bis 4 Tropfen dieser verdünnten klaren Körperhöhlenflüssigkeit von *Dendrostoma* setzte, so bildete ein gewisser Prozentsatz der Eier die typische Befruchtungsmembran. Beobachtete man nun solche Eier, so fand man, daß sie etwa 2 bis 3 Stunden nach der Membranbildung eine normale Kernspindel bildeten und daß ein Teil derselben sich völlig regelmäßig in zwei Zellen furchte. Bei der Mehrzahl trat jedoch zunächst keine Furchung ein, sondern sie zerfielen später in mehrere Zellen auf einmal. Man fand sehr häufig gut aussehende Acht- oder Sechzehnzellenstadien, und ich erwartete anfangs, daß die Eier sich zu Larven entwickeln würden. Das war jedoch, mit wenigen Ausnahmen, nicht der Fall. Am zweiten Tage zerfielen die Eier meistens. Einige wenige lebten etwas länger, aber sie entwickelten sich nicht zu Blastulen.

Bringt man aber solche Eier unmittelbar nach der Membranbildung in hypertonisches Seewasser (50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}$ norm. NaCl) und läßt man sie in dieser Lösung 30 bis 60 Minuten, so entwickeln sich alle oder die meisten Eier zu Larven. Wählt man die Expositionsdauer gerade richtig, so furchen und entwickeln sich die Eier völlig normal zu Pluteen. Exponiert man sie zu kurze Zeit, so bleibt die hypertonische Lösung wirkungslos.

Aber nicht die Eier jedes Seeigels bildeten bei Zusatz von *Dendrostomaserum* eine Membran, sondern nur die Eier von etwa 20% der Weibchen reagierten in dieser Weise.

Es war nun nötig, die Natur des wirksamen Stoffes etwas näher zu bestimmen. Wenn man die wirksame Lösung des *Dendrostomablutes* auf seine Reaktion untersucht, so findet man, daß es mit Neutralrot genau wie normales Seewasser reagiert. Das schließt den Gedanken aus, daß es sich hier um

eine Membranbildung durch eine niedere Fettsäure (oder eine andere Säure) handeln könnte. Denn bei der Hervorrufung der Membranbildung durch eine niedere Fettsäure muß man ca. 3 ccm $\frac{n}{10}$ Säure zu ungefähr 50 ccm Seewasser zusetzen, wodurch das letztere stark sauer wird. Ferner darf das Ei in einer solchen sauren Lösung nicht mehr als $1\frac{1}{2}$ bis $2\frac{1}{2}$ Minuten (bei 15° C) verweilen, weil sonst keine Membran gebildet wird, und drittens bildet sich in diesem Falle die Membran nicht in dem sauren Seewasser, sondern erst nach der Übertragung der Eier in normales (d. h. schwach alkalisches) Seewasser. Bei der Behandlung der Eier mit dem verdünnten Sipunkulidenblut aber findet die Membranbildung in der Gegenwart dieses Blutes statt.

Es handelt sich aber auch wahrscheinlich nicht um einen der Kohlenwasserstoffe, wie Benzol, Toluol oder Amylen, mit denen Herbst bzw. ich selbst die eine Membranbildung hervorgerufen haben, auch nicht um Chloroform, mit dem Hertwig die Membranbildung gelungen ist. Denn alle diese fettlösenden Stoffe führen nicht nur zur Membranbildung, sondern auch zur Zytolyse des Eies, wenn man es nicht sofort nach der Membranbildung aus der Lösung entfernt. Das Sipunkulidenserum führt aber in der zur Auslösung der Membranbildung nötigen Konzentration nicht zur Zytolyse des Eies.

Die Frage nach dem Grade der Hitzebeständigkeit des wirksamen Bestandteils des Sipunkulidenserums wurde in Erwägung gezogen. Schon um dem Verdacht einer Ansteckung durch lebende Spermatozoen zu entgehen, war es nötig, das Sipunkulidenserum in diesen Versuchen auf 50° bis 60° C zu erwärmen. Längeres Erwärmen auf 60° C schwächt die Wirksamkeit des Serums nicht ab, ebensowenig geschah das beim Erwärmen auf 70° oder 80° C. Flüchtliges Erhitzen des Serums bis zur Siedetemperatur reduzierte die Wirksamkeit des Serums in einem Falle auf $\frac{1}{3}$ seiner ursprünglichen Wirksamkeit. Längeres Sieden (2 bis 3 Minuten) hob in allen bis jetzt beobachteten Fällen die Wirksamkeit völlig auf.

Selbst wenn das Blut über 1 Stunde lang auf 63° C erwärmt wurde, büßte es nichts von seiner Wirksamkeit ein.

Ich versuchte das Blut von verschiedenen anderen Kalt-

blütern, aber bis jetzt ohne sicheren Erfolg, nämlich Kröte (*Bufo columbiensis*), einem Knochenfisch (*Sebastodes mystinus*), einer Krabbe (*Cancer antennarius*), *Aplysia* und einer Annelide, *Lumbriconereis*. Geringen Erfolg hatte ich mit dem Blut einer anderen Annelide, nämlich *Bispira polymorpha*. Ich vermute aber, daß eine Fortsetzung dieser Versuche dennoch zu positiven Resultaten führen wird.

Dagegen gelang es mir, die Membranbildung beim Seeigeli durch das Blut von Säugetieren, nämlich von Kaninchen, Schweinen und dem Rinde hervorzurufen. Das Serum wurde mittels Zusatz von einer $2\frac{1}{2}$ n NaCl-Lösung mit dem Seewasser isosmotisch gemacht (zu je $6\frac{1}{2}$ ccm Serum wurde 1 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl-Lösung zugefügt).

Wie bei den Versuchen mit dem Blut von *Dendrostoma*, so wurde auch mit dem von Warmblütern die Beobachtung gemacht, daß es nicht auf die Eier eines jeden Seeigelweibchens einwirkt, sondern nur auf die Eier von etwa 10% der Weibchen. Ich bin geneigt, das auf Variationen der Durchgängigkeit der Eier bei verschiedenen Weibchen zurückzuführen. Damit das Blut imstande ist, die Membranbildung hervorzurufen, muß der wirksame Bestandteil desselben imstande sein, ins Ei einzudringen. Den hierzu nötigen Grad der Durchgängigkeit besitzen offenbar nicht die Eier aller Weibchen, sondern nur die eines gewissen Prozentsatzes derselben. Das Blut der Säugetiere ist nun weniger wirksam als das Blut von *Dendrostoma*. Während das letztere noch in 100- ja 1000 facher Verdünnung die Membranbildung hervorrufft, wirkt das erstere nur bei 2- bis 10 facher Verdünnung. Die Versuche gelingen am besten, wenn die Eier frisch aus dem Ovarium genommen sind.

Es war mir darum zu tun, Mittel zu finden, die Wirksamkeit des Säugetiererserums zu erhöhen. Ich versuchte zunächst die Erwärmung in der Hoffnung, dadurch die Durchgängigkeit des Eies für Serum zu erhöhen. In den Versuchen wurden die Eier eines Weibchens gewählt, von denen etwa 3% bei Zimmertemperatur mit Rinderserum Membranen bildeten.

Die Eier dieses Weibchens wurden in ein Becherglas mit Seewasser gebracht, in ein zweites Becherglas wurde das Rinderserum gebracht, und beide Bechergläser wurden in einem

Wasserbade langsam erwärmt. Bei bestimmten Temperaturen wurde je $\frac{1}{2}$ ccm Seewasser mit Eiern und $\frac{1}{2}$ ccm Serum in ein Uhrsälchen gebracht und gemischt, und dann wurde der Prozentsatz der Eier, welche eine Befruchtungsmembran bildeten, festgestellt. Die folgende Tabelle gibt das Resultat eines derartigen Versuches, welche übrigens alle gleich verliefen.

Temperatur	Prozentsatz der Eier, welche Membranen bildeten
15° C	3%
28° C	3%
30° C	5%
31° C	70%
32° C	100%
34° C	100%
36° C	1%
37° C	0%

Wie man sieht, trat bei der Erwärmung der Eier auf 31° eine plötzliche Zunahme in der Zahl der Membranbildungen ein. Bei 36° hörte diese Wirkung wieder auf, weil eine Modifikation des Membranbildungsprozesses eintrat. Es traten nämlich helle Tröpfchen aus dem Ei aus, deren Oberflächenlamelle aber nicht zu einer einheitlichen Befruchtungsmembran zusammenfloß. Die Membranbildung trat erst ein, als die Eier wieder abgekühlt waren. Die bloße Erwärmung auf 32° ohne Zusatz von Serum führte nicht zu der Membranbildung. Eine Erwärmung der Eier von *Strongylocentrotus purpuratus* auf 31° oder darüber vernichtet ihre Entwicklungsfähigkeit.

Ich fand aber eine andere Methode, die Wirksamkeit des Blutserums zu erhöhen, bei der die Entwicklungsfähigkeit der Eier nicht verringert wurde, nämlich durch Zusatz einer $\frac{m}{2}$ SrCl₂-Lösung zum Serum.

Um die fördernde Wirkung von Strontium zu zeigen, muß man Eier wählen, welche nur einen geringen Grad der Empfindlichkeit gegen Serum zeigen. Die folgende Tabelle gibt eine Vorstellung von dem Einfluß von Strontium auf die Zahl der Eier, welche durch Serum zur Entwicklung veranlaßt werden können. Jeder Versuch ist an den Eiern eines anderen Weibchens angestellt.

Natur der Lösung		Prozentsatz der Eier, welche Membranen bildeten
1.	{ 2 ccm Seewasser + 1 Tropfen Rinderserum	5 ⁰ / ₀
	{ 2 ccm SrCl ₂ + 1 Tropfen Rinderserum	80 ⁰ / ₀
2.	{ 2 ccm Seewasser + 3 Tropfen Rinderserum	0 ⁰ / ₀
	{ 2 ccm SrCl ₂ + 3 Tropfen Rinderserum	80 ⁰ / ₀
3.	{ 1 ccm Seewasser + 3 ccm Rinderserum	14 ⁰ / ₀
	{ 1 ccm SrCl ₂ + 1 ccm Rinderserum	33 ⁰ / ₀
4.	{ 1 ccm Seewasser + 1 ccm Rinderserum	5 ⁰ / ₀
	{ 1 ccm SrCl ₂ + 1 ccm Rinderserum	26 ⁰ / ₀
5.	{ 1 ccm Seewasser + 1 ccm Rinderserum	8 ⁰ / ₀
	{ 1 ccm SrCl ₂ + 1 ccm Rinderserum	50 ⁰ / ₀
6.	{ 1 ccm Seewasser + 1 ccm Schweineserum	5 ⁰ / ₀
	{ 1 ccm SrCl ₂ + 1 ccm Schweineserum	80 ⁰ / ₀
7.	{ 1 ccm Seewasser + 1 ccm Schweineserum	5 ⁰ / ₀
	{ 1 ccm SrCl ₂ + 1 ccm Schweineserum	40 ⁰ / ₀
8.	{ 2 ccm Seewasser + 2 ccm Kaninchenserum	0 ⁰ / ₀
	{ 2 ccm SrCl ₂ + 2 ccm Kaninchenserum	50 ⁰ / ₀

In allen diesen Versuchen wurde eine $\frac{3}{8}$ grammolekulare Lösung von SrCl₂ benutzt. Es schien das Resultat zu verbessern, wenn man der Mischung von Serum und SrCl₂ etwa 6 Tropfen Seewasser zusetzte. Der Zusatz von BaCl₂ wirkt ähnlich wie der von SrCl₂. Wegen des starken Niederschlags von BaSO₄, der sich in diesem Falle bildet, ist aber das Arbeiten mit Barium unangenehm, und ich habe deshalb nicht so viele Versuche mit Barium angestellt.

Merkwürdigerweise haben Mg und Ca keine fördernde, sondern eher eine hemmende Wirkung auf die Hervorrufung der Membranbildung durch Säugetierblut.

Die Wirksamkeit des Blutes von Dendrostoma wurde aber durch den Zusatz von Sr nicht vermehrt.

Die Versuche, die Substanz im Serum, welche die Membranbildung verursacht, zu isolieren, sind bis jetzt nicht weit gediehen. Es zeigte sich, daß diese Substanz relativ hitzebeständig ist.

Rinderserum wurde langsam im Wasserbade erhitzt, und bei verschiedenen Temperaturen wurde $\frac{1}{2}$ ccm Serum heraus-

genommen und in ein Uhrsälchen gebracht. Nach der Abkühlung wurde $\frac{1}{2}$ ccm Seewasser zugesetzt, und in die Mischung wurde 1 Tropfen Eier gebracht. Es stellte sich heraus, daß Erhitzen des Serums bis auf 73° seine Wirksamkeit nicht abschwächt. Als Maß der Wirksamkeit des Serums diente der Prozentsatz der Eier, welche Membranen in der Lösung bildeten. Bei 73° trat Gerinnung des Serums ein. Erhitzte man das geronnene Serum bis auf 100° , so hatte der aus dem Serum ausgepreßte helle Saft keine Wirkung mehr auf die Eier.

Auch Fäulnis schien die Wirksamkeit des Serums nicht aufzuheben. Viermaliges Ausschütteln des Rinderserums mit Äther verringert seine Wirksamkeit nicht. Da Äther Membranbildung und Zytolyse hervorruft, so muß man bei diesen Versuchen mit Vorsicht verfahren und das Serum erst benutzen, nachdem aller Äther ausgetrieben ist.

Fügt man eine größere Menge Azeton zum Rinderserum, so erhält man einen voluminösen Niederschlag, der nach dem Trocknen zu einer braunen Kruste erhärtet. Diese Substanz ist nahezu unlöslich im Seewasser. Dieser getrocknete Azetonniederschlag wurde in der Reibschale mit Seewasser zerrieben, es wurde filtriert, und das Filtrat wurde auf seine Wirksamkeit geprüft. Es zeigte sich, daß das Filtrat äußerst wirksam ist. Die Eier verschiedener Weibchen wurden in diesem Filtrat behandelt, und die Membranbildung trat nur bei den Eiern solcher Weibchen ein, die sich auch dem natürlichen Serum gegenüber empfindlich erwiesen.

Die Eier, bei denen man eine Membranbildung mit dem Serum von Warmblütern hervorgerufen hat, benehmen sich gerade so wie die Eier, bei denen man die Membranbildung mittels Buttersäure hervorruft.

Bleiben die Eier, die durch Serumbehandlung eine Membran gebildet haben, in normalem Seewasser, so fangen sie an, sich zu furchen, gehen aber bald zugrunde. Bringt man sie aber nach der Membranbildung auf 30 bis 60 Minuten in hypertones Seewasser (50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}$ m NaCl), so entwickeln sie sich zu normalen Larven. Bei den Eiern von *S. franciscanus* ist die Expositionsdauer in hypertonischem Seewasser noch viel geringer, nämlich etwa 10 bis

30 Minuten. Wir haben schon gesehen, daß man die Eier von *S. purpuratus* mittels Blutserum auch ohne Membranbildung und ohne Behandlung mit hypertonischem Seewasser direkt zur Entwicklung veranlassen kann.

Wir wollen nun die Frage aufwerfen: Welche Beziehung besteht zwischen der Membranbildung durch Blutserum und durch zytolytische Stoffe? Ich vermute, daß das artfremde Blut als zytolytisches Agens wirkt. Wir wissen, daß artfremdes Serum hämolytische Eigenschaften hat. Es ist möglich, daß diese Eigenschaft des artfremden Serums die Bildung der Befruchtungsmembran bedingt. Diese Annahme stößt auf die Schwierigkeit, daß das Rinderserum bei kurzer Einwirkung keine Zytolyse des Eies bedingt. Diese Schwierigkeit wird aber vielleicht dadurch beseitigt, daß die Bildung der Membran das weitere Eindringen von Serum in das Ei und damit die Zytolyse verzögert. Wir sahen ja, daß die Membran für die Kolloide des Serums undurchgängig ist. Ich habe aber gefunden, daß bei längerer Einwirkung schon eine geringe Menge Serum die Eier tötet. Schon der Zusatz von 2 bis 4 Tropfen von Serum zu 50 ccm Seewasser tötet die Eier nach 60 Stunden. Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß Bakterien hierfür zum Teil oder ausschließlich verantwortlich sind.

XXV. Versuche über die Entwicklungserregung von Eiern durch Samenextrakt.

Es sind in der Tat einige Ansätze gemacht worden, die Entwicklung von Seeigeleiern durch Samenextrakt hervorzu-rufen. Es unterliegt keinem Zweifel, daß diese Versuche mit der Zeit gelingen werden. Was aber bisher in dieser Richtung über angebliche Erfolge berichtet worden ist, hält der Kritik nicht stand.

Im Jahre 1899 veröffentlichte Piéri eine Notiz, daß es ihm gelungen sei, aus dem Hoden des Seeigels, durch bloßes Schütteln desselben mit Seewasser (!), einen Stoff zu extra-

hieren, der die Eier des Seeigels befruchtete.¹⁾ Das Seewasser, das die Spermatozoen enthielt, wurde nach dem Schütteln filtriert, und das Filtrat wurde zu den Eiern zugesetzt. Die Eier entwickelten sich! Wie der Autor selbst zugesteht und wie jeder weiß, gehen Spermatozoen durch Filtrierpapier, und man versteht nicht recht, worauf der Autor seine Behauptung stützt, daß es sich hier um eine Befruchtung durch den Samenextrakt und nicht durch lebenden Samen handelte: Kontrollversuche hat er nicht angestellt. Einen besseren Ansatz zur Lösung des Problems machte Winkler.²⁾ Winkler bemerkt selbst, daß seine Arbeit nicht über das Stadium der Vorversuche hinausgekommen ist. Seine Versuche bestanden darin, daß er die Spermatozoen von zwei Seeigelarten, *Sphaerechinus* und *Arbacia*, in Neapel eine halbe Stunde lang in destilliertes Wasser brachte. Das Filtrat war imstande, die ersten Furchungen des Seeigeleies zu veranlassen. Wie man aber sehen wird, arbeitete Winkler nicht mit unverändertem Seewasser, und es ist möglich, daß die Änderung des Seewassers die Ursache der von Winkler beobachteten Furchung war und nicht die angeblichen Extraktivstoffe aus dem Samen. „Wurden die Spermatozoen einfach in Meerwasser durch Erhitzen auf 50° bis 60° C abgetötet und die Eier in die abgekühlte Flüssigkeit gebracht, so erfolgte nichts. Wurden sie aber in destilliertes Wasser aufgenommen und etwa eine halbe Stunde lang unter öfterem Durchschütteln darin gelassen, so ergab sich, daß die Flüssigkeit jetzt wirksam war. Natürlich wandte ich sie nicht so direkt an, sondern filtrierte erst 5 bis 6 mal durch ein dreifaches Papierfilter und fügte dann so viel des Rückstandes von eingedampftem Meerwasser hinzu, daß die Konzentration der normalen Seewassers (ca. 4%) gleich war. In dieses Wasser gebracht, zeigten die unbefruchteten Eier sowohl von *Sphaerechinus* als von *Arbacia* — jedes natürlich nur im Samenextrakte der eigenen Art — Furchungserscheinungen. Ich

¹⁾ J. B. Piéri, Un nouveau ferment soluble: L'ovulase. Arch. de Zool. expériment. 1899, XXIX.

²⁾ H. Winkler, Über die Furchung unbefruchteter Eier unter der Einwirkung von Extraktivstoffen aus dem Sperma. Nachrichten der Ges. d. Wissensch. zu Göttingen 1900, 187.

möchte aber gleich bemerken, daß keineswegs alle Eier reagierten, sondern ein nicht sehr großer Teil; mehrfach kam es auch vor, daß mit ein und derselben Spermaflüssigkeit Eier des einen Individuums reagierten, die von einem anderen nicht. Ferner ging die Furchung im besten Falle zum Viererstadium regelmäßig vor sich, dann wurde sie ganz abnorm und die vielen ungleich großen Befruchtungskugeln glitten, wohl infolge der natürlich fehlenden Dottermembran, auseinander. Die Geschwindigkeit der Furchung war bei den so behandelten Eiern eine beträchtlich geringere, als bei normal befruchteten.“

Es liegt mir fern, die Bemühungen Winklers kritisieren zu wollen; sie sind sicher ein Schritt auf dem rechten Wege, aber man muß doch wohl darauf hinweisen, daß seine Versuche nicht ganz einwandfrei waren. Erstens war sein Seewasser dadurch viel alkalischer gemacht als das normale, daß er es erst abdampfte, wodurch er die CO_2 austrieb und die Bikarbonate in Karbonate verwandelte. Nachher brachte er das Seewasser dadurch wieder auf das normale Volumen, daß er destilliertes Wasser zufügte. Die so bedingte Alkalinitätserhöhung allein führt, wie ich schon vor Jahren gezeigt habe, zu solchen Resultaten, wie Winkler sie beschreibt. Es ist aber möglich, daß er auch hypertones Seewasser anwendete. Er „fügt nämlich zu dem destillierten Wasser, das den Samen enthielt, so viel des Rückstandes von eingedampftem Seewasser hinzu, daß die Konzentration der des normalen Seewassers (ca. 4%) gleich war.“

Ich habe mich selbst seit Jahren vergeblich bemüht, die Winklerschen Versuche zu bestätigen; solche Resultate, wie er sie beschreibt, erhält man, wenn man mit schwach hypertonischem oder hyperalkalischem Seewasser oder mit beiden zugleich arbeitet; aber man erhält diese Resultate auch, wenn man solchem Seewasser keinen Samen zusetzt. Ich selbst hatte schon vor dem Erscheinen der Arbeit Winklers die Wirkung von verschiedenen Enzymen auf das unbefruchtete Seeigeli versucht, mit negativem Resultat. Auf meinen Vorschlag unternahm der physiologische Chemiker der Columbia University, Professor W. J. Gies, eine Reihe von Versuchen, in denen er mit allen bekannten Methoden, die zur Extraktion von Enzymen aus der

Zelle führen, die Spermatozoen behandelt.¹⁾ Die Extrakte von Spermatozoen in Süßwasser, Seewasser, Alkohol, Äther, Glycerin, Alkalien — alle erwiesen sich absolut wirkungslos. Auch die Extrakte aus befruchteten Eiern blieben ohne Wirkung. Die Wiederholung der Winklerschen Versuche, mit Berücksichtigung der Fehlerquellen, führte zu absolut negativen Resultaten. Aus diesen Versuchen folgert Gies, daß, wenn das Spermatozoon die Entwicklung des Eies durch Enzyme anregt, diese Enzyme entweder nicht durch die gewöhnlichen Methoden aus dem Samen extrahiert werden können, oder daß sie nicht vermögen, in das Ei einzudringen. Es wäre auch schwer zu verstehen, warum Winkler keine Membranbildung beobachtete, wenn es sich wirklich um die Wirkung des Samenextrakts gehandelt hätte.

Kupelwieser fand im hiesigen Institut, daß, wenn man die Seeigelleier in sehr konzentrierten Samen von *Mytilus* bringt, dieselben in 5 bis 15 Minuten eine typische Befruchtungsmembran bilden. Solche Eier benehmen sich ganz so, wie die Eier, bei denen man die künstliche Membranbildung durch eine Fettsäure herbeiführt. Sie entwickeln sich nur, wenn man sie hinterher mit hypertonischem Seewasser behandelt, sonst zerfallen sie. Die rasche Bildung der Befruchtungsmembran hindert offenbar das Eindringen der Spermatozoen ins Ei, ein Vorgang, der viel langsamer vor sich geht, als die Bildung der Befruchtungsmembran. Später gelang es dann Kupelwieser ähnliche Resultate auch durch das Filtrat von Sperma hervorzubringen, das vorher durch Erhitzen von 70° bis 100° C getötet war. „Ich verwendete dann auf 70° bis 100° erhitztes und filtriertes Sperma von *Chiton*, *Asterias*, *Asterina*, *Strongylocentrotus franciscanus* und *purpuratus*. Ich erhielt überall Membranbildung (bei den Eiern von *Strongylocentrotus purpuratus*).“ Die Voraussetzung für diese Membranbildung war nur die, daß die Konzentration des Samens möglichst hoch gewählt wurde. „Am besten setze man die Eier direkt dem gar nicht oder nur wenig verdünnten lebenden Sperma, resp. dem Filtrat von

¹⁾ W. J. Gies, Do Spermatozoa contain Enzyme, having the Power of causing the Development of Mature Ova? *Am. Journ. of Physiol.* **6**, 53, 1901.

höchstens mit gleichem Seewasser verdünntem und getötetem Sperma aus. Auf diese Weise erhielt ich in manchen Fällen bis zu 90 % Membranen. Ich muß hierbei besonders betonen, daß diese Versuche durchschnittlich nur bei jedem fünften Weibchen gelangen.“ In allen diesen Fällen benehmen sich die Eier nach der Membranbildung genau so, wie die Eier, bei denen die Membran durch eine Fettsäure hervorgerufen war.¹⁾

Ich vermute, daß die Membranbildung in den Versuchen Kupelwiesers mit artfremdem Sperma durch das dem Samen beigemischte Serum bedingt war. Diese Annahme steht im Einklang mit meinen Versuchen mit Blutserum; sie erklärt ferner, warum es in Kupelwiesers Versuchen nötig war, sehr konzentriertes Sperma mit so wenig Seewasser als möglich anzuwenden.

Was Kupelwiesers Angabe betrifft, daß er durch den Extrakt von Seeigelsamen die Membranbildung bei Seeigeleiern hervorgerufen habe, so muß ich bemerken, daß mir bisher die Wiederholung dieses Versuches niemals gelungen ist. Es ist aber möglich, daß weitere Versuche von besserem Erfolge begleitet sein werden.

XXVI. Das Keimen ölhaltiger Samen und die „natürliche“ Parthenogenese.

Wir haben zwei Reihen von Tatsachen, welche beide zeigen, daß der Prozeß der Entwicklungserregung in allen tierischen Eiern in letzter Instanz der gleiche sein muß: Einmal die Tatsachen der heterogenen Hybridisation, welche beweisen, daß eine beliebige Eizelle (die des Seeigels) durch den Samen beliebiger Formen — Seesterne, Holothurien, Ophiuriden, Krinoide und sogar Mollusken — zur Entwicklung angeregt werden kann; zweitens die Tatsachen der künstlichen Parthenogenese, welche dartun, daß bei den Eiern der verschiedensten Tiere dieselben oder ähnliche Methoden die Entwicklung anregen.

¹⁾ H. Kupelwieser, Versuche über Entwicklungserregung und Membranbildung bei Seeigeleiern durch Molluskensperma. Biol. Centralbl. **26**, 744, 1906.

Wir besitzen in der Physiologie und Pathologie viele Fälle von Entwicklungserrregung, z. B. das Keimen der Samen, die Bildung von Tumoren usw., und es wäre natürlich von Bedeutung zu wissen, ob wir in diesen Fällen denselben Prinzipien begegnen, wie bei der Entwicklungserrregung des tierischen Eies. Wir wollen hier auf die Keimung der Samen etwas näher eingehen, da wir hierüber etwas mehr wissen, als über die chemischen Bedingungen der Tumorenbildung.

Die Keimung der Samen ist insofern der Entwicklungserrregung der Eier vergleichbar, als es sich auch bei der Keimung um eine Entwicklungserrregung ruhender Zellen handelt. Von besonders aufklärender Bedeutung scheinen mir nun die Versuche von Hoyer, die von ihm mit Connstein und Wartenberg begonnen und dann von ihm weitergeführt sind. Diese Versuche sind an ölhaltigen Samen angestellt. Ich kann den Kern der Sache nicht kürzer darstellen als es mit Hoyers Worten möglich ist: „Wenn man Rizinussamen mit Wasser zerreibt und die entstandene Samenölemulsion (Samenmilch) mehrere Tage sich selbst überläßt, beobachtet man nach einiger Zeit ein plötzliches, sprungweises, rapides Ansteigen der Säuremenge, wobei das im Rizinussamen enthaltene neutrale Öl in Rizinusölsäure und Glyzerin zerlegt wird. Diese vor etwa 4 Jahren gemachte erste Beobachtung war bekanntlich der Ausgangspunkt für die Erforschung der Fettspaltung mittels des im Pflanzensamen, speziell im Rizinussamen, enthaltenen lipolytischen Fermentes, welches, seitdem von mehreren Seiten bearbeitet, sich zu einem brauchbaren technischen Fettspaltungsverfahren entwickelt hat.

Unter den eingangs erwähnten Bedingungen setzt die fettspaltende Wirkung des Rizinusfermentes erst nach einiger Zeit ein, dann aber plötzlich sprungweise. Die Ursache für das Auftreten des ‚Sprunges‘ erkannten wir darin, daß eine intensive Spaltung des Fettes in dem Samen nur dann eintritt, wenn eine genügende Menge Säure zugegen ist. Man kann nun die fettspaltende Eigenschaft des Rizinussamens sofort auslösen, wenn man dem Ansatz von vornherein eine gewisse kleine Menge von Säure oder saurem Salze zusetzt. Diese Säuremenge ist je nach der Säureart verschieden. In einer späteren Publikation von mir sind diese Säuremengen genau

festgesetzt worden, wobei es sich zeigte, daß unter den untersuchten Säuren Buttersäure den weitesten Spielraum bezüglich der anzuwendenden Menge zuließ, während z. B. Schwefelsäure und Oxalsäure eine sehr genaue Einhaltung ihrer Mengenverhältnisse erforderten.“¹⁾

Die vielen Versuche von Hoyer gingen nun darauf aus, zu ermitteln, was die Natur der im Samen selbst gebildeten Säure ist, welche den Sprung in der Hydrolyse des Öles im keimenden Samen bedingt. Es handelt sich im wesentlichen um Milchsäure und Kohlensäure, daneben aber um relativ geringe Mengen von Essig- und Ameisensäure. Es finden also in bezug auf die Verwertung der Öle bei der Keimung zwei fundamentale Prozesse statt. Ein Prozeß ist die fermentative Säurebildung — Milchsäure und Kohlensäure, daneben Essigsäure und Ameisensäure; der zweite Prozeß, der von dem ersteren abhängt, ist die „Aktivierung“ des lipolytischen Enzyms durch diese im Samen gebildeten Säuren.

Versuche mit den im Samen selbst gebildeten Säuren ergaben auch die Tatsache, daß diese Säuren die fettsplaltende Wirkung des Rizinussamens auszulösen imstande sind. Eine Tatsache, welche von biologischer Bedeutung ist, möge in diesem Zusammenhang erwähnt werden. Wenn Hoyer zu seinen Versuchen schwach gekeimte Rizinussamen wählte und die (entschälten) Samen halbierte, so zeigte es sich, daß in den Samenhälften, welche den Keimling enthielten, das ölsplaltende Enzym schwächer wirksam ist als in der dem Keimling abgekehrten Hälfte. In stark gekeimten Samen sowie im Keimling war so gut wie kein Ferment mehr vorhanden. „In dem Lebensprozeß der Rizinusbohne wird in dem Maße wie das Rizinusöl zum Wachstum des Keimlings aufgebraucht wird, auch das Ferment nach Ausnutzung seiner splaltenden Funktion unwirksam.“²⁾

Diese Versuche geben uns eine Idee von dem verwickelten Charakter der Vorgänge bei der Entwicklungserregung des Keimes. Die Wasseraufnahme führt zu einem Splaltungsprozeß im Samen, dessen Endprodukt gewisse Säuren — Milchsäure und Kohlensäure — sind. Diese Säure dient — nach der

¹⁾ Hoyer, Über fermentative Fettsplaltung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **50**, 414, 1907.

²⁾ Hoyer, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **37**, 1436, 1904.

Vorstellung von Hoyer — zur „Aktivierung“ der in der Rizinusbohne enthaltenen Lipase; wie in allen Analysen von Lebenserscheinungen stoßen wir auch hier auf Kettenreaktionen. Man kann nun auch im Seeigeli den Nachweis führen, daß mit der Befruchtung sprungweise eine Vermehrung im Säuregehalt eintritt. Zu 50 ccm Seewasser wurden 2 Tropfen einer $\frac{1}{100}$ grammolekularen Lösung von Neutralrot zugefügt. Das Seewasser färbt sich infolge seiner alkalischen Reaktion gelb. „Bringt man nun unbefruchtete und frisch befruchtete Eier des Seeigels (*Strongylocentrotus purpuratus*) gleichzeitig in diese Lösung, so färben sich beide Klassen von Eiern rasch rot. Bringt man sie aber nach 20 bis 40 Minuten in normales, ungefärbtes Seewasser zurück, so entfärben sich die unbefruchteten Eier allmählich, während die befruchteten sich immer intensiver rot färben. Man gewinnt den Eindruck, als ob die unbefruchteten Eier den Farbstoff wieder an das umgebende Seewasser abgeben, während die befruchteten Eier fortfahren, denselben dem Seewasser zu entziehen. Man findet so nach etwa einer Stunde zwei Arten von Eiern in der Schale mit Seewasser, ungefärbte, resp. sehr schwach gefärbte, und stärker rot gefärbte; die letzteren sind ausnahmslos Eier, welche eine Membran besitzen und sich später furchen — also befruchtete Eier, während die farblosen Eier keine Membran besitzen und unbefruchtet sind. Das Neutralrot ist ein alkalischer Farbstoff, und er verbindet sich deshalb im Ei mit einer Säure. Das hier geschilderte Verhalten des Neutralrots zeigt an, daß es im befruchteten Ei in festerer Bindung enthalten ist, als im unbefruchteten Ei, wo es bloß gelöst sein könnte.“¹⁾ Der Eidotter enthält relativ große Mengen von Fett und Lipoiden. Die Eier der meisten wirbellosen Tiere sind klein, nicht sehr weit von der Grenze der Sichtbarkeit mit unbewaffnetem Auge. Nichtsdestoweniger enthalten sie Reservestoffe in relativ großer Menge, und unter diesen Reservestoffen befinden sich auch Fette oder Lipoide. Es ist nun durchaus möglich, wenn nicht wahrscheinlich, daß die Entwicklungserregung bei den Keimlingen von Pflanzen sowie bei den Eiern von Tieren gewisse

¹⁾ Loeb, Weitere Beobachtungen über den Einfluß der Befruchtung und der Zahl der Zellkerne auf die Säurebildung im Ei. *Biochem. Zeitschr.* 2, 34, 1906.

Punkte gemeinsam hat, namentlich in bezug auf die Rolle der Spaltung von Fetten oder Lipoiden. Es ist aber auch zu berücksichtigen, daß die Fette oder Lipide, je nachdem sie mehr fest oder flüssig sind, eine etwas verschiedene Behandlung erfordern. Beim Pflanzensamen haben wir es meist mit flüssigen Ölen zu tun, bei den Fetten der Tiere überwiegen die festen Palmitin- und Stearinfette. Es ist verständlich, daß bei der Verarbeitung solcher fester Fette im Ei ein Prozeß hinzukommen muß, der bei ölhaltigen Samen wegen der ohnehin flüssigen Beschaffenheit der Öle überflüssig ist, nämlich die Verflüssigung der Fette. Wir haben schon erwähnt, daß dieser Umstand bei der Membranbildung von Eiern in Betracht kommen könnte. Es könnte sich nämlich nur darum handeln, daß bei der Membranbildung die Fette oder Lipide in eine Form übergeführt werden, in der sie leichter gespalten werden können.

Eine deutlichere Analogie zwischen dem Keimen der Samen und der Entwicklung der Eier ist der bereits von Moritz Traube¹⁾ geführte Nachweis, daß auch die Entwicklung der Samen nur in Gegenwart von freiem Sauerstoff möglich ist. Diese Tatsache ist ganz allgemein gültig. Bei der Keimungserregung von Samen handelt es sich, wie bei der Entwicklungserregung der Eier, um eine Anregung der Nukleinsynthese aus Bestandteilen des Zytoplasmas, und für diesen Vorgang ist freier Sauerstoff erforderlich; und ferner handelt es sich um Kern- und Zellteilungsvorgänge, für welche ebenfalls freier Sauerstoff nötig ist.

Die Analogie der Anregung der Keimung ölhaltiger oder vielleicht aller Samen mit der Befruchtung erleichtert uns auch das Verständnis für die natürliche Parthenogenese. Der Umstand, daß gewisse Eier sich ohne äußere Hilfsmittel und ohne Spermatozoen zu entwickeln vermögen, hat Morphologen oft dazu verleitet anzunehmen, daß dieser Vorgang der natürlichen Parthenogenese keiner weiteren Erklärung bedürfe. Für diejenigen Naturforscher aber, die chemisch zu denken imstande sind, bedarf dieser Vorgang ebenso einer Analyse, wie die Keimung der Samen, die ja auch „von selbst“ erfolgt. Wir sind geneigt anzunehmen, daß die Entwicklungserregung bei

¹⁾ Moritz Traube, Gesammelte Abhandlungen. Berlin 1896. S. 148.

„spontan parthenogenetischen“ Eiern entweder durch eine im Ei nach der Ablage derselben gebildete Säure eingeleitet wird: etwa CO_2 oder Milchsäure, die ja, wie es scheint, in allen lebenden Zellen zu entstehen vermögen; oder aber, daß ein im Blut resp. im Seewasser enthaltener Stoff, z. B. Hydroxylionen, diese Einleitung der Entwicklung besorgen.

Bei einigen parthenogenetischen Formen findet die spontane Entwicklungserregung des Eies im Körper der Mutter statt: z. B. bei den Aphiden, bei denen das Ei sich in der Mutter entwickelt. Bei den meisten Formen aber beginnt die parthenogenetische Entwicklung des Eies erst nach der Ablage desselben. Man muß in diesen letzteren Fällen vermuten, daß im Körper der Mutter ein die Entwicklung hemmender Stoff oder Umstand vorhanden ist, oder daß nach der Eiablage ein die Entwicklung begünstigender Umstand hinzukommt.

Daß vor der Befruchtung im Ei chemische Umsetzungen stattfinden, hat Warburg direkt gezeigt: er konnte im unbefruchteten Seeigeli Oxydationen nachweisen, wenn auch deren Betrag erheblich geringer ist, als nach der Befruchtung. Ich habe gefunden, daß das unbefruchtete Ei relativ rasch zugrunde geht, daß aber gewisse chemische Eingriffe, insbesondere die Hemmung der Oxydationen, das Leben des Eies zu verlängern imstande sind. Es ist deshalb nicht befremdend, daß die im unbefruchteten Ei schon stattfindenden chemischen Vorgänge bei den Eiern mancher Formen zur Entwicklungserregung ausreichen. Da die Säurebildung — insbesondere CO_2 und Milchsäure — in vielen wenn nicht allen Zellen stattfindet, und da, wie wir sahen, diese Säuren zur Entwicklungserregung gewisser Eier dienen können, so ist es auch nicht wunderbar, daß die Eier gewisser Formen ohne äußeren Anstoß und ohne Spermatozoon sich entwickeln können.

Wenn nun chemische Prozesse, namentlich Oxydationen, allgemein in unbefruchteten Eiern stattfinden, und wenn diese Prozesse in den Eiern mancher Formen ausreichen, um zur Entwicklung zu führen, so müssen wir die Frage aufwerfen, warum das nicht bei den Eiern aller Tiere der Fall ist. Ich habe eine Beobachtung gemacht, welche hierauf vielleicht einiges Licht wirft. Die Eier, welche eine Tendenz zur spontanen Parthenogenese haben, bilden auch leicht spontan eine

Befruchtungsmembran, während Eier, welche keine Tendenz zur spontanen Parthenogenese haben, auch nie spontan eine Befruchtungsmembran bilden. Als Illustration benutze ich die Eier des Seesterns (*Asterina*) und des Seeigels (*Strongylocentrotus purpuratus*). Die Eier des Seesterns bilden gelegentlich spontan eine Befruchtungsmembran, und sie können sich auch gelegentlich spontan entwickeln. Die Eier von *S. purpuratus* aber furchen sich nie spontan und bilden auch nie spontan eine Befruchtungsmembran. Andererseits findet man bei einer andern Seeigelart, *Strongylocentrotus franciscanus*, gelegentlich ein paar Eier, die anfangen sich zu furchen und sich in zwei oder drei Zellen zu teilen, aber dann zerfallen. Ich habe nun gefunden, daß solche Eier vor der Furchung eine etwas abnorme, aber unverkennbare Membran bilden.

Wenn man von der Ansicht ausgeht, daß die Membranbildung darauf beruht, daß eine an der Oberfläche des Zytoplasmas bestehende Emulsion zerstört wird, so kann man sich vorstellen, daß die Unterschiede in der Haltbarkeit dieser Emulsion darüber entscheiden, ob die Eier einer Form sich parthenogenetisch entwickeln können oder nicht. In Eiern, in welchen die Haltbarkeit dieser Emulsion relativ gering ist, können die im unbefruchteten Ei stattfindenden chemischen Prozesse ausreichen, um die Membranbildung und damit die Entwicklung anzuregen, während in den Eiern, in welchen diese Emulsion einen höheren Grad der Haltbarkeit besitzt, keine spontane Membranbildung und keine Entwicklung möglich ist.

Vielleicht hängt damit auch die Tatsache zusammen, welche wir im dritten Kapitel erwähnt haben, nämlich daß die parthenogenetische Entwicklung oft nur zur Entstehung von Individuen einerlei Geschlechtes führt. Bei vielen, wenn nicht allen, Formen ist das Geschlecht dadurch bestimmt, daß es zwei Arten von Eiern gibt, männliche und weibliche. Es ist nun möglich, daß diese zwei Arten von Eiern sich u. a. auch dadurch unterscheiden, daß nur die eine Gruppe von Eiern sich parthenogenetisch zu entwickeln vermag, während die Eier, welche das andere Geschlecht bestimmen, der Befruchtung bedürfen.

Über die Entwicklungserregung bei Tumoren wissen wir

nichts Bestimmtes. Es muß sich in letzter Instanz um chemische Entwicklungserregung von Gewebszellen handeln, von der Art, wie bei der künstlichen Parthenogenese. Ob nun die hierbei spezifisch wirkenden Stoffe direkt oder indirekt von Parasiten geliefert werden, oder ob sie im Körper des Wirtes entstehen, kann nur die Spezialforschung entscheiden.

XXVII. Die Superposition von künstlicher Parthenogenese und Samenbefruchtung in demselben Ei.

1. Es gibt zwei Variationen des Themas der Befruchtung: Einmal die Befruchtung von Eiern mit gewöhnlichen Körperflüssigkeiten statt mit Samen. In einem früheren Abschnitt haben wir die Lösung dieses Problems kennen gelernt. Die zweite Variation ist die Befruchtung durch Samen, nicht von Eiern, sondern von Körperzellen. Zu dem letzteren Thema kann ich nur Ansätze bieten, die vor 5 Jahren begonnen wurden, die ich aber noch nicht systematisch habe weiterführen können. Diese Ansätze bestehen in der erfolgreichen Befruchtung von einzelnen Zellen eines in parthenogenetischer Entwicklung begriffenen Eies durch Spermatozoen. Man findet allgemein die Behauptung, daß es nicht gelinge, bereits befruchtete Eier noch einmal zu befruchten. Das ist insofern ganz richtig, als die Bildung der Befruchtungsmembran, welche nach dem Eindringen eines Spermatozoons erfolgt, das Eindringen von weiteren Spermatozoen unmöglich macht. Man kann sich hiervon leicht überzeugen, wenn man die künstliche Membranbildung durch Buttersäure hervorruft und hinterher Samen zusetzt. Solche Eier können nicht durch Samen befruchtet werden, sondern gehen zugrunde; vorausgesetzt, daß sie nicht hinterher mit hypertonischem Seewasser oder mit Zyankalium behandelt, oder einige Stunden ohne Sauerstoff gehalten werden. Sie können aber mit Erfolg durch Samen befruchtet werden, wenn wir die Membran zerstören und dann Samen zusetzen. In diesem Falle tritt eine neue Membranbildung und die für Samenbefruchtung typische Entwicklung ein. Man hat nun behauptet, daß merogonische

Befruchtung, d. h. die Befruchtung eines Stückes vom Zytoplasma, das vom Ei abgetrennt ist, nicht mehr gelingt, wenn das Ei vorher mit Samen befruchtet war. Ich bin geneigt, diese negative Angabe als unberechtigt anzusehen: vermutlich sind nicht genug Versuche angestellt; vielleicht handelt es sich auch nur um eine Erschwerung des Eindringens des Samens in das Zytoplasma. Jedenfalls ist es mir gelungen, isolierte Blastomeren eines chemisch zur Entwicklung angeregten Seeigeleies mit Samen zu befruchten.

Die betreffenden Versuche habe ich schon vor 5 Jahren angestellt. Unbefruchtete Seeigeleier wurden durch Behandlung mit hypertonischem Seewasser zur Entwicklung ohne Membranbildung angeregt. In verschiedenen Entwicklungsstadien wurden einzelne Proben solcher Eier in eine besondere Schale übertragen und Samen zugesetzt. Bei den Eiern, welche im 2-, 4-, 8- und 16-Zellstadium waren¹⁾, konnte man sehen, wie fast sofort nach Samenzusatz jede dieser einzelnen Zellen des befruchteten Eies eine besondere Befruchtungsmembran bildete. Bei noch kleineren Blastomeren, z. B. den Zellen des 32-Zellstadiums, war die Erkennung der Membran unsicher. Die Membranbildung war um so deutlicher, je jünger das Furchungsstadium war, wodurch man den Eindruck gewinnt, als ob die Ausscheidung von Kolloid nach dem Eindringen des Spermatozoons mit der Zunahme der Oberfläche der Eimasse abnimmt. Je kleiner die Zelle war, um so dichter lag die Membran der Blastomere an.

Solche Blastomeren entwickeln sich im allgemeinen nicht zu Pluteen, sondern sterben relativ früh ab. Den Grund hierfür suche ich in ähnlichen Bedingungen, wie diejenigen, welche der Entwicklung eines mit zwei Spermatozoen befruchteten Eies im allgemeinen ein vorzeitiges Ende bereiten. Driesch fand, daß Eier, welche durch mehr als ein Spermatozoon befruchtet werden, sich meist nicht über das Blastulastadium hinaus entwickeln.²⁾ Boveri hat das damit erklärt, daß ein

¹⁾ Loeb, Über die Superposition von künstlicher Parthenogenese und Samenfertilisation in demselben Ei. Arch. f. Entwicklungsmechanik **23**, 479, 1907.

²⁾ Driesch, Über die Furchung doppelbefruchteter Eier. Zeitschr. f. wissensch. Zool. **55**, 1892.

solches Ei mehr als zwei Astrosphären hat.¹⁾ Wie bekannt, wird die Teilung des Kerns in zwei Tochterkerne dadurch bestimmt, daß das sich furchende Ei zwei Astrosphären bildet. Das ist nicht nur der Fall bei der Samenbefruchtung, sondern auch bei der durch die künstliche Membranbildung angeregten Entwicklung. In beiden Fällen bilden sich zwei Astrosphären. Dringen aber zwei Spermatozoen in das Ei, so bilden sich nicht nur zwei, sondern drei oder vier Astrosphären.

Verursachen wir nun die Furchung eines unbefruchteten Eies durch Behandlung desselben mit hypertonischem Seewasser, so bilden sich, wenn die Eier nicht zu lange exponiert sind, zwei Astrosphären, und die Teilung des Kerns verläuft regelmäßig. Waren aber die Eier zu lange in der hypertonischen Lösung, so zerfällt das Ei in mehr als zwei Zellen auf einmal; nach Morgan deshalb, weil es mehr als zwei Astrosphären gebildet hat.

Es mag hier der Platz sein, auf einen Vorzug derjenigen Methoden der künstlichen Parthenogenese hinzuweisen, welche mit der künstlichen Membranbildung beginnen. Wenn man bei Seeigeleiern die künstliche Membranbildung veranlaßt, so ist die erste Furchung ausnahmslos genau so regelmäßig wie bei der Befruchtung mit Samen. Das ist namentlich dann auffallend, wenn man die Eier nach der Membranbildung eine Zeit lang mit Zyankalium behandelt und alle oder viele zur Entwicklung bringt. Bei der Anwendung hypertonischer Lösungen bleibt diese Regelmäßigkeit auch erhalten, aber nur dann, wenn die Eier nicht zu lange in der hypertonischen Lösung bleiben. Je früher die Eier aus der letzteren herausgenommen werden, um so größer die Zahl der sich regelmäßig furchenden Zellen. Überschreitet man aber diese minimale Expositionsdauer, so treten leicht Unregelmäßigkeiten der Furchungen ein: die Eier zerfallen in drei oder vier Zellen auf einmal, was nach Morgan oder Boveri auf die Existenz von drei oder vier anstatt zwei Astrosphären hinweisen würde. Es ist also nur die Überexposition der Eier in der hypertonischen Lösung, welche zu

¹⁾ Boveri, Zellenstudien. Heft 6. — Die Entwicklung dispermer Seeigeleier. Leipzig 1907.

Unregelmäßigkeiten in der ersten Furchung Anlaß gibt, aber nicht die Tatsache der parthenogenetischen Entwicklung.

Wie kommt es nun, daß nur solche Eier sich zu lebensfähigen Larven entwickeln, bei denen die erste Furchung zur Bildung von nur zwei Zellen führt? Darauf gibt Boveri folgende Antwort. Bei der normalen Kernteilung spaltet sich jedes Chromosom längsweise in zwei gleiche Stücke, von denen je eins in jede der beiden Astrosphären und damit in den neuen Kern geht; so daß also nach der abgelaufenen Teilung jeder der beiden Tochterkerne quantitativ und qualitativ das gleiche Chromosomenmaterial enthält. Dringen aber zwei Spermatozoen in ein Ei, so bilden sich drei oder vier Astrosphären und entsprechenderweise drei oder vier Tochterkerne. Da aber jedes Chromosom des Mutterkerns nur in zwei Teilstücke zerfällt, so ist es natürlich unmöglich, daß in diesem Falle jeder Tochterkern eine Hälfte von jedem Chromosom des Mutterkerns enthält. Boveri und viele andere Autoren nehmen — und wohl mit Recht — an, daß die verschiedenen Chromosomen des Kerns physiologisch ungleichwertig sind. Man sieht also, daß danach nur bei der regelmäßigen Kernteilung mit zwei Astrosphären gleichartige und vollwertige Tochterkerne entstehen, daß aber bei der Gegenwart von drei oder mehr Astrosphären die einzelnen Tochterkerne nicht die volle Zahl und in der Regel nicht qualitativ das gleiche Kernmaterial erhalten.

Diese Hypothese würde dann auch erklären, warum die Superposition von künstlicher Parthenogenese und Samenbefruchtung unter gewissen Bedingungen die Lebensdauer der Larven verkürzt und denselben nicht gestattet, das Pluteenstadium zu erreichen. Wenn wir nämlich die Eier durch die alte osmotische Methode, d. h. ohne Membranbildung, zur Entwicklung veranlassen und dann eine Zelle des 2- oder 4-Zellstadiums mit Samen befruchten, so findet die nächste Teilung einer solchen Zelle nicht in zwei Zellen statt, sondern in drei oder vier. Zu den Astrosphären, welche sich infolge der parthenogenetischen Entwicklungserregung bereits in der Zelle bilden, treten noch die durch das Spermatozoon bestimmten Astrosphären; die nächste Teilung des Kerns einer solchen Zelle führt also zu einer Bildung von mehr als zwei und im allgemeinen auch qualitativ ungleichen Tochterkernen. Sie sind

also in derselben Lage wie ein disperm befruchtetes Ei und haben deshalb dieselbe beschränkte Lebensfähigkeit, welche dem letzteren zukommt. Ich fand nun tatsächlich, daß die nachträgliche Samenbefruchtung der durch hypertonische Lösungen zur Entwicklung angeregten Eier die Lebensfähigkeit derselben verminderte. Solche Eier starben früh, während die bloß chemisch befruchteten Eier das Pluteusstadium erreichten und sich vermutlich zu geschlechtsreifen Tieren entwickelt haben würden, wenn sich jemand die Mühe genommen hätte, dieselben aufzuzüchten.

2. Trotz dieser Mißerfolge ließ ich mich nicht von dem Vorhaben abschrecken, doch noch einmal zu versuchen, ob sich die Samenbefruchtung von Blastomeren eines Eies nicht doch mit Erfolg durchsetzen ließe, d. h. ob sich auf diese Weise nicht doch normale Larven erzielen lassen. Das gelang mir nach Wunsch in der folgenden Weise: Es war mir oft bei der rein osmotischen Methode der Entwicklungserregung unbefruchteter Eier von *Strongylocentrotus purpuratus* aufgefallen, daß man mit dieser Methode nicht etwa nur völlig negative Resultate oder nur positive Resultate, d. h. Larvenbildung, erhält, sondern daß man gelegentlich beobachtet, daß eine kleine Zahl von Eiern durch diese Methode veranlaßt wird, sich in zwei oder vier oder acht Zellen zu teilen, und daß dann die Entwicklung zum Stillstand kommt. Solche Eier, oder vielmehr Blastomeren, geraten alsdann wieder in einen Ruhezustand, in dem sie offenbar eben so lange, wie die intakten Seeigelleier leben können. Nebenbei gesagt, schien mir diese Tatsache eine schlagende Widerlegung der alten Behauptung zu sein, daß das Spermatozoon zur Befruchtung nur die Maschinerie im Ei in Bewegung zu setzen brauche; sei dies einmal geschehen, so gehe die Uhr von selber weiter. In diesen Fällen war die Maschine im Ei in Bewegung gesetzt, sie kam aber etwas vorzeitig zum Stillstand. Die Phrase von der „Reizwirkung“ läßt hier, wie immer bei weiterem Fortschritt in der Biologie, im Stich. Der Umstand, daß die Eier in diesen Versuchen sich nicht weit genug entwickelten, ist auf einen der beiden oder eine Kombination der folgenden zwei Umstände zurückzuführen: entweder war die Konzentration der Hydroxylionen in der hypertonischen Lösung zu niedrig oder

der osmotische Druck der hypertonen Lösung war nicht hoch genug.¹⁾

Ich benutzte nun Eier, welche durch eine derartige Lösung zur Furchung in zwei oder vier Zellen veranlaßt waren und welche dann eine Reihe von Stunden in völliger Ruhe verharrten und dabei ihr völlig normales Aussehen behielten, zu weiteren Versuchen. Wenn man zu solchen Eiern Samen zufügte, so bildete jede Blastomere eine besondere Befruchtungsmembran, und man konnte leicht feststellen, daß jeder dieser Blastomeren sich regelmäßig erst in zwei und dann in vier, acht usw. Zellen teilte. Diese Blastomeren entwickelten sich dann zu normalen Blastulen und Gastrulen. In einem derartigen Versuch waren unbefruchtete Seeigeleier in eine Mischung von 50 ccm $\frac{3}{8}$ CaCl₂ + 1,6 ccm $\frac{n}{50}$ NaHO gebracht worden. (Die CaCl₂-Lösung an sich war neutral.) Diese Lösung war ein wenig hypertone. Nach etwa 20 Stunden fand man eine kleine Zahl von Eiern, die völlig regelmäßig in zwei bis vier Zellen gefurcht waren. Diese Furchung ging aber nicht weiter, auch nachdem die Eier in normales Seewasser zurückgebracht waren. Die Eier wurden dann in normalem Seewasser durch Samen befruchtet. Nicht nur die ungefurchten Eier bildeten eine Befruchtungsmembran, sondern auch jede einzelne Blastomere der gefurchten Eier, die sich im 2- und 4-Zellstadium befanden, umgab sich mit einer besonderen, vollständigen Befruchtungsmembran. Diese Blastomeren teilten sich alle ohne Ausnahme regelmäßig in je zwei Zellen; die weitere Furchung verlief ebenfalls regelmäßig, und vollkommen normale Blastulen wurden erhalten. Am nächsten Tage fand man völlig normale Zwerggastrulae. Die Entwicklung wurde nicht weiter verfolgt.²⁾

Warum erhielten wir nun normale Furchung bei der Samenzufuhr von Eiern, bei denen die parthenogenetische Furchung seit mehreren Stunden zum Stillstand gekommen war, und warum

¹⁾ Eine dritte Möglichkeit wäre eine eventuelle Schädigung des Eies. Aber der Umstand, daß die Blastomeren der gefurchten Eier intakt blieben, schließt diese Möglichkeit aus.

²⁾ Loeb, Über die Superposition von künstlicher Parthenogenese und Samenzufuhr in demselben Ei. Arch. f. Entwicklungsmechanik **23**, 479, 1907.

erhielten wir abnorme Furchung und Entwicklung bei der Samenbefruchtung von Eiern, welche in der parthenogenetischen Furchung begriffen waren? Ich vermute, daß der Unterschied darin besteht, daß die letzteren überzählige Astrosphären besaßen, nämlich die durch die Samenbefruchtung gebildeten und die durch die chemische Befruchtung hervorgerufenen. Solche Eier sind demnach in derselben Lage, wie Eier, in welche mehr als ein Samenfadendringt. Wenn diese Annahme richtig ist, so ist die notwendige zweite Annahme, daß Eier, bei welchen die chemische Entwicklungserregung unvollständig ist und nur bis zur Bildung von vier oder acht Zellen führt, nach Ablauf dieser Entwicklung ihre Astrosphären oder Zentrosomen wieder verlieren. Die Frage, ob die Zentrosomen transitorische oder permanente Gebilde sind, wird viel diskutiert. Es erscheint nach diesen Beobachtungen, als ob wenigstens beim Ei, das in den Ruhezustand gerät, diese Zentrosomen wieder verschwinden. Die Astrosphären sind selbstverständlich nur transitorische Gebilde, die nur in einer bestimmten Phase der Kernteilung auftreten. Ich bin geneigt, dieselben als Emulsionserscheinungen aufzufassen.

3. Man könnte die Frage aufwerfen, ob die Zentrosomenbildung im Ei eine direkte Folge der Methoden der künstlichen Parthenogenese ist, oder nur eine indirekte, insofern als diese Methoden zunächst chemische Wirkungen im Ei haben, welche ihrerseits erst nach längerer Zeit zur Bildung der Zentrosomen resp. Astrosphären führen. Es läßt sich leicht zeigen, daß das letztere zutrifft. Wenn man die Membranbildung im unbefruchteten Ei von *Strongylocentrotus* durch eine Fettsäure hervorruft, so bildet das Ei bei 15° C erst nach etwa 2 Stunden oder mehr die beiden Astrosphären.¹⁾ Das weist schon daraufhin, daß dieser Prozeß nicht direkt durch die Säurebehandlung hervorgerufen ist, sondern durch Prozesse, die sich erst nach langer Zeit, nachdem die Eier wieder in das alkalische Seewasser gebracht wurden, abspielen. Auch nach dem Eintritt des Spermatozoons ins Ei bilden sich die Astrosphären im Ei, nur erfolgt der Prozeß hier sehr viel rascher. Wäre die Astro-

1) Der Leser wird sich erinnern, daß die Eier nur 1 bis 3 Minuten in dem sauren Seewasser bleiben, daß sie aber dann in normales Seewasser zurückgebracht werden. Erst nachdem sie 2 oder 3 Stunden in dem letzteren waren, bilden sich die Astrosphären.

sphärenbildung, welche der Fettsäurebehandlung des Eies folgt, eine direkte Säurewirkung — etwa eine Säuregerinnung —, so müßte das Ei, in dem man beide Eingriffe, die Fettsäurebehandlung und die Samenbefruchtung, vereinigt, sich in vier Zellen auf einmal teilen und nicht in zwei; und es müßte außerdem ebenso rasch zugrunde gehen, wie die Eier, die mit zwei Spermatozoen befruchtet werden.

Dr. Kupelwieser und ich stellten diesen Versuch an, indem wir die Membranbildung bei unbefruchteten Eiern mittels Buttersäure hervorriefen, diese Membran dann unmittelbar nach der Bildung derselben durch Schütteln der Eier zum Platzen brachten und sofort Samen zufügten. Die Eier bildeten eine neue, dem Zytoplasma dicht anliegende Membran und furchten sich mit einer der Samenbefruchtung entsprechenden Geschwindigkeit, und zwar zunächst ausnahmslos in zwei Zellen, und in völlig regelmäßiger Weise.¹⁾ Die Erklärung ist sehr einfach. Beide Eingriffe, der Eintritt des Spermatozoons wie die Hervorbringung der Membranbildung durch Buttersäure, setzen die gleichen chemischen Prozesse in den Gang, die in beiden Fällen zur Bildung von Spindeln führen; nur erfolgt der Vorgang im Falle der Samenbefruchtung erheblich rascher. Bei der Kombination beider Befruchtungsmethoden im selben Ei ist die Bildung der Spindel lediglich eine Folge der Wirkung des Spermatozoons, lange ehe die chemische Wirkung der Säure Zeit hat, zu demselben Resultat zu führen. Solche Eier bilden deshalb nur zwei Astrosphären, und furchen sich völlig regelmäßig und entwickeln sich völlig normal. Alle erreichten das Pluteenstadium.

Ich hatte schon früher den Versuch in umgekehrter Ordnung angestellt. Eier wurden zuerst mit Samen befruchtet und dann gleich darauf während der zur Membranbildung nötigen Zeit mit Fettsäure behandelt. Solche Eier furchten sich normal; die erste Furchung war eine normale Zweiteilung, und sie entwickelten sich in völlig normaler Weise zu Pluteen. Der einzige schlechte Erfolg, der bei diesem Versuch beobachtet wird, besteht darin, daß, wenn man die befruchteten Eier zu lange, d. h. 3 Minuten anstatt $1\frac{1}{2}$ bis 2 Minuten, einer Lösung von

¹⁾ Loeb, l. c.

50 ccm Seewasser + 3,0 ccm $\frac{n}{10}$ Buttersäure aussetzt, die Zeit des Eintritts der ersten Furchung um einige Minuten verzögert wird.¹⁾

Diese Versuche lassen meines Erachtens keinen Zweifel darüber bestehen, daß die Astrosphärenbildung, welche durch die Membranbildung mittels Säure veranlaßt wird, nur eine indirekte Wirkung dieses Eingriffes oder vielmehr der Membranbildung ist und sicherlich nicht als eine Säuregerinnung oder sonstige Säurewirkung bezeichnet werden darf.

4. Mit der Entwicklung der Zellforschung trat naturgemäß das Bedürfnis ein, die Befruchtung mit der Zellmorphologie in Einklang zu bringen, und das geschah in der Aufstellung der Behauptung, daß das Wesen der Befruchtung in der Vereinigung zweier Zellen bestehe, der Eizelle und der Samenzelle. O. Hertwig lenkte die Aufmerksamkeit auf die Kernnatur des Spermatozoons und ersetzte die erwähnte zellmorphologische Formulierung durch die Behauptung, daß die Befruchtung in der Verschmelzung zweier Kerne bestehe, des Eikernes und des Samenkernes. Boveri erkannte die Unzulänglichkeit dieser Definition (die wahrscheinlich für die Tatsache der Übertragung der väterlichen Eigenschaften von Bedeutung ist, dagegen bedeutungslos ist für die eigentliche Entwicklungserregung). Er konnte sich auf die Tatsache der Merogonie stützen, d. h. der Entwicklungserregung kernloser Eifragmente unter dem Einfluß des Spermatozoons. Eine weitere Stütze brachten die Versuche über künstliche Parthenogenese. In beiden Fällen tritt eine Entwicklungserregung ohne die Verschmelzung von zwei Kernen ein. Boveri suchte nun nach einer anderen Definition der Befruchtung oder Entwicklungserregung und fand dieselbe in der Annahme, daß das unbefruchtete Ei sich deshalb nicht entwickle, weil ihm das Organ zur Zellteilung fehle, und dieses Organ sei das Zentrosom, welches erst durch das Spermatozoon in das Ei getragen werde, und zwar in der Form des Mittelstücks.²⁾ Diese Ideen von Boveri bedeuten einen wesentlichen Fortschritt gegen die älteren Ansichten von Hertwig. Es ist aber nötig, die Ansichten von Boveri durch zwei Zusätze zu

1) Loeb, Arch. f. Entwicklungsmechanik **23**, 479, 1907.

2) Boveri, Das Problem der Befruchtung. Jena 1902.

ergänzen; nämlich erstens, daß Zentrosomen oder Astrosphären auch ohne Spermatozoon im Ei entstehen können, und zwar in völlig normaler Weise. Wenn wir die Membranbildung im Ei mit einer Fettsäure hervorrufen, so bildet sich nach etwa 2 bis 3 Stunden (bei 15° C) eine typische normale Kernspindel; und solche Eier können sich, wie wir gesehen haben, völlig normal entwickeln, wenn man nur die durch die Membranbildung erweckte Tendenz zur Zytolyse beseitigt. Die zweite Ergänzung zu Boveris Ansicht besteht darin, daß die Zentrosomen wieder verschwinden können, wenn sie einmal vorhanden sind. Das erfolgt aus den vorhin erwähnten Versuchen, in denen nur die ersten Zellteilungen in Eiern durch hypertonsche Lösungen angeregt werden, worauf die Eier wieder in einen normalen Ruhezustand verfallen, in dem ihre Blastomeren durch Samen befruchtet und zur normalen Furchung und Entwicklung angeregt werden können. Diese Eier müssen aber doch zwei Zentrosome besessen haben, da sie sich furchen. Die Zentrosomen müssen aber wieder verschwunden sein, da ja sonst das nachträgliche Eindringen eines Spermatozoons in eine derartige Blastomere dieselbe zwingen müßte, sich in drei oder vier Zellen, anstatt in zwei, zu teilen. Dieser Umstand, daß die Zentrosomen wieder verschwinden können, scheint mir für das Verständnis der Ruhezustände des Eies von großer Bedeutung zu sein. Bei der Reifungsteilung des Eies müssen ja Zentrosomen im Ei vorhanden sein. Warum sind sie nicht imstande, auch die Entwicklungserregung des Eies zu besorgen? Sie müssen entweder inaktiviert werden oder völlig verschwinden. Daß das letztere zutrifft, folgt daraus, daß bei der nachträglichen Befruchtung oder künstlichen Entwicklungserregung des Eies dasselbe sich in zwei Zellen teilt und nicht in mehr.

Daß andererseits die bloße Gegenwart der Zentrosomen für die Entwicklungserregung nicht genügt, ist schon von Mead betont worden (siehe Kap. 2). Wenn das Ei von Chätopterus das Ovarium verläßt, so ist es noch nicht reif. Sobald es ins Seewasser kommt, bildet sich die Spindel, die der Abschnürung des ersten Polkörperchens voraufgeht. In diesem Zustand verharrt das Ei, und trotz der Bildung der beiden Astrosphären kommt es zu keiner Teilung. Erst wenn das Spermatozoon

ins Ei tritt oder dem Seewasser etwas Kalium zugesetzt wird, kann die Furchung weitergehen.

Wie ich schon erwähnte, bin ich geneigt, in der Spindelbildung den Ausdruck von Emulsionsvorgängen oder Verflüssigungsvorgängen zu sehen, welche durch Enzyme bedingt sind, die aber vielleicht durch sogenannte Kofermente beschleunigt werden. Im Falle von *Chätopterus* könnte Kalium die Rolle des Kofermentes übernehmen.

5. Wir müssen schließlich die Frage aufwerfen, ob eine Superposition von Samenbefruchtung und künstlicher Parthenogenese im selben Ei die Geschwindigkeit der Entwicklung vergrößert.

Wenn es wahr ist, daß die Befruchtung die Oxydationsvorgänge und gewisse Spaltungsvorgänge im Ei beschleunigt (wofür ja alles spricht), so sind folgende Möglichkeiten vorhanden: erstens, das Spermatozoon trägt diese Katalysatoren ins Ei; zweitens, diese Katalysatoren sind im Ei schon vor der Befruchtung vorhanden, aber das Spermatozoon aktiviert diese Katalysatoren, indem es entweder Antifermente oder sonstige Hindernisse im Ei beseitigt, welche diesen Oxydationen im Wege stehen. Die Tatsachen der künstlichen Parthenogenese zeigen, daß nur die letztere Möglichkeit zutrifft. Das wird nun auch durch die Versuche über Superposition von Samenbefruchtung und künstlicher Parthenogenese in demselben Ei bestätigt. Eine Kombination beider Prozesse beschleunigt die Geschwindigkeit und Furchung nicht, wohl aber kann auf diese Weise eine Verringerung der Geschwindigkeit bedingt werden.¹⁾ Die Beseitigung eines Hemmnisses, das der Entwicklung im Wege steht, muß mit der Membranbildung zusammenhängen. Mit dieser Ansicht steht auch die weitere Tatsache im Einklang, daß, wenn zwei oder mehr Spermatozoen statt eines einzigen in ein Ei dringen, die Geschwindigkeit der Furchung dieselbe bleibt. Das widerspricht der Annahme, daß das Ei dadurch die Entwicklung anregt, daß es Katalysatoren ins Ei trägt.

6. Herbst hat die Superposition von Samenbefruchtung und künstlicher Parthenogenese in demselben Ei für das Problem

¹⁾ Loeb, Vorlesungen über die Dynamik der Lebenserscheinungen. Leipzig 1906. S. 252.

der Vererbung benutzt. Er kreuzte zwei Seeigelarten, indem er die Eier von *Sphaerechinus* mit dem Samen von *Strongylocentrotus lividus* befruchtete. Das Skelett der Pluteenstadien beider Formen ist typisch verschieden. Das Skelett der väterlichen Form *Strongylocentrotus* ist einfacher als das der Mutterform *Sphaerechinus*. Das Skelett der letzteren Form ist in den Analarmen gitterartig. Die Mischformen beider Seeigelarten zeigen alle Übergänge von rein mütterlichem Charakter bis zu einer Form, bei der die Gitterbildung zurücktritt, und welche daher mehr als väterliche Formen gedeutet werden können. Herbst fand nun, daß, wenn er zuerst die parthenogenetische Entwicklung der Seeigeleier durch die Fettsäurebehandlung nach meiner Methode anregte und etwa 2 Stunden später, nachdem der Kern gewisse Veränderungen zeigte, dieselben Eier mit Samen befruchtete, eine größere Anzahl Larven ausgesprochen mütterliche Skelette bildeten, als bei der einfachen hybriden Befruchtung von Eiern, die nicht mit Fettsäure behandelt waren. Im letzteren Falle fanden sich gewöhnlich Bastarde vor, welche in der äußeren Form und auch am Skelett den männlichen Vererbungsteil sehr deutlich zu erkennen gaben. „Ganz anders dagegen das Bild, das sich dem Auge in der Kultur b_1 darbot“ (Kultur b_1 bestand aus Eiern, die erst 8 Minuten in 50 ccm Seewasser + 3 ccm $\frac{1}{10}$ n Essigsäure behandelt, dann 2 Stunden 20 Minuten später mit Samen befruchtet worden waren). Bei diesen Eiern „traten die männlichen Charaktere viel mehr zurück und die mütterlichen sehr viel mehr, ja zum Teil außerordentlich stark hervor, was sich namentlich an der Häufigkeit schöner Gitterstäbe in den Analfortsätzen kundgab, die mitunter sogar richtige dreikantige *Sphaerechinus*-Gitterstäbe waren. Trotzdem konnte man den Larven doch noch den Bastardursprung ansehen, da reine *Sphaerechinus*-Plutei unter ihnen nicht zu finden waren. Dadurch, daß wir den Eiern vor der Befruchtung durch die Behandlung mit einer schwachen Essigsäurelösung in Seewasser einen geringfügigen Anstoß zur Parthenogenese gegeben hatten, war es also zu einem bedeutend stärkeren Hervortreten der mütterlichen Eigenschaften gekommen.“¹⁾

¹⁾ Herbst, Vererbungstudien IV. Arch. f. Entwicklungsmechanik **22**, 473, 1906. Die Fortsetzung dieser Versuche findet sich in Vererbungstudien V. Arch. f. Entwicklungsmechanik **24**, 185, 1907.

Ich muß aber hinzufügen, daß Kreuzungsversuche zwischen *Strongylocentrotus purpuratus* und *Strongylocentrotus franciscanus*, welche Herr Hagedoorn in meinem Laboratorium anstellte, ganz andere Resultate gaben.¹⁾ Er fand nämlich, daß auch die frisch mit dem Samen des anderen Seeigels befruchteten Eier nur rein mütterliche Plutei bildeten. Das stimmt überein mit den Resultaten, welche ich und Godlewski bei den Hybriden zwischen Seeigelei und Seestern- resp. Krinoidensamen beobachteten und was ich neuerdings auch bei der Kreuzung von Seeigelei und Molluskensamen feststellen konnte.²⁾ Entweder ist das Resultat von Herbst durch die Nichtberücksichtigung der pathologischen Variation der Skelette beeinflusst, oder die Bastarde der von ihm benutzten Seeigeleier verhalten sich anders als diejenigen der von Godlewski, Hagedoorn und mir beobachteten.

Es wäre vielleicht von Interesse, die Hybridisation bei denselben Formen, mit denen Herbst arbeitete, aber in der umgekehrten Ordnung zu wiederholen, nämlich die Eier von *S. lividus* mit dem Samen von *Sphaerechinus* zu befruchten. Die Skelette beider Formen unterscheiden sich wesentlich dadurch, daß *Sphaerechinus* das kompliziertere Skelett hat. Wenn nun die Entwicklung der Skelette bei den hybriden Larven zeitlich etwas verzögert ist, so gewinnt man leicht den Eindruck, als ob sich nur das einfachere Skelett entwickelt habe. Diese Fehlerquelle würde bei der Befruchtung der Eier von *Strongylocentrotus lividus* mit dem Samen von *Sphaerechinus* fortfallen.

¹⁾ Hagedoorn, On the Purely Maternal Character of the Hybrids Produced from the Eggs of *Strongylocentrotus*. Arch. f. Entwicklungsmechanik 27, 1909.

²⁾ Loeb, Über die Natur der Bastardlarve zwischen Echinodermenei und Molluskensamen. Ibid. 1909.

Anhang.

Über die sogenannte „Gerinnungstheorie“ der Entwicklungserregung.

Vor einigen Jahren veröffentlichten M. Fischer und Ostwald eine Abhandlung, die darin gipfelt, daß alle Agenzien, welche eine Gerinnung hervorrufen können, „mit Erfolg zur Herbeiführung der Befruchtung entweder normalerweise benutzt, oder aber künstlich verwendet werden können“. Dieser Behauptung liegt als einzige Tatsache die Beobachtung des Botanikers A. Fischer zugrunde, daß künstliche Astrosphären in Albumoselösungen durch Kriställchen von Sublimat und anderen Stoffen herbeigeführt werden können. Da nun Boveri das Wesen der Entwicklungserregung darin sieht, daß ein Zentrosom durch das Spermatozoon ins Ei getragen wird, so suchen Fischer und Ostwald darzutun, daß alle Mittel der künstlichen Parthenogenese eine gerinnende Wirkung haben und daß das Produkt der Gerinnung das Zentrosom oder die Astrosphäre sei, welche die Entwicklung in den Gang setze.¹⁾ Die Hypothese von Fischer und Ostwald über die künstliche Parthenogenese lautete folgendermaßen: „Wir wollen nun im folgenden den Nachweis zu erbringen versuchen, daß sämtliche Mittel, durch welche eine Astrosphärenbildung im Ei oder eine Befruchtung hervorgerufen werden kann, Mittel sind, durch welche ein Sol von der ungefähren Beschaffenheit des Eiplasmas zur Gelbildung veranlaßt werden kann. Umgekehrt können wir sagen, daß mit kaum einer Ausnahme alle Methoden, die die physikalische Chemie zur Gelbildung kennt, mit Erfolg zur Herbeiführung der Befruchtung entweder normalerweise benutzt oder aber künstlich verwendet werden können.“

Nun beruht die Annahme von Fischer und Ostwald, daß die entwicklungsregenden Mittel direkt die Astrosphärenbildung hervorrufen und daß in letzterer das Wesen der Entwicklungserregung bestehe, auf einem Irrtum. Wir haben gesehen, daß die Astrosphärenbildung erst einige Stunden nach der künstlichen Membranbildung eintritt. Fischer und Ost-

¹⁾ M. Fischer und Wo. Ostwald, Zur physikalisch-chemischen Theorie der Befruchtung. Pflügers Arch. **106**, 229, 1905.

wald erklären sogar die Membranbildung als eine Folge der Gerinnung, welche der Astrosphärenbildung zugrunde liege. So behaupteten sie auf Seite 245: „Und zwar entsprechen der äußerlichen Trennung von, kurz gesagt, Gel und Lösungsmittel die Fälle, bei welchen eine Befruchtungsmembran bei der Astrosphärenbildung, wie z. B. beim Seeigellei, abgehoben wird.“ Die Autoren stellen sich also vor, daß bei der Membranbildung zuerst die Astrosphären gebildet werden, was eine Gerinnung eines bestimmten Teiles des Eies bedeute, und daß das Gerinnen Flüssigkeit auspresse, wodurch die Membran des Eies abgehoben werde. Diese Vorstellung ist aber in allen Einzelheiten unrichtig. Die Flüssigkeit, welche unter der Membran liegt und möglicherweise deren Abhebung bedingt, stammt gar nicht aus dem Ei, sondern aus dem Seewasser. Und zweitens, die Astrosphärenbildung findet erst einige Stunden nach der Membranbildung statt — was bereits erwähnt wurde.

Mit dem Nachweis der Irrigkeit der letzteren Voraussetzung fällt die Hypothese von Fischer und Ostwald: denn ihrer Annahme, daß alle Mittel, welche die Entwicklung des Eies anregen, Gerinnungserreger sind, liegt eben die irrige Vorstellung zugrunde, daß die Bildung der Astrosphären die unmittelbare Wirkung der Methoden der künstlichen Parthenogenese sei.

Aber die Behauptung, daß alle entwicklungseregenden Mittel eine koagulierende Wirkung haben, wird gegenstandslos durch den Nachweis, daß alle zytolytischen Mittel die Entwicklung anregen. Daß alle zytolytischen Mittel die Gerinnung herbeiführen, wird nun niemand behaupten wollen.

Benzol, Toluol sind fettlösende Mittel; sie werden mit Erfolg als Antiseptika für Eiweißlösungen angewendet, ohne die Gerinnung der letzteren zu veranlassen. Saponin und Solanin verursachen keine Gerinnung; man kann eher das Gegenteil für sie behaupten, da sie nämlich genau wie Benzol die Verflüssigung des Chorions der Mollusken- und Annelideneier bewirken. Ich glaube auch, daß man im allgemeinen geneigt ist, die Zytolyse auf eine Veränderung der Lipotide, nämlich auf eine Verflüssigung derselben zurückzuführen.

Die Ansicht des Botanikers A. Fischer, daß die Astrosphären der Ausdruck einer Gerinnung seien, ist unabhängig von der Hypothese von Wo. Ostwald und M. Fischer. Ich

finde aber, daß eine Tatsache ihr im Wege steht, nämlich das Aussehen des Eies während der Spindelbildung. Wenn nämlich das Zellprotoplasma gerinnt, so wird die Zelle dunkler, nicht heller. Nun ist es charakteristisch für die Astrosphärenbildung im Ei, daß in der Gegend der Astrosphären das Ei viel heller, d. h. durchsichtiger wird.

Als die Arbeit von Fischer und Ostwald geschrieben wurde, war die Tatsache noch nicht bekannt, daß die hyper-tonische Lösung nur dann bei der künstlichen Parthenogenese wirksam ist, wenn die Lösung freien Sauerstoff in genügender Menge enthält. Ostwald sucht in einer neuen Arbeit seine und Fischers Gerinnungshypothese dieser Tatsache anzupassen.¹⁾ Er schließt sich meiner Meinung an, daß das Wesen der Entwicklungserregung in der Beschleunigung von Oxydationsprozessen im Ei bestehe, hält aber daran fest, daß die Astrosphären der Ausdruck einer Gerinnung seien. „In Kürze ergibt sich, daß die durch die verschiedenartigen Methoden hervorgebrachte Entwicklungserregung in einer auf verschiedenen Wegen hervorgerufenen Konzentrierung resp. Aktivierung der genannten zwei oxydativen Fermente beruht, ein Vorgang, welcher, wie sich aus mehreren Erwägungen ergibt, eine Autoxydation von gewisser Geschwindigkeit einleitet. Diese Autoxydation führt zur chemischen Synthese von Nukleinsubstanzen, welche in Form von orientierten und lokalisierten Niederschlägen (Astrosphären) koagulieren.“

Diese Annahme ist aber, wie mir scheint, sehr verschieden von der früheren Behauptung Ostwalds und Fischers, daß alle Agenzien, welche die künstliche Parthenogenese hervor-rufen, solche sind, welche nach der Erfahrung der physikalischen Chemiker zur Umwandlung eines Sols in einen Gel geeignet sind. Daß die Astrosphären aus einem Niederschlag von Nukleinsubstanzen bestehen, welche synthetisch im Kern gebildet sind, ist eine Annahme, die erst zu beweisen ist.

Diese Kritik erstreckt sich jedoch nicht auf den übrigen Inhalt der Arbeit Ostwalds, welche den wichtigen direkten Nachweis für die Gegenwart verschiedener Oxydasen sowohl im Spermatozoon wie im Ei führt.

¹⁾ Wo. Ostwald, Über das Vorkommen von oxydativen Fermenten in den reifen Geschlechtszellen von Amphibien und über die Rolle dieser Vorgänge bei der Entwicklungserregung. Biochem. Zeitschr. 6, 409, 1907.

XXVIII. Der autokatalytische Charakter der Nukleinsynthese als Grundlage der Kontinuität der Lebewesen und der Vererbung.

Das Spermatozoon hat zwei Wirkungen auf das Ei: es regt erstens die Entwicklung an, und zweitens überträgt es die väterlichen Eigenschaften. Wir haben uns bisher wesentlich nur mit der entwicklungserregenden Wirkung des Spermatozoons beschäftigt und die vererbende Wirkung ganz außer Acht gelassen. Wir wollen uns nunmehr der vererbenden Wirkung zuwenden.

Dem Leser ist es bekannt, daß das Problem der Vererbung im Wesen durch Mendel gelöst worden ist. Die Hybride sind Organismen, welche durch eine Kombination von zwei verschiedenen Geschlechtszellen entstehen. Jeder Hybrid bildet aber zwei Arten von Geschlechtszellen (in gleicher Zahl); eine Hälfte der Geschlechtszellen eines Hybriden hat den reinen Charakter der väterlichen Art, die andere den reinen Charakter der mütterlichen Art. Es erhalten sich also die Stoffe, welche die Vererbung bestimmen, rein und unvermischt im Bastard; die Vorstufen der Geschlechtszellen enthalten beide Arten von Erbstoffen unvermischt, und bei der letzten Teilung dieser Zellen tritt eine Trennung der beiden Arten von Erbstoffen ein, so daß je eine der Tochterzellen die väterlichen, die andere die mütterlichen Stoffe erhält. Was bedingt diese Kontinuität der Erbstoffe?

Die Frage nach dem Mechanismus für die Kontinuität der Erbstoffe ist identisch mit dem eigentlichen „Rätsel des Lebens“; denn das mystischste Element in den Lebenserscheinungen ist die Kontinuität der Organismen. Ich glaube nun, daß dieser Mechanismus sich auf das Prinzip der Autokatalyse zurückführen läßt, nämlich, daß der Zellkern ein Ferment für seine eigene Synthese ist. Die Bedeutung dieser Tatsache für die Erklärung der Kontinuität des Lebens oder der Arten kann in wenigen Worten dargetan werden. Wie Boveri zuerst gezeigt hat, muß der Kern der Träger der erblichen Eigenschaften sein. Diese Behauptung steht nicht im Widerspruch mit der Tatsache, daß die erste Entwicklung des Em-

bryos rein mütterlich ist, aus dem einfachen Grunde, weil diese Entwicklung wesentlich nur die chemische Differenzierung des Eimaterials ist. Aber da das Spermatozoon wesentlich nur ein Kern ist und da der Anteil des Vaters auf die Vererbung im wesentlichen gleich dem der Mutter ist (von der Geschlechtsbestimmung abgesehen), so muß der Kern der wesentliche Umstand sein, der die Vererbung bestimmt. Die automatische Neuschaffung von Kernen bei der Entwicklung ist also das biologische Grundproblem, das die Chemie erklären muß. Der automatische Charakter der Kernbildung findet nun meines Erachtens seine Erklärung darin, daß der Kern ein Ferment oder Katalysator für seine eigene Synthese ist. Den Beweis für diese Annahme sehe ich in den folgenden Tatsachen.

Sachs wies, wie bekannt, zuerst daraufhin, daß die Größe der Zellen der verschiedenen Gewebe eines Tieres erblich bestimmt ist, und daß verschieden große Individuen derselben Art sich nur durch die Zahl ihrer Zellen, nicht aber durch deren Größe unterscheiden. Diese Tatsache ist durch Messungen von Amelung, von Boveri, sowie durch die Versuche von Morgan und von Driesch über jeden Zweifel festgestellt worden.¹⁾

Als zweiten fundamentalen Satz dürfen wir den Nachweis von Boveri hinstellen, daß die Kerne aller Zellen eines Embryo stets dieselbe Größe haben, nämlich die Größe der Summe des männlichen und weiblichen Pronukleus. Das ist nur so verständlich, daß in einer Periode zwischen zwei Zellteilungen ein Wachstum jedes neugebildeten Tochterkerns auf die doppelte Masse stattfindet. Das setzt eine Nukleinsynthese voraus, wobei Kernsubstanz aus den Bestandteilen des Zytoplasmas gebildet wird, gleichviel, ob dies Zytoplasma im Ei ursprünglich vorhanden war, oder ob es aus der Nahrung gebildet wurde; wobei wir natürlich unter Zytoplasma nur ein Gemisch von Stoffen — Proteinen, Fetten, Kohlenhydraten und Salzen mit den geeigneten Katalysatoren — verstehen.

Die Entdeckung Boveris gibt den Schlüssel für das

¹⁾ Die Literatur dieses Gegenstandes findet sich in meinen „Vorlesungen über die Dynamik der Lebenserscheinungen“. Leipzig 1906 S. 98 u. ff.

Verständnis des Sachsschen Gesetz in dem Sinne, in dem Sachs es schon auffaßte, nämlich, daß ein bestimmtes Verhältnis zwischen der Größe (oder Masse) des Kernes und des von ihm „beherrschten“ Protoplasmas existieren muß.¹⁾ Wächst in einer Zelle das Protoplasma über dieses Verhältnis infolge von „Nahrungsaufnahme“, so sind auch die Bedingungen für eine Zellteilung gegeben. Driesch hat erkannt, daß im Ei sich furchender Tiere die Zellteilung dann zu einem Abschluß kommt, wenn dieses Verhältnis zwischen Kerngröße und Protoplasma hergestellt ist. Die interessanten Einzelheiten der Entdeckungen von Sachs, Boveri und Driesch habe ich an einer andern Stelle ausgeführt, auf die ich den Leser verweise.²⁾

Wenn es in der Biologie gelingt, so einfache zahlenmäßige Beziehungen zu finden, wie das beim Sachsschen Gesetz offenbar der Fall ist, dann dürfen wir sicher sein, daß wir das feste Fundament der chemischen Grundlage der betreffenden Lebenserscheinungen erreicht haben.

Daß das Ei so lange fortfährt, sich zu furchen, bis ein bestimmtes Verhältnis zwischen der Zahl (und Masse) der Kerne und der Masse des Zytoplasmas erreicht ist, erinnert an die Tatsachen der Herstellung eines chemischen Gleichgewichts bei umkehrbaren Reaktionen. In derartigen Fällen kommt die Reaktion zum Stillstand, wenn ein bestimmtes Verhältnis zwischen den Anfangs- und Endprodukten erreicht ist. Wenn diese Annahme richtig ist, so ist das Sachssche Gesetz nur der Ausdruck der Tatsache, daß die Nukleinsynthese dann zum Stillstand kommt, wenn das Verhältnis der Chromatinstoffe des Kerns (nukleinsaures Histon oder Protamin) und der Masse der Stoffe, aus denen sich das Chromatin bildet, ein bestimmtes Verhältnis erreicht.³⁾

Daß in der Tat eine chemische Auffassung des Vorganges der Furchung berechtigt ist, folgt aus den Versuchen über den Temperaturkoeffizienten der embryonalen Entwicklung. Die ersten Versuche hierüber verdanken wir O. Hert-

¹⁾ R. Hertwig hat hierfür den Ausdruck „Kernplasmarelation“ eingeführt.

²⁾ Loeb, l. c.

³⁾ Ibid. S. 101.

wig¹⁾, der mit Froscheiern arbeitete, und K. Peter, der am Seeigelei Messungen anstellte.

„Für den Koeffizienten der Entwicklungsgeschwindigkeit berechnet Peter aus diesen Versuchen die folgenden Werte: Eine Temperaturerhöhung von 10° beschleunigt die Entwicklung bei *Sphaerechinus* um das 2,15 fache, bei *Echinus* um das 2,13 fache und bei *Rana* um das 2,86 fache.²⁾ — Da aber die Versuche von Peter sich nur auf die hohen Temperaturen (zwischen 21° und 16°) beziehen, da ferner im allgemeinen die Temperaturen nicht konstant waren, und da endlich die Grenzen für die zu vergleichenden Entwicklungsstadien nicht sehr scharf bestimmt waren, so hielt ich es für angezeigt, die Temperaturkoeffizienten unter günstigeren Bedingungen bei *Strongylocentrotus* noch einmal zu bestimmen.³⁾ Ich wählte zum Vergleich die Zeit von der Befruchtung bis zum Eintritt der ersten Furchung; ferner die Zeit zwischen diesem Zeitpunkt und dem Beginn der zweiten Furchung; und für einige Temperaturen auch die Zeit zwischen dritter und vierter und vierter und fünfter Furchung. Das Material, das mir zur Verfügung stand, war offenbar günstiger als in Peters Versuchen, da die Eier bei Samenzusatz in meinen Versuchen alle sofort, d. h. in etwa 1 Minute, befruchtet wurden. Sie gingen alle gleichzeitig, d. h. innerhalb von 1 Minute, in das Zweizellstadium, so daß die Zeit, die zwischen Befruchtung und erster Furchung vergeht, uns erlaubt, den Temperaturkoeffizienten für die Entwicklungsgeschwindigkeit sehr scharf zu bestimmen. Bei der Bestimmung des Zeitpunktes, bei dem die Eier anfangen, in das Vierzellstadium zu gehen, muß man beachten, daß die durch zwei Spermatozoen befruchteten Eier von vornherein ins Vierzellenstadium gehen. Bei späteren Furchungen verschwindet die Gleichzeitigkeit im Eintritt der Furchung der gleichzeitig befruchteten Eier immer mehr, wie ich glaube, in-

1) O. Hertwig, Über den Einfluß der Temperatur auf die Entwicklung von *Rana fusca* und *esculenta*. Arch. f. mikroskop. Anat. **51**, 1898.

2) Peter, Der Grad der Beschleunigung tierischer Entwicklung durch erhöhte Temperatur. Arch. f. Entwicklungsmechanik **20**, 130, 1905.

3) Loeb, Über den Temperaturkoeffizienten für die Lebensdauer kaltblütiger Tiere und über die Ursache des natürlichen Todes. Pflügers Arch. **124**, 411, 1908.

folge des Umstandes, daß einige Eier durch Sauerstoffmangel in der Entwicklung zurückgehalten werden. Gewöhnlich wurden gleichzeitig zwei Versuche an den Eiern desselben Weibchens durchgeführt, bei Temperaturen, welche um genau 10° verschieden waren. Die Temperatur blieb während der Versuche genau konstant. Die Eier wurden unmittelbar nach der Befruchtung in das Seewasser gebracht, das auf die gewünschte Temperatur erwärmt war. Durch häufiges Entnehmen und mikroskopische Beobachtung von Proben der Eier konnte der Zeitpunkt, bei dem die ersten Eier in das Zweizellstadium gehen, mit absoluter Schärfe bestimmt werden. Sobald die ersten Furchungen beobachtet wurden, trat auch die Furchung ganz allgemein bei allen Eiern ein. Bei den späteren Furchungen war das wegen des Sauerstoffmangels nicht mehr so scharf der Fall.

Temperatur	Zeit zwischen Befruchtung und erster Furchung	Temperatur	Zeit zwischen Befruchtung und erster Furchung
3° C	532 Minuten	12° C	131 Minuten
4° C	469 „	14° C	121 „
5° C	352 „	15° C	100 „
6° C	275 „	$17,4^{\circ}$ C	87 „
7° C	291 „	19° C	78 „
8° C	210 „	20° C	75 „
9° C	159 „	21° C	78 „
10° C	143 „	22° C	75 „

Ehe wir hieraus den Temperaturkoeffizienten für 10° berechnen, sei darauf hingewiesen, daß bei einer Temperatur von 23° überhaupt bei dieser Form die Furchung meist nicht mehr stattfindet, und daß bei Temperaturen über 20° mit der Zunahme der Temperatur keine Zunahme der Entwicklungsgeschwindigkeit mehr stattfindet.

Temperaturintervall	Temperaturkoeffizient für 10°	Temperaturintervall	Temperaturkoeffizient für 10°
3° — 13°	3,91	9° — 19°	2,04
4° — 14°	3,88	10° — 20°	1,90
5° — 15°	3,52	12° — 22°	1,74
7° — 17°	3,27	—	—

Es ist sehr deutlich, daß der Temperaturkoeffizient bei den niedersten Temperaturintervallen am höchsten ist, und daß er mit zunehmender Temperatur abnimmt. Wenn wir aus diesen Zahlen den mittleren Temperaturkoeffizienten für die Geschwindigkeit der Entwicklung berechnen, so erhalten wir den Wert 2,86, einen Wert, der identisch ist mit dem von Peter aus Hertwigs Zahlen berechneten mittleren Temperaturkoeffizienten für die Entwicklungsgeschwindigkeit des Frosches. Peters Wert für den Temperaturkoeffizienten für den Seeigel 2,15 resp. 2,13 ist also zu niedrig, was daher rührt, daß Peters Messungen sich nur auf die höheren Temperaturen erstrecken, für welche der Temperaturkoeffizient relativ niedrig ist. Wir kommen also zu dem merkwürdigen Resultat, daß die Temperaturkoeffizienten für die Entwicklungsgeschwindigkeit des Frosches und des kalifornischen Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus* absolut identisch sind. Da es wahrscheinlich ist, daß auch dasselbe für die Seeigel in Neapel gilt, wenn nur die Untersuchung auf eine hinreichend weite Temperaturskala ausgedehnt wird, so hat es den Anschein, als ob die Zahl 2,8 den mittleren Temperaturkoeffizienten für Entwicklungsgeschwindigkeit von Tieren im allgemeinen ausdrückt.“

Wir wollen nun die Tabelle der Zeiten wiedergeben, die das Ei bei den verschiedenen Temperaturen braucht, um aus dem Zweizellenstadium in das Vierzellenstadium überzugehen.

Temperatur	Zeit von Beginn der ersten bis Beginn der zweiten Furchung	Temperatur	Zeit von Beginn der ersten bis Beginn der zweiten Furchung
5°	180 + x Minuten	14°	66 Minuten
6°	163 „	15°	54 „
7°	150 „	17,4°	57 „
8°	134 „	19°	49 „
9°	118 „	20°	48 „
10°	92 „	21°	51 „
12°	81 „	22°	60 „

Von 20° an tritt wieder eine Zunahme in der Furchungsdauer ein. Gelegentliche Unregelmäßigkeiten, wie beispielsweise der Wert 57 Minuten für 17,4° weist auf individuelle Variation oder auf die störende Wirkung des Sauerstoffmangels in diesem

Falle hin. In der nächsten Tabelle geben wir die Werte für die Temperaturkoeffizienten.

Temperatur- intervall	Temperatur- koeffizient für 10 ⁰
5 ⁰ —15 ⁰	> 3,33
7 ⁰ —17 ⁰	2,63
9 ⁰ —19 ⁰	2,40
10 ⁰ 20 ⁰	1,91

Der mittlere Wert des Temperaturkoeffizienten ist hier etwas kleiner als der für das erste Furchungsintervall gefundene, nämlich 2,56 statt 2,86. Das erklärt sich aber daraus, daß wir für das zweite Furchungsintervall die Koeffizienten für 3—13⁰ und 4—14⁰ nicht bestimmt haben. Hätten wir das getan, so würde der Koeffizient für das zweite Furchungsintervall auch höher ausgefallen sein. Wir dürfen demnach den Wert 2,86 als den richtigeren mittleren Temperaturkoeffizienten ansehen.

Dieser Wert ist charakteristisch für chemische Reaktionen. Die hier stattfindenden chemischen Reaktionen sind zweifellos die Nukleinsynthesen. Wir haben bereits in der zweiten Vorlesung gesehen, um wie komplizierte Vorgänge es sich hierbei handelt. Es sind aber freilich nicht bloß chemische Vorgänge, sondern wie bei allen Lebenserscheinungen sind rein chemische und physikalische Prozesse kettenmäßig miteinander verknüpft; so beispielsweise ist mit der Nukleinsynthese die Kernteilung und Zeldurchschnürung verkettet, die beide Äußerungen physikalischer Kräfte sind, welche durch die chemischen Änderungen bedingt werden.

Wir kommen nun zu dem wesentlichsten Teil dieser Untersuchung, nämlich der Begründung der Behauptung, daß der Kern ein Enzym für die Synthese für Kernmaterial ist oder enthält, und daß mit anderen Worten die Kernsynthese ein autokatalytischer Prozeß ist. Diesen Nachweis brachte ich zuerst im Jahre 1906. „Wenn man die Geschwindigkeit dieses synthetischen Prozesses betrachtet, so wird man bemerken, daß dieselbe anfangs in jeder folgenden Periode der Furchung verdoppelt wird. Das gilt natürlich nur für den Anfang der Entwicklung, sicher bis zum 128-Zellstadium, vielleicht noch länger, während später zu irgendeinem Zeitpunkt einmal eine Änderung ein-

treten muß. Wir wollen zunächst diese ersten Furchungsstadien betrachten. Nachdem das Ei befruchtet ist, hat es nur einen Kern. Während der ersten Furchungsperiode verdoppelt es die Masse seines Kernes, und es beginnt die nächste Furchungsperiode mit zwei Kernen. Während dieser Furchungsperiode verdoppelt es wieder die Masse und Zahl seiner Kerne (da jeder Kern an Masse dem ursprünglichen Kern des befruchteten Eies gleich ist), und es beginnt die nächste Furchungsperiode mit vier Kernen, die folgende mit acht usw. nach Potenzen von zwei. Nun nimmt die Dauer der Furchungsperioden nicht etwa zu, sondern sie kann als wesentlich konstant angesehen werden; denn die Schwankungen sind bei konstanter Temperatur sehr gering und haben keine Beziehung zu der Zahl der neugebildeten Kerne. Es folgt also daraus, daß die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Synthese des Kernmaterials in jeder Furchungsperiode etwa zweimal so groß ist, wie in der vorausgehenden, und daß sie der Zahl der jedesmal vorhandenen Kerne proportional ist. Das weist daraufhin, daß in diesem Fall jeder vorhandene Kern wie ein Katalysator für die Nukleinsynthese wirkt; denn die beschleunigende Wirkung von Katalysatoren ist im allgemeinen ihrer Masse proportional¹⁾

Des weiteren führte ich dann aus, daß erst die Geschwindigkeit der Nukleinsynthesen im Ei proportional der Zahl der gebildeten Kerne zunehmen muß, wie das ja für die Autokatalyse charakteristisch ist. Da aber das Ei um diese Zeit keine Nahrung von außen aufnimmt, so muß andererseits die aktive Masse der Substanzen, aus denen die Kerne gebildet werden, abnehmen.

„Diese Tatsachen weisen darauf hin, daß zwei entgegengesetzte Einflüsse auf die Geschwindigkeit der Nukleinsynthese hier wirksam sind. Der eine ist das Massenwirkungsgesetz, demzufolge die Geschwindigkeit der Kernbildung nach irgendeinem Gesetz mit zunehmender Zahl der gebildeten Kerne bei

¹⁾ Loeb, Weitere Beobachtungen über den Einfluß der Befruchtung und der Zahl der Zellkerne auf die Säurebildung im Ei. *Biochem. Zeitschr.* **2**, 34, 1906. — Ferner: Über den chemischen Charakter und die biologische Bedeutung des Befruchtungsvorganges. Vortrag auf dem Bostoner Zoologenkongreß. In Roux Sammlung von Vorträgen. Leipzig 1908.

der Furchung abnehmen muß, der zweite ist die Wirkung eines Katalysators im Kern, der es bedingt, daß die Geschwindigkeit der Nukleinsynthese genau proportional mit der Zunahme der schon vorhandenen Kerne wächst. Am Anfang der Furchung, solange die Masse des Kernmaterials im Vergleich zum Protoplasma sehr klein ist, kann der letztere Einfluß relativ deutlich zum Ausdruck kommen. In späteren Entwicklungsstadien wird aber wohl der zweite Einfluß überwiegen müssen.“¹⁾)

In meinem in Boston am 22. August 1907 gehaltenen Vortrag wies ich darauf hin, daß „dieses Verhalten der Geschwindigkeit einer Reaktion charakteristisch für diejenigen chemischen Prozesse ist, bei denen eins der Reaktionsprodukte ein Katalysator oder Ferment für die Reaktion ist. Derartige Reaktionen werden als autokatalytisch bezeichnet . . . Diese Wirkung des Zellkerns auf die Nukleinsynthese und die Bedeutung der Nukleinsynthese für das Wachstum und die Fortpflanzung führen eine der rätselhaftesten Eigenschaften der Zellen, nämlich die automatische Fortpflanzung, auf eine wohlbekanntere Tatsache der Fermentchemie, nämlich die Autokatalyse, zurück.“²⁾)

Die Richtigkeit dieses Gedankens wurde kurz darauf von zwei Autoren, Wolfgang Ostwald³⁾ und T. B. Robertson⁴⁾, bestätigt. Ostwald entwarf die Kurven für Wachstum, Gewichtszunahme und Zellteilung verschiedenster Organismen und Organe und zeigte, daß diese Kurven die für autokatalytische Reaktionen charakteristische Form haben, nämlich die eines S. Robertson griff das Problem von einer anderen Seite an, indem er die Formeln für autokatalytische monomolekulare Reaktionen ableitete und daraufhin die auf Grund dieser Formeln berechneten Werte mit den von den früheren Forschern

1) Loeb, Biochem. Zeitschr. **2**, 41, 1906.

2) Loeb, Chemischer Charakter des Befruchtungsvorganges S. 24.

3) Wolfgang Ostwald, Über die zeitlichen Eigenschaften der Entwicklungsvorgänge. Roux Vorträge und Aufsätze, Heft 5. Leipzig 1908.

4) T. B. Robertson, On the Normal Rate of Growth of an Individual and its Biochemical Significance. Arch. f. Entwicklungsmechanik **25**, 581, 1908 und Further Remarks on the Normal Rate of Growth of an Individual and its Biochemical Significance. Arch. f. Entwicklungsmechanik **26**, 108, 1908.

direkt beobachteten verglich. Wir wollen auf die Ausführungen von Robertson etwas näher eingehen.

„Die Differentialgleichung, welche für die ersten Stadien einer autokatalytischen monomolekularen Reaktion charakteristisch ist, lautet folgendermaßen:

$$\frac{dx}{dt} = k_1 x (a - x) \quad (1)$$

Diese Gleichung drückt in mathematischen Symbolen die Tatsache aus, daß (in diesen Stadien) die Geschwindigkeit der Umwandlung in jedem Augenblick proportional der Masse des Materials ist, welche an der Reaktion teilnimmt, und der Masse, welche bereits umgewandelt ist. Wenn aber die Reaktion so weit fortgeschritten ist, daß der hemmende Effekt der Reaktionsprodukte auf die Geschwindigkeit der Reaktion bemerkbar wird, so ändert sich Gleichung (1) in:

$$\frac{dx}{dt} = k_1 x (a - x) - k_2 x^2 \quad (2)$$

Diese Gleichung kann in dieselbe Form zurückgeführt werden wie (1), nur mit einer etwas anderen Bedeutung der Konstanten; denn Gleichung (2) ist offenbar identisch mit der folgenden Gleichung:

$$\frac{dx}{dt} = (k_1 + k_2) x \left(\frac{k_1}{k_1 + k_2} a - x \right) \quad (3)$$

Die Gleichung (3) hat dieselbe Form wie Gleichung (1), nur daß an Stelle von k_1 der Wert $k_1 + k_2$ und an Stelle von a der Wert $\frac{k_1}{k_1 + k_2} a$ auftritt. Gleichung (3) kann daher folgendermaßen geschrieben werden:

$$\frac{dx}{dt} = kx (A - x) \quad (4)$$

wo k und A Konstanten sind.

Durch Integration von (4) erhalten wir:

$$\log \frac{x}{A - x} = A k t + C, \quad (5)$$

wo C die Integrationskonstante ist.

Es ist offenbar, daß, wenn $x = \frac{1}{2}A$, d. h. wenn die Reaktion die Hälfte des Weges zum Gleichgewicht zurückgelegt hat, $\log \frac{x}{A-x} = 0$ wird. Wenn wir nun C so wählen, daß die rechte und die linke Seite der Gleichung (5) gleichzeitig verschwinden so erhalten wir:

$$\log \frac{x}{A-x} = Ak(t-t_1) \quad (6)$$

wo t_1 die Zeit bedeutet, zu der die Reaktion zur Hälfte vollendet ist. Diese Gleichung kann so geschrieben werden:

$$\log \frac{x}{A-x} = K(t-t_1) \quad (7)$$

Wenn die Gewichts- und Volumzunahme eines Organismus mit der Zeit angesehen werden darf als der Ausdruck des Fortschreitens einer autokatalytischen Reaktion, so muß Gleichung (7) darauf anwendbar sein: in welcher x das Körpergewicht zur Zeit t , A das Maximum oder Endgewicht bezeichnet, welches der Körper erreicht, t_1 die Zeit ist, zu welcher das halbe Maximalgewicht des Körpers erreicht ist, und K eine Konstante ist, welche von einem bekannten Wert von x zu einer gegebenen Zeit t bestimmt werden muß.¹⁾

Robertson zeigt ferner, daß aus diesen Annahmen folgt, daß die Geschwindigkeit der Gewicht- oder Volumzunahme eines Organismus während einer gegebenen Zeit das Maximum dann erreicht, wenn das Wachstum (der betreffenden Periode) halb vollendet ist. Er weist darauf hin, daß beispielsweise die Wachstumskurve für weiße Mäuse nach Donaldson diese Annahme bestätigt. Als weitere Stütze könnte das umfangreiche von Wo. Ostwald gesammelte Material erwähnt werden.

Wie genau nun die von früheren Autoren empirisch gewonnenen Daten über Wachstum mit Robertsons berechneten Werten übereinstimmen, soll an einigen Beispielen gezeigt werden. Zunächst einige Tabellen über das Wachstum von Hafer und Weizen nach Monnier.²⁾

¹⁾ Robertson, l. c. S. 584.

²⁾ Monnier, Les matières minérales et la loi d'accroissement des végétaux. Bot. Institut. d. Univ. Genf. Ser. 7, Fasc. 3, 1905.

Hafer. $A = 349,35$, $t =$ Zeit in Tagen	Wachstum frischer Pflanzen.		
	$K = 0,0777$, Beobachtet	$Kt_1 = 2,5947$, Berechnet	$t_1 = 33,3$, Differenz %
0	0,935	0,905	3,2
4#	1,78	1,81	1,7
8#	3,58	3,76	5,0
16	14,51	15,20	4,8
21	34,70	34,96	0,8
25	52,20	64,55	19,1
29	141,20	110,89	21,5
35#	185,70	200,84	7,5
39#	243,30	255,65	4,8
42	314,34	288,93	7,7
47	304,00	320,44	5,3
51	254,62	335,34	21,2
57	229,90	344,63	33,3
64	224,30	346,40	35,3
70	180,35	347,76	93,3
74	190,45	348,36	83,2

Wie man sieht, ist die Übereinstimmung zwischen den beobachteten Werten und den unter der Annahme berechneten, daß das Wachstum eine monomolekulare autokatalytische Reaktion ist, eine ausgezeichnete. Vom 51. Tage an tritt offenbar eine Komplikation ein, die vielleicht durch eine plötzliche Verdunstung bedingt ist. Jedenfalls fehlt diese Komplikation, wenn der Wachstumskurve nicht das Gewicht der frischen Pflanzen, sondern der getrockneten Pflanze zugrunde gelegt wird.

Hafer. $A = 61,8$, $t =$ Zeit in Tagen	Gewichtsbestimmung an getrockneten Pflanzen.		
	$K = 0,0702$, Beobachtet	$Kt_1 = 2,6502$, Berechnet	$t_1 = 37,75$, Differenz %
0	0,167	0,138	17,4
4	0,260	0,261	0,4
8	0,473	0,501	5,9
16	1,77	1,78	0,6
21	4,29	3,86	10,0
25#	5,42	6,98	22,4
29	14,49	12,09	16,5

Hafer. $A = 61,8$ $t =$ Zeit in Tagen	Gewichtsbestimmung an getrockneten Pflanzen.		
	$K = 0,0702$	$Kt_1 = 2,6502$	$t_1 = 37,75$
	$x =$ Gewicht in Grammen		Differenz
	Beobachtet	Berechnet	%
35 #	23,77	24,19	1,7
39	29,99	34,08	13,7
42	42,36	41,07	3,0
47 #	50,44	50,55	0,2
51	54,43	55,25	1,5
57 #	59,74	59,28	0,7
64	71,30	60,91	14,6
70	65,11	61,47	5,5
74	68,00	61,62	9,4

Wie man sieht, ist auch hier die Übereinstimmung zwischen Theorie und Beobachtung so gut, wie man sie nur wünschen kann. Als zweites Beispiel sei die Anwendung der Theorie auf die Gewichtszunahme des Menschen nach Quetelet hier angeführt. Es handelt sich hier um die Gewichtszunahme von Männern.¹⁾

Alter in Jahren	Körpergewicht	
	Beobachtet	Berechnet
0,5	3,1 kg	3,2 kg
1,5	9,0 „	4,4 „
2,5	11,0 „	6,05 „
3,5	12,5 „	8,05 „
4,5	14,0 „	10,4 „
5,5	15,9 „	12,9 „
6,5	17,8 „	15,6 „
7,5	19,7 „	18,15 „
8,5	21,6 „	20,6 „
9,5	23,5 „	22,9 „
10,5	25,2 „	25,2 „
11,5	27,0 „	27,6 „
12,5	29,0 „	30,3 „
13,5	33,1 „	33,4 „
14,5	37,1 „	37,0 „
15,5	41,2 „	41,0 „

¹⁾ Quetelet, Anthropometrie S. 346; zitiert nach British Association Anthropometric Committees Report. Table II.

Alter in Jahren	Körpergewicht	
	Beobachtet	Berechnet
16,5	45,4 kg	45,3 kg
17,5	49,7 „	49,5 „
18,5	53,9 „	53,4 „
19,5	57,6 „	56,7 „
20,5	59,5 „	59,3 „
21,5	61,2 „	61,4 „
22,5	62,9 „	62,9 „
23,5	64,5 „	64,0 „
24,5	— „	64,7 „
25,5	66,2 „	65,0 „
30,5	66,1 „	66,0 „ ¹⁾

Eine so vollkommene Übereinstimmung zwischen Theorie und Beobachtung kann nicht gut auf bloßem Zufall beruhen, sondern darf als eine Garantie angesehen werden, daß die Vorgänge des Wachstums durch Zellvermehrung in der Tat autokatalytische Vorgänge sind. Es ist bei diesen Messungen jedoch zu berücksichtigen, daß beim menschlichen Wachstum nicht eine, sondern drei verschiedene Wachstumsperioden vorhanden sind.

Die charakteristische Eigenschaft der lebenden Substanz ist ihre automatische Entwicklung, nämlich daß aus einem Ei ein Organismus von ganz bestimmter Form hervorgeht, daß dieser wieder Geschlechtszellen bildet usw. Auch dieses Rätsel verliert durch die Erkenntnis des Umstandes, daß der Kern ein Ferment für seine eigene Synthese ist, sein mystisches Element. Es ist wahrscheinlich, daß die Kerne der verschiedenen Organismen sich chemisch unterscheiden, und daß diese chemischen Unterschiede die Ursache sind für die Verschiedenheiten der Form der Organismen. Wenn nun jeder Kern ein Ferment für seine eigene Synthese ist, so wird er auch Kernsubstanz seiner eigenen Art synthetisieren. Das geht so weit, daß Hybride zwei Arten von Geschlechtszellen bilden, von denen eine dem mütterlichen, die andere dem väterlichen Typus entspricht. Das ist so zu verstehen, daß im Bastard die väterlichen sowohl wie die mütterlichen Kernstoffe fort-

¹⁾ Robertson, l. c. S. 599.

fahren, jeder unabhängig, neuen Kernstoff von seiner eigenen Art zu synthetisieren; diese beiden Stoffe trennen sich schließlich bei der letzten Teilung der Geschlechtszellen voneinander. Dieser letztere Umstand ist die Ursache für die Mendelschen Spaltungsregeln. Man darf aber nicht übersehen, daß diese Spaltung allein nicht für das Verständnis der Vererbung genügt; wir müssen auch berücksichtigen, daß die Kernstoffe der beiden Eltern fortfahren, unabhängig neue Kernstoffe zu synthetisieren, und zwar jeder der beiden Stoffe nur Kernstoffe (Chromosomen?) der eigenen Art. Damit wird das Problem der Kontinuität der Organismen, im Prinzip wenigstens, chemisch verständlich.

Die Aufgabe, lebende Substanz künstlich herzustellen, lockt uns heute ebenso, wie einst die Alchimisten. Wir haben jedoch einen wesentlichen Punkt vor den Alchimisten voraus: wir wissen, daß wir eine solidere Grundlage für die Errichtung unseres Gebäudes gebrauchen, als bloß unsere Wünsche und Hoffnungen, nämlich eine bestimmte Einsicht in den chemischen Charakter der Lebenserscheinungen. Wir sind nicht bereit, die morphologischen Nachahmungen von „Zellen“ oder Bakterien mittelst anorganischer Niederschläge als künstliche Herstellung von Organismen anzusehen. Die künstliche Herstellung lebender aus lebloser Substanz wird mit der künstlichen Synthese von Nukleinen beginnen müssen, welche die Fähigkeit haben, als Fermente für ihre eigene Synthese zu dienen.

XXIX. Das Wesen des Todes und die Verlängerung des Lebens des Eies durch die Befruchtung.

Claude Bernard gibt an einer Stelle eine Aufzählung der verschiedenen Definitionen des Lebens.¹⁾ Darunter ist diejenige von Bichat besonders interessant: „Das Leben ist die Gesamtheit der Kräfte, welche dem Tode widerstehen.“ Bernard erwähnt ferner, daß bereits die Enzyklopädie eine ähnliche, wenngleich naivere Definition des Lebens gegeben

¹⁾ C. Bernard, *Les Phénomènes de la Vie* 1, 28.

hatte, nämlich daß „das Leben der Gegensatz des Todes sei“. Auch Humboldt braucht eine Definition, welche darauf hinweist, daß das Leben darin bestehe, der Auflösung zu widerstehen.

Man kann sich leicht vorstellen, was die älteren Beobachter dazu geführt hat, das Leben als einen Widerstand gegen den Tod aufzufassen: der tote Organismus wird — falls er nicht rasch austrocknet — eine Beute der Fäulnis, während unter den gleichen Bedingungen der lebende Körper von Fäulnis frei bleibt. Es ist vielleicht der Mühe wert, diese naive Tatsache von dem Standpunkte der modernen Wissenschaft zu besprechen. Warum widersteht der lebende Körper dem Angriff der Fäulnisbakterien, während der tote Körper denselben zum Opfer fällt? Ich kenne die bakteriologische Literatur nicht sehr genau, vermute jedoch, daß die Antwort dahin ausfallen wird, daß die Zellen des toten Organismus, namentlich der Schleimhäute, für die Fäulnisbakterien rasch durchgängig werden, während die normale lebende Zelle für dieselben undurchgängig ist. Sind die Fäulnisbakterien aber einmal in die toten Zellen eingedrungen, so finden sie im Inhalt derselben einen äußerst günstigen Nährboden. Was aber bedingt die Änderung der Durchgängigkeit im Tode? Offenbar die Spaltungsprodukte (z. B. Fettsäuren), welche im Leben durch Oxydation in CO_2 verwandelt und dann eliminiert werden, oder welche zu neuen Synthesen verwertet werden. Findet diese Oxydation z. B. der Fettsäuren nicht statt, so ändern die Spaltungsprodukte die physikalische Beschaffenheit der Zelle, wodurch dieselbe — bei genügend hohem Wassergehalt — für die Fäulnisbakterien durchgängig wird. Die Definition von Bichat war also irrig.

Der Leser kennt sicher die Ansicht von Bernard über das Wesen des Lebens und des Todes, die vielleicht in aller Kürze in folgendem Zitat enthalten ist: „Ich glaube, daß notwendigerweise im lebenden Organismus zwei Arten von Erscheinungen stattfinden, nämlich erstens die Vorgänge der vitalen Schöpfung oder organisierenden Synthese und zweitens die Erscheinungen des Todes oder organischer Zerstörung.“ „Der erste dieser beiden Vorgänge ist allein ohne direkte Analogien; er ist eine besondere spezifische Eigentümlichkeit des lebenden Wesens: diese evolutive Synthese ist das wirklich Lebende.“

Wie wir im vorigen Kapitel sahen, ist diese organisierende „evolutive Synthese“ der Ausdruck eines Typus von Reaktionen, der in der Chemie bekannt ist, nämlich der Autokatalysen. Die Kenntnis desselben knüpft sich aber an die moderne chemische Dynamik, welche erst seit dem Tode von Bernard sich entwickelt hat. Es ist daher zu verstehen, wenn Bernard der Meinung war, daß für diese „evolutive Synthese“ in der Chemie keine Analogie vorhanden sei.

Die zweite Klasse von Vorgängen aber, nämlich die der Zerstörung, hielt er für physiko-chemisch. „Dieselben sind meist das Resultat einer Verbrennung, einer Fermentation, einer Fäulnis, mit einem Worte, sie sind vergleichbar mit einer großen Zahl chemischer Tatsachen der Zersetzung oder der Spaltung.“ Er weist dann auf eine sehr paradoxe Tatsache hin, nämlich daß wir die eigentlichen Lebensvorgänge, d. h. die der evolutiven Synthese, zu übersehen bereit sind, während wir das Leben nach den destruktiven Vorgängen beurteilen. „Die Zerstörungsvorgänge oder diejenigen des „lebenden Todes“ fallen uns in die Augen und nach ihnen charakterisieren wir das Leben. Wenn eine Bewegung erfolgt, der Muskel sich kontrahiert, wenn der Wille und die Empfindung sich manifestieren, wenn eine Drüse sezerniert, so wird die Substanz des Muskels, der Nerven, des Gehirns, des Drüsengewebes desorganisiert, zerstört und aufgebraucht, so daß jede Manifestation eines Vorganges im lebenden Wesen notwendig an eine organische Zerstörung geknüpft ist, was ich unter einer paradoxen Form an anderer Stelle so ausgedrückt habe: Das Leben ist der Tod.“

Diese Ausführungen Bernards sind geistreich, aber unzutreffend. Die Muskeltätigkeit ist keine Zerfallserscheinung, sondern die Vorbedingung zur „evolutiven Synthese“ des Muskels; ohne diese Tätigkeit atrophiert der Muskel, durch die Tätigkeit wächst er. Dasselbe gilt für das Zellenwachstum. Die Spaltung von Lecithin führt zur Zellteilung; sie ist aber auch die *conditio sine qua non* der Nukleinsynthese. Die Tätigkeit des Muskels führt nur dann zum Zerfall, wenn er keinen Sauerstoff enthält.

Der richtige Kern, der in Bernards Behauptungen steckt, ist der, daß die Hydrolysen zu zwei Resultaten führen können, nämlich erstens zur weiteren Synthese und zweitens zur Zer-

störung der Zelle. Wenn eine Zelle sich teilt, ein Muskel sich kontrahiert, eine Drüse sezerniert, finden wohl Hydrolysen statt — aber diese Hydrolysen sind echte Lebenserscheinungen; denn sie führen bei Gegenwart von Sauerstoff zur organischen Synthese. Wenn aber ein Ei in zyanalkaliumhaltigem Seewasser befruchtet wird und in diesem Seewasser bleibt, oder wenn der Muskel bei Abwesenheit von Sauerstoff bis zur Ermüdung gereizt wird, so finden ebenfalls Hydrolysen statt, aber das Ei und der Muskel sterben. Nicht die Hydrolysen sind der zerstörende Faktor, sondern das Stattfinden der Hydrolysen bei Abwesenheit der Oxydationen führt den Tod herbei: — weil diese Oxydationen zu zwei Zwecken notwendig sind, zur Unschädlichmachung gewisser Spaltungsprodukte der Hydrolysen, und zweitens, nach Schmiedeberg, für organische Synthesen.¹⁾

Die Definitionen von Bernard helfen uns also nicht für das Verständnis des Wesens des Todes. Neue Einsichten in das Wesen des Todes hat uns Weismann gegeben mit seinem Hinweis auf den Unterschied im Verhalten einzelliger und vielzelliger Organismen. Die einzelligen Organismen vermehren sich durch Teilung und die beiden Tochterzellen sind nur je eine Hälfte der Mutterzelle; jede Tochterzelle wächst durch Nahrungsaufnahme wieder auf das ursprüngliche Volumen der Mutterzelle an. Weismann schließt daraus, daß jedes heute lebende einzellige Individuum nur ein Teilstück eines vor tausend Jahren oder länger schon existierenden Individuums ist. Im Gegensatz dazu stehen die Vielzelligen; die Keimzellen derselben leben ebenso weiter wie die Infusorien, aber der Rest stirbt. Dieses Sterben des „Restes“ fehlt bei den Infusorien, weil er eben nicht existiert. Andererseits sind die Keimzellen auch der Vielzelligen ebenso unsterblich wie die Infusorien.²⁾

Es ist aber ein Punkt hier zu beachten; die Keimzellen bleiben nur in einem lebenden Körper am Leben; erfolgt der Tod im Körper, — d. h. tritt dauernder Sauerstoffmangel ein, — so sterben sie ebenfalls; unter denselben Umständen sterben aber auch die Infusorien.

¹⁾ Dynamik der Lebenserscheinungen S. 37 u. ff.

²⁾ Weismann, Vorträge über Deszendenztheorie. Bd. I. 2. Aufl. S. 214. Jena 1904.

Versuche über die Lebensdauer von unbefruchteten Eiern führten mich zu einem merkwürdigen Resultate. Wie schon erwähnt, sind die Eier des Seesterns meist unreif, wenn sie gelegt werden, und sie fangen erst an, im Seewasser zu reifen. Die verschiedenen Eier aber reifen nicht alle gleich schnell. Ich fand nun, daß, wenn Eier reiften und nicht gleich oder bald befruchtet oder chemisch zur Entwicklung veranlaßt wurden, sie rasch, d. h. in wenigen Stunden, zugrunde gingen.

Die lebenden Eier von *Asterias* sehen leicht gelblich gefärbt und homogen aus. Dieses Aussehen behalten sie auch, wenn sie reifen, solange sie am Leben sind. Sie behalten dasselbe Aussehen, auch wenn sie durch den Eintritt eines Spermatozoons oder durch die geeigneten chemischen und physikalischen Eingriffe zur Entwicklung gebracht werden.

Bleiben die reifen Eier aber unbefruchtet oder unentwickelt, so sterben sie im Laufe von 4 bis 12 Stunden, und dieser Prozeß des Absterbens ist von einer charakteristischen Farbveränderung des Eies begleitet. Dasselbe wird nämlich erst dunkel, dann fast schwarz, und statt der homogenen Beschaffenheit des Protoplasmas erscheinen größere Tröpfchen oder Kügelchen im Inhalt. Wenn man etwa nach 24 Stunden eine solche Kultur von unbefruchteten Eiern unter dem Mikroskop ansieht, so findet man zwei Klassen von Eiern, erstens die eben geschilderten dunkeln toten Eier, welche reif sind, und zweitens lebende, normal gefärbte, aber unreife Eier. Es reifen nämlich im allgemeinen nicht alle Eier sofort, die man dem Eierstock eines Seesterns entnimmt; manche reifen sehr spät, andere überhaupt nicht. Es läßt sich nun leicht beobachten, daß die unreifen Eier mehrere Tage lang am Leben bleiben, bis sie schließlich Bakterien zum Opfer fallen, während die reifen Eier meist bereits in 4 bis 8 Stunden nach erlangter Reife dunkel werden und absterben.

Ist nun der Tod des reifen, aber nicht zur Entwicklung veranlaßten Eies durch innere Vorgänge oder durch die im Seewasser enthaltenen Bakterien verursacht?

Ein sicherer Weg, um das festzustellen, besteht darin, sterile Reinkulturen von Eiern in Seewasser herzustellen. Das ist beim Seesternei verhältnismäßig einfach. Acht Flaschen wurden sterilisiert, dann mit sterilisiertem Seewasser gefüllt

und dasselbe nochmals an drei aufeinander folgenden Tagen 20 Minuten lang auf 100° erhitzt. Ein weiblicher Seestern wurde äußerlich gründlich abgewaschen, ein Arm geöffnet und ein Ovarium mit sterilisierter Pinzette herausgenommen und in sterilisiertes Seewasser gebracht. Aus dem dicken Strom von Eiern, der sofort aus dem Ovarium austrat, wurden schnell mit einer sterilen Pipette je ein paar Tropfen in die sterilisierten Flaschen gebracht. Eine zweite Reihe von acht Flaschen enthielt normales nicht sterilisiertes Seewasser, und in diese Flaschen wurden ebenfalls je ein paar Tropfen derselben Eier gebracht. Eine dritte Reihe von Flaschen wurde mit Seewasser gefüllt, dem je 2 ccm einer jauchigen stinkenden Kultur alter Seestern-eier zugefügt wurden, um von vornherein eine kräftige Bakterienentwicklung zu veranlassen. Auch jede dieser Flaschen erhielt Eier derselben Kultur, wie die sterilisierten Flaschen.

Daß nun die Sterilisierung der ersten acht Flaschen eine vollkommene war, wurde dadurch bewiesen, daß alle Flaschen während der Versuchsdauer völlig klar und ungetrübt blieben und daß drei Flaschen, die nicht geöffnet wurden, bis zu Ende des Versuches, d. h. 10 Wochen, völlig klar waren und jedes einzelne Ei klar erkennen ließen. Die Flaschen mit nichtsterilisiertem Seewasser wurden bereits nach 24 Stunden trübe, und nach zwei Tagen waren die Eier Bakterien zum Opfer gefallen, und kein Ei war mehr wahrnehmbar. Die sterilisierten Flaschen, die geöffnet wurden, waren stets völlig frei von Fäulnisgeruch, während die nicht sterilisierten Flaschen schon nach ein bis zwei Tagen einen penetranten Fäulnisgeruch hatten. Die mikroskopische Untersuchung des Seewassers auf Bakterien blieb stets völlig negativ in den sterilisierten Flaschen, und fiel stets positiv aus in den anderen Flaschen. In denjenigen Flaschen, denen je 2 ccm der fauligen Kultur von Seestern-eiern zugefügt worden war, waren Bakterien und Infusorien von vornherein äußerst zahlreich.

Sechs Stunden nach Beginn des Versuches wurde je eine Flasche der drei Reihen geöffnet und die Eier mikroskopisch untersucht. Das Bild war in allen drei Flaschen das gleiche: Fast alle Eier waren reif und eine kleine Zahl von Eiern dunkel oder schwarz. Was aber für uns von entscheidender Bedeutung ist, ist der Umstand, daß die Prozentzahl der dunkeln,

abgestorbenen Eier in der sterilen Kultur genau so groß war, wie in dem unsterilisierten oder dem faulig gemachten Seewasser.

Zwölf Stunden später, also achtzehn Stunden nach Beginn des Versuches, wurde wieder je eine Flasche der drei Kulturen geöffnet. Diesmal waren fast alle Eier der sterilen Kultur dunkel oder schwarz, und einzelne zeigten bereits Zerfall in Kügelchen. Von den Eiern in den beiden andern Kulturen war derselbe Prozentsatz dunkel. Also die Eier sterben ebenso rasch in den sterilisierten Flaschen, die absolut bakterienfrei sind, wie in den bakterienhaltigen Flaschen. Der Tod erfolgt durch innere Ursachen und so rasch, daß die im Seewasser vorhandenen spärlichen Bakterien den Tod der Eier kaum zu beschleunigen imstande sind. Die Eier sind eben bereits durch innere Ursachen gestorben, ehe die Bakterien in die Eier eindringen können.

Die später geöffneten Flaschen bestätigten nur das Gesagte. Der Versuch wurde mit demselben Erfolg wiederholt. Jede der Flaschen, die in den ersten Tagen geöffnet wurden, enthielt auch eine kleine Zahl lebender, hell aussehender Eier. Die letzteren waren aber ausnahmslos unreif. Der Versuch beweist also, daß die gereiften Eier des Seesterns in wenigen Stunden zugrunde gehen, und daß die Ursache für den Tod nicht in Bakterien des Seewassers gesucht werden darf; und ferner daß unter genau denselben Umständen die unreifen Eier am Leben bleiben!

Es wurde nun der Versuch gemacht, ob man die Lebensdauer der unreifen Eier dadurch verlängern könne, indem man sie an der Reifung verhindert. Wie früher erwähnt, erfordert die Reifung die Gegenwart von freiem Sauerstoff. Frisch gelegte Eier einer *Asterias* wurden in zwei Reihen von acht Flaschen verteilt. Die eine Reihe von Flaschen war mit einem Wasserstoff-Entwicklungsapparat verbunden, die andere mit einer Bombe, welche reinen Sauerstoff enthielt. Vor Beginn des Versuches war in der einen Flaschenreihe alle Luft durch den Wasserstoffstrom verdrängt worden. Während des Versuches wurde ein kräftiger Wasserstoffstrom unterhalten. Beide Reihen von Flaschen erhielten frischgelegte unreife Eier von *Asterias*. Der Versuch dauerte drei Tage, und von Zeit zu Zeit wurde

eine Flasche weggenommen und auf ihren Inhalt untersucht. Die Eier, welche dem Sauerstoffstrom ausgesetzt waren, reiften ebenso rasch und zahlreich wie die in gewöhnlichem Seewasser, und die gereiften Eier starben alsbald ab. Im Wasserstoffstrom unterblieb die Reifung bei der Mehrzahl der Eier, und dieselben blieben am Leben. In den Wasserstoffkulturen fand eine starke Entwicklung von Bakterien statt, während das in den Sauerstoffkulturen gar nicht oder nur in geringem Maße stattfand.

Auch die Säurebehandlung, welche, wie oben erwähnt, die Reifung des Eies verhindert (ohne dasselbe abzutöten), verhindert den Tod und Zerfall des Eies. Eier, welche, ohne mit alkalischem Seewasser in Berührung gewesen zu sein, 10 oder 15 Minuten lang in 100 ccm Seewasser + 4 ccm $\frac{n}{10}$ HCl gebracht werden, reifen viel langsamer oder überhaupt nicht, wenn sie nach dieser Zeit in normales Seewasser zurückgebracht werden. Sie behalten aber auch, solange sie unreif sind, das helle normale Aussehen lebender Eier, bis sie schließlich Bakterien zum Opfer fallen. Auch unreife Eier, welche in neutrales Seewasser gebracht werden, reifen meist nicht und behalten, wenn sie unreif bleiben, ihr normales Aussehen.

Es scheint aus diesen Versuchen zu folgen, daß derselbe Vorgang, welcher der Reifung der Seesterneier zugrunde liegt, auch zum Tode derselben führt (wenn er nicht durch die Eingriffe, welche wir als Befruchtung bezeichnen, gehemmt wird). Ich versuchte nun, ob es auch möglich sei, durch Sauerstoffmangel das gereifte Ei länger am Leben zu erhalten. Ich erhielt in der Tat einige positive Resultate in dieser Hinsicht. Eier eines Seesternes wurden in dünner Lage ausgebreitet. Nach 3 Stunden waren 75% der Eier gereift. Ein Teil der reifen Eier wurde vorsichtig in die obenerwähnte Glasröhre gebracht, wo die tieferen Schichten derselben Sauerstoffmangel litten. Eine zweite Portion wurde in kleine Flaschen gebracht, durch die ein beständiger Strom von reinem Sauerstoff geleitet wurde. Am nächsten Morgen, also 15 Stunden, nachdem die Eier in Sauerstoff gebracht waren, wurden die verschiedenen Portionen der Eier untersucht. Die in den Sauerstoffstrom gebrachten Eier zeigten in einem Gefäß 98% reife, dunkle, tote und 2% unreife, lebende Eier. Die im normalen Seewasser ge-

bliebenen Eier enthielten etwa wie vorher 75⁰/₀ reife Eier, die aber alle schwarz und tot waren, mit Ausnahme von ein paar Eiern, die angefangen hatten, sich zu furchen und am Leben waren. Ebenso waren die unreifen Eier am Leben. Die Eier dagegen, welche in der Glasröhre in völliger oder relativ hoher Sauerstoffarmut gewesen waren, waren fast alle am Leben. Diese Beobachtung deutet in der Tat daraufhin, daß derselbe Vorgang, welcher zur Reifung des Eies führt, den Tod des Eies herbeiführt, falls er nicht rechtzeitig gehemmt wird. Auf diese Weise wird der Befruchtungsvorgang zum lebensrettenden oder lebensverlängernden Akt.¹⁾

A. P. Mathews hat diese Versuche weitergeführt und ebenfalls gefunden, daß die Lebensdauer des unbefruchteten reifen Eies durch Sauerstoffmangel verlängert werden kann.²⁾

Die Entwicklungserregung wird also beim Ei des Seesterns zum lebensrettenden Akt, und das ist nur verständlich, wenn wir uns erinnern, daß die Entwicklungserregung in der Anregung von Nukleinsynthesen im Ei besteht. Im unbefruchteten Ei finden offenbar ebenfalls Oxydationen statt, was schon aus der Notwendigkeit des Sauerstoffs für die Reifung hervorgeht und außerdem daraus, daß Sauerstoffmangel das Leben des unbefruchteten Eies verlängert. Diese Oxydationen führen im unbefruchteten Ei deshalb zum Tode, weil sie in falschen Bahnen verlaufen, d. h. nicht zur Synthese von Kernsubstanzen dienen.

Wir verstehen vielleicht aus diesem Umstand, wie es kommt, daß die Einzelligen unsterblich sind. Es handelt sich bei ihnen um Zellen, bei denen die Synthese der Kernsubstanz stetig weitergeht, solange Sauerstoff und Nahrung zugeführt wird.

Was hier für das Seesternei gezeigt wurde, gilt auch für das Ei von Polynoë. Die unbefruchteten Eier zerfallen in weniger als 24 Stunden im Seewasser bei Gegenwart von Sauerstoff; in der Abwesenheit von Sauerstoff oder bei Gegenwart von Zyankalium bleiben sie bei derselben Temperatur mehrere Tage am Leben, ohne daß sie ihre Entwicklungsfähigkeit einbüßen.

1) Loeb, Über Eireifung, natürlichen Tod und Verlängerung des Lebens beim unbefruchteten Seesternei (*Asterias Forbesii*) und deren Bedeutung für die Theorie der Befruchtung. *Pflügers Arch.* **93**, 59, 1902. (Untersuchungen S. 237.)

2) A. P. Mathews, *Am. Journ. of Physiol.* **18**, 89, 1907.

Man kann nun die Frage aufwerfen, wie es kommt, daß die Somazellen nicht ebenfalls fortfahren, stetig Kernsynthesen auszuführen wie die einzelligen und wie das frisch befruchtete Ei. Das Enzymmaterial zur Kernsynthese, nämlich der Kern selbst, ist doch vorhanden. Warum kommt das Wachstum, oder richtiger die Zellvermehrung, trotz der Nahrungszufuhr zum Stillstand? Von einem Eintritt eines Gleichgewichtes zwischen Kernsubstanz und Zytoplasma kann nicht gut die Rede sein, solange durch Nahrungszufuhr eine Zunahme der aktiven Masse des Zytoplasmas möglich ist; und dazu ist ja die Gelegenheit das ganze Leben hindurch gegeben. Es muß also hier wohl ein anderer hemmender Umstand hinzukommen.

Man kann die Frage nach der Ursache des natürlichen Todes von einer anderen Seite in Angriff nehmen, nämlich durch die Bestimmung der Lebensdauer kaltblütiger Tiere. Nach Minot ist es die histologische Differenzierung der Zelle, welche zu ihrem Tode führt. Danach wäre der Tod ebensowohl eine Folge der Entwicklung, wie irgend ein embryonales Stadium desselben Organismus. Dieser Gedanke läßt sich der Prüfung unterwerfen. Wir kennen den Temperaturkoeffizienten für die Entwicklungsgeschwindigkeit des Seeigeleies. Wenn nun dieselben chemischen Prozesse, welche der Entwicklung zugrunde liegen, auch den natürlichen Tod bedingen, so sollte man erwarten, daß der Temperaturkoeffizient für die Lebensdauer kaltblütiger Organismen identisch ist mit dem Temperaturkoeffizienten für die Geschwindigkeit der Entwicklung derselben. Ich habe nun einige Versuche in dieser Richtung an befruchteten und unbefruchteten Seeigeleiern angestellt. Es stellte sich aber heraus, daß der Temperaturkoeffizient für die Lebensdauer der Organismen ganz erheblich höher ist, als der Temperaturkoeffizient für die Geschwindigkeit der Entwicklung, und daß also beide Prozesse nicht wohl identisch sein können.

Wegen der Methoden der Versuche verweise ich auf die Originalarbeit.¹⁾ Hier will ich nur als Beispiel eine Tabelle der Resultate mitteilen. In der ersten Tabelle sind Versuche am befruchteten Seeigelei mitgeteilt. Als Maß der Lebens-

¹⁾ Über den Temperaturkoeffizienten für die Lebensdauer kaltblütiger Tiere und über die Ursache des natürlichen Todes. Pflügers Arch. 124, 411, 1908.

dauer für eine Temperatur dient die Zeit, welche gerade ausreicht, die Eier so weit zu schädigen, daß die Larven nicht mehr imstande sind, sich an die Oberfläche zu erheben.

Temperatur	Lebensdauer	Temperatur	Lebensdauer
32° C	1½ Minuten	26° C	{ > 35 Minuten < 40 „
31° C	{ > 2¼ „ < 3 „	25° C	{ > 76 „ < 81 „
30° C	{ > 4 „ < 5 „	24° C	{ > 192 „ < 209 „
29° C	{ > 6 „ < 7 „	22° C	ungefähr 10½ Stunden
28° C	{ > 11 „ < 13 „	21° C	ungefähr 24 Stunden
27° C	{ > 20 „ < 22 „	20° C	ungefähr 3 Tage

Mit Temperaturen unter 20 habe ich keine Versuche ausgeführt, weil bei einer so langen Versuchsdauer eine Variable ins Spiel tritt, die sich schwer beherrschen läßt, nämlich die Bakterienentwicklung, die in manchen lange dauernden Kulturen viele Opfer fordert, in anderen wenige. Ich habe aber wiederholt beobachtet, daß die Larven des Seeigels bei einer Temperatur von 16 bis 17° C etwa 15 Tage an der Oberfläche des Gefäßes lebend gefunden wurden. Da die Tiere nicht gefüttert wurden, so war die wirkliche Lebensdauer bei dieser Temperatur höher, wahrscheinlich erheblich höher als die in diesem Falle gefundene. Auch das Hereinspielen der Futterfrage macht die Ausdehnung dieser Versuche auf niedrigere Temperaturgrade praktisch unmöglich.

Man sieht, daß der Temperaturkoeffizient für die Lebensdauer der Eier für die Grenzen der Temperatur, innerhalb deren er bestimmt wurde, ein sehr hoher ist, nämlich nahezu 2 für je 1 Temperaturgrad; für 10° C gibt das einen Temperaturkoeffizienten, der ungefähr 500 oder mehr beträgt! Verglichen mit dem Temperaturkoeffizienten für die Entwicklungsgeschwindigkeit, der nur etwa 2,8 für 10° C beträgt, ist dieser Koeffizient geradezu enorm. Allein das Beispiel steht nicht vereinzelt da. So haben Famulener und Madsen gefunden, daß der Tem-

peraturkoeffizient für die Zerstörung des Vibriolysins, welche den Charakter einer monomolekularen Reaktion besitzt, beinahe den Wert 2 für eine Temperaturerhöhung von 1° C erreicht. „Nach unseren Erfahrungen bewahrt das Vibriolysin bei Zimmertemperatur und niedrigeren Wärmegraden Jahre hindurch seine hämolytische Fähigkeit ungeändert. Selbst nach Stehenlassen bei 37° C läßt sich nach mehreren Monaten keine merkliche Abschwächung beobachten. Auf der anderen Seite genügte eine momentane Erwärmung auf 55° C, um vollständig jede Wirkung zu vernichten.“ Bei dem Tetanolysin fanden dieselben Autoren einen noch höheren Wert, nämlich die Reaktionsgeschwindigkeit stieg hier auf das zwei- bis dreifache pro Grad. Ziegenserum zerstört die roten Blutkörperchen des Kaninchens, und diese Wirksamkeit des Ziegenserums wird durch Erwärmung abgeschwächt. Die Abschwächung erfolgt mit einer Geschwindigkeit von 2,6 pro Grad, „die größte Zunahme einer Reaktionsgeschwindigkeit, die je gefunden worden ist.“¹⁾

Wenn wir nach dem Resultat dieser Bestimmungen die Frage aufwerfen, wie lange danach die natürliche Lebensdauer des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus* im Seewasser von 10° C ist, so erreichen wir eine Dauer von etwa 4 bis 8 Jahren, was wohl der Wirklichkeit entsprechen dürfte.

Es war nun von Interesse, auch den Temperaturkoeffizienten für die Lebensdauer des unbefruchteten Eies festzustellen. Dabei wurde so verfahren, daß die unbefruchteten Eier eines Weibchens in Seewasser von der gewünschten Temperatur gebracht wurden. Nach bestimmten Intervallen wurde je eine Probe der Eier in Seewasser von Zimmertemperatur übertragen und frischer Samen zugesetzt. Die Entwicklung der Eier diente als Indikator für die Lebensfähigkeit. Es stellte sich heraus, daß der Temperaturkoeffizient für die Lebensdauer der unbefruchteten Eier identisch war mit dem Temperaturkoeffizienten für die Lebensdauer der befruchteten Eier. Als Maß der Lebensdauer diente wieder die Zeit, welche nötig war, um eben die Bildung von Larven zu verhindern, die imstande waren, an die Oberfläche zu steigen. Die Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

¹⁾ Famulener und Madsen, *Biochem. Zeitschr.* **11**, 186, 1908.

Temperatur	Lebensdauer	Temperatur	Lebensdauer
32° C	$\left\{ \begin{array}{l} > 1\frac{1}{6} \text{ Minuten} \\ < 2 \text{ „} \end{array} \right.$	27° C	ca. 18 Minuten
30° C	$\left\{ \begin{array}{l} > 3 \text{ „} \\ < 5 \text{ „} \end{array} \right.$	26° C	$\left\{ \begin{array}{l} > 35 \text{ „} \\ < 40 \text{ „} \end{array} \right.$
28° C	$\left\{ \begin{array}{l} > 8 \text{ „} \\ < 10 \text{ „} \end{array} \right.$	24° C	$\left\{ \begin{array}{l} > 168 \text{ „} \\ < 200 \text{ „} \end{array} \right.$

Im Verein mit Mr. Hagedoorn habe ich inzwischen angefangen, Versuche über den Temperaturkoeffizienten für die Lebensdauer der Hausfliege anzustellen. Wir benutzten die frisch ausgeschlüpfte Imago, die wir natürlich in großen Mengen züchteten, für diese Versuche. Es hat sich bis jetzt ergeben, daß eine Partie von etwa 200 bis 300 Fliegen bei 26° C etwa 20 Stunden lebte, dieselbe Zahl derselben Zucht bei 17° C etwa 7 Tage. Auch das scheint darauf hinzudeuten, daß der Temperaturkoeffizient für die Lebensdauer erheblich höher ist, als der Temperaturkoeffizient für die Entwicklungsgeschwindigkeit.

Für die allgemeine Gültigkeit dieses Verhaltens scheinen die Beobachtungen zu sprechen, welche die Zoologen über die relative Dichtigkeit der pelagischen Organismen in kalten und gemäßigten Zonen angestellt haben. Allen Zoologen, welche die polaren Regionen besucht haben, ist es aufgefallen, wie ungeheuer zahlreich die dort vorkommenden Organismenformen im Plankton vorhanden sind. Als Beleg gebe ich zwei Zitate aus Chuns klassischem Buche: „Aus den Tiefen des Weltmeeres“: „In dem eiskalten, unter Null Grad abgekühlten Oberflächenwasser der Antarktis pulsiert ein erstaunlich reiches tierisches und pflanzliches Leben. Es wiederholen sich hier ähnliche Verhältnisse, wie wir sie in den arktischen Meeren kennen, deren Produktivität an oberflächlichem, organischem Material in bezug auf Quantum diejenige der gemäßigten und warmen Meere überbietet,“ (S. 225) und ferner „An den Kerguelen treten die zartesten Oberflächenorganismen in überraschender Fülle auf. Das Meer ist belebt von durchsichtigen Medusen, duftigen Rippenquallen aus den Gattungen *Bolina* und *Callianira* und von Siphonophorenkolonien aus der Gattung *Agalma*. Endlich zeigt sich in der Kerguelenregion besonders reich jene pelagische Lebewelt entwickelt, die als Nahrungsprodukt den unvergänglichen Quell abgibt, aus dem alles schöpft, was auf dem Boden,

am Strande und auf dem Lande lebt. Zu den antarktischen Diatomeen gesellen sich grünliche, schleimige Massen bildende Kugelalgen, welche oft auf weite Strecken hin die Oberfläche verfärben (S. 281)¹⁾

Diese Erscheinung ist bisher meines Wissens unerklärt geblieben. Die Geschwindigkeit der Entwicklung ist bei 0° natürlich erheblich langsamer als in Meeren mit gemäßigter und tropischer Temperatur. Wäre es wahr, daß der natürliche Tod eine notwendige Begleiterscheinung der Entwicklung ist, so wäre es völlig unverständlich, warum an den Polen ein so viel reicheres Tierleben herrscht als in gemäßigten Zonen. Ist aber die Tatsache, daß der Temperaturkoeffizient für die Lebensdauer kaltblütiger Tiere höher ist als der Temperaturkoeffizient für die Geschwindigkeit der Entwicklung von allgemeiner Gültigkeit, so verstehen wir, warum an der Oberfläche der arktischen Meere ein dichteres Tierleben herrscht als an der Oberfläche gemäßigter Meere; denn in diesem Falle müssen um so mehr aufeinander folgende Generationen derselben Art gleichzeitig an der Oberfläche existieren müssen, je niedriger die Temperatur ist; vorausgesetzt, daß die Temperatur nicht zu tief ist, um alles Leben zu verhindern.

Was nun auch die Ursache des natürlichen Todes sein mag, wir sind der Meinung, daß es sich um einen Umstand handelt, der nicht mit der Entwicklung identisch, sondern derselben superponiert ist. Auch Robertson ist aus seinen Berechnungen der Wachstumskurven zu einem ähnlichen Schluß in bezug auf den senilen Schwund gekommen. Was ist die geheimnisvolle Substanz, von deren Existenz das Leben abhängt? Euler²⁾ hat darauf hingewiesen, daß vielleicht zwei verschiedene Modifikationen desselben Ferments existieren: die eine beschleunigt die Hydrolysen, die andere die Synthesen. Robertson³⁾ hat neue Tatsachen gefunden, welche diese Ansicht stützen und erweitern. Bedeutet das Zugrundegehen des unbefruchtet gebliebenen Eies, daß in ihm die hydrolytischen Fermente überwiegen? Bedeutet die lebensrettende Wirkung der Befruchtung, daß die synthetisierende Modifikation gewisser Enzyme

1) Chun, Aus den Tiefen des Weltmeeres. 2. Aufl. Jena 1903.

2) Euler, Zeitschr. f. physiol. Chem. 53, 146, 1907.

3) Robertson, Journ. of Biol. Chemistry 5, 493, 1908.

die Überhand im Ei gewinnt? Ich bin auch heute noch geneigt die Ansicht auszusprechen, welche ich vor 6 Jahren veröffentlicht habe, daß in der Anregung gewisser Synthesen das Problem der Verjüngung seine Lösung finden dürfte. Die neuen Arbeiten über die Natur der hydrolytischen und synthetischen Wirkung der Fermente bilden vielleicht die Grundlage für die weitere Entwicklung dieses Problems.

XXX. Anwendung der Lysintheorie auf die Entwicklungserregung durch das Spermatozoon.

1. Wir haben wiederholt auf die Möglichkeit hingewiesen, daß die Lysintheorie der Entwicklungserregung — wie wir sie kurz nennen wollen — auch für die Entwicklungserregung durch das Spermatozoon gilt, und wir wollen nunmehr einige Stützen hierfür beibringen.

Wir haben gesehen, daß die künstliche Parthenogenese im allgemeinen aus zwei Eingriffen besteht, von denen einer die Hervorrufung einer oberflächlichen Zytolyse oder Membranbildung ist. Bei den Eiern mancher Tiere genügt dieser Eingriff nicht und ein zweiter Eingriff ist nötig, um ihnen die Entwicklung zu normalen Larven zu gestatten. Das war insbesondere für die Eier des Seeigels der Fall. Hervorrufung der Membranbildung veranlaßt bei diesem Ei zwar den Beginn der Entwicklung, aber bei Zimmertemperatur erreicht ein solches Ei nicht das Larvenstadium, sondern zerfällt, und zwar meistens während der ersten Furchung. Hemmen wir aber die Oxydationen in solchen Eiern etwa 3 Stunden lang, so entwickeln sie sich normal zu Larven; dasselbe geschieht, wenn wir solche Eier etwa 15 bis 50 Minuten lang mit hypertonischem Seewasser behandeln.

Wir wollen nun zeigen, daß auch das Spermatozoon die Entwicklungserregung durch zwei Agenzien bewirkt, von denen eines ein Lysin ist, während das zweite ähnlich wirkt, wie die kurze Behandlung des Eies mit hypertonischem Seewasser oder die länger dauernde Unterdrückung der Oxydationen im Ei. Für diesen Nachweis müssen wir die Tatsachen der heterogenen Hybridisation zu Hilfe ziehen. Ich fand vor 6 Jahren, daß die Er-

höhung der Alkalinität des Seewassers uns erlaubt, die Eier des Seeigels mit dem Samen der Seesterne zu befruchten. Für die Eier von *Strongylocentrotus purpuratus* ist es nötig, 0,6 bis 0,8 ccm $\frac{n}{10}$ NaHO zu 50 ccm Seewasser zuzufügen, um die Entwicklung derselben durch Asteriassamen zu ermöglichen. Bei den Eiern von *S. franciscanus* genügt eine geringere Alkalinitäts-erhöhung des Seewassers, um dasselbe Resultat zu erzielen.

Wenn man zu den Eiern von *S. purpuratus* Samen von *Asterias* zusetzt, so bemerkt man, daß nicht alle Eier, welche Membranen bilden, sich zu Larven entwickeln. Ein Teil der Eier beginnt, nach der geeigneten Zeit sich zu furchen, ein anderer Teil aber verhält sich wie die Eier, die nur durch ein zytolytisches Agens zur Membranbildung veranlaßt worden sind. Sie fangen nämlich bei 15° C an, zur Kernteilung zu schreiten, gehen aber dann meist in wenigen Stunden zugrunde. Ich glaubte anfangs, daß es sich bei diesen Eiern nicht um einen Einfluß der Spermatozoen, sondern um die Wirkung der dem Samen beigemischten artfremden Körpersäfte handele. Aber Kontrollversuche zeigten, daß das zwar für die Eier von *S. franciscanus*, aber nicht oder nur in geringem Maße für die Eier von *S. purpuratus* der Fall ist. Ich will deshalb die Resultate an beiden Formen getrennt besprechen.

Die Eier eines *Franciscanus*-Weibchens bildeten mit dem lebenden Samen von *Asterias* alle eine Befruchtungsmembran, und ein Teil, aber nicht alle Eier, entwickelten sich zu Larven. Der Rest ging unter den so oft in diesem Buche geschilderten Erscheinungen zugrunde. Wenn man nun die Eier dieses Weibchens mit totem Asteriassamen behandelte, d. h. mit Samen, der durch langsames Erwärmen auf 60° C getötet war, so bildeten sie auch alle die Befruchtungsmembran, aber kein Ei entwickelte sich zur Larve, sondern alle gingen nach dem Beginne der Entwicklung zugrunde. Es ließ sich also in diesem Falle nicht ohne weiteres entscheiden, ob die Lysine, welche die bloße Membranbildung (ohne nachfolgende Entwicklung) bei dem Versuche mit lebendem Samen veranlaßten, aus den Spermatozoen stammten oder aus den dem Samen beigemengten Körperflüssigkeiten des Seesterns.

Ganz anders aber verliefen die Versuche mit der Behand-

lung der Eier von *Purpuratus* mit dem Samen von *Asterias*. In einem Falle bildeten alle Eier eines Weibchens von *Purpuratus* in 5 Minuten Membranen, wenn sie in eine Mischung von 50 ccm Seewasser + $0,6 \text{ ccm } \frac{n}{10} \text{ NaHO}$ gebracht wurden, der nur wenige Tropfen lebenden *Asteriassamen* zugesetzt waren. Aber nur wenige dieser Eier (nur ein Bruchteil eines Prozentes) entwickelten sich zu Larven, die anderen zerfielen in der Weise, die für die bloße Membranbildung ohne nachträgliche Behandlung der Eier mit hypertotonischer Lösung charakteristisch ist, zum Zeichen, daß es sich nur um die Hervorrufung der Membranbildung handelte. Diese Membranbildung war aber angeregt durch die Berührung des Eies mit lebenden Spermatozoen und nicht durch die Körperflüssigkeit des Seesterns; dieser für die Theorie der Lysintheorie wichtige Punkt konnte dadurch ermittelt werden, daß, wenn man zu den Eiern den auf 50° erhitzten Samen desselben *Asteriasmännchens* zusetzte, kein Ei eine Membran bildete. Selbst wenn man die zehnfache Menge des (toten) Samens zusetzte, die in lebendem Zustande ausreichte, um alle Eier in 5 Minuten zur Membranbildung zu veranlassen, so bildete kein Ei oder nur wenige Eier Membranen, auch wenn man stundenlang wartete und die Eier gründlich mit dem Samen schüttelte und mischte. Die Wirkung des lebenden Samens beruhte also auf dem Eindringen oder der Berührung des Eies durch lebende Spermatozoen, während das das Ei umgebende Chorion die toten Spermatozoen verhinderte, in so intime Berührung mit dem Ei zu kommen, wie es für die Absorption des an der Oberfläche des Spermatozoons enthaltenen Lysins nötig war.

Daß aber die bloße Membranbildung ohne nachfolgende Entwicklung nur durch die Berührung der Eier mit Seesternspermatozoen, aber nicht durch das Eindringen der letzteren in das Ei bedingt ist, hat mein Assistent, Herr Elder, durch eine histologische Untersuchung solcher Eier nachweisen können. Die mit *Asteriassamen* behandelten Eier von *Purpuratus* wurden 10 bis 50 Minuten nach der Membranbildung getötet und später in Schnitte zerlegt. Wenn alle Eier bei der Behandlung mit *Asteriassamen* eine Membran bildeten, aber nur wenige sich zu Larven entwickelten (während der Rest sich verhielt, als ob

nur eine künstliche Membranbildung stattgefunden hätte), so konnte Herr Elder zeigen, daß auch nur wenige Eier einen Spermakern besaßen, während in der Mehrzahl der Eier nur der Eikern, aber kein Spermakern nachweisbar war. Wenn aber derselbe Versuch mit den Eiern von *Purpuratus* angestellt wurde, die mit *Purpuratus*samen befruchtet waren (wobei alle Eier sich zu Larven entwickelten), so ließ sich in jedem Ei ein Spermakern nachweisen.

Es ließ sich aber weiter der Nachweis führen, daß die Membranbildung durch das Lysin des lebenden Spermatozoons genau so wirkt wie die Hervorrufung der Membranbildung durch eine Fettsäure.

Die Eier eines *Purpuratus*weibchens wurden in hyperalkalischem Seewasser mit *Asteriassamen* behandelt und alle bildeten Membranen. Ein Teil der Eier blieb in normalem Seewasser zur Kontrolle, der größere Teil derselben wurde aber nach einer Stunde in hypertonisches Seewasser gebracht (50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl) und nach verschiedenen Intervallen in normales Seewasser übertragen. Von den Kontrolleiern entwickelte sich etwa ein Drittel zu Larven, die übrigen zwei Drittel benahmen sich wie die nur mit Buttersäure behandelten Eier: sie fingen an, sich zu entwickeln, zerfielen aber dann. Die Eier aber, welche 30 Minuten lang mit hypertonischem Seewasser behandelt waren, entwickelten sich alle zu normalen Larven. Der tote *Asteriassamen* war absolut wirkungslos. Das beweist, wie mir scheint, auf das schlagendste, daß auch das Spermatozoon die Entwicklung des Eies durch zwei Agenzien anregt, nämlich ein Lysin und ein zweites Agens, das wie die hypertonische Salzlösung bei unserer Methode der künstlichen Parthenogenese wirkt. Nur wenn beide Agenzien des Spermatozoons zusammenwirken, entwickelt sich das Seeigeei zur Larve. Was die Natur des zweiten Agens des Spermatozoons ist, vermag ich nicht anzugeben. Man könnte an eine Oxydase denken, welche durch das Spermatozoon in das Ei getragen wird. Das Lysin des Spermatozoons dient dazu, die Membranbildung anzuregen. Das zweite noch unbekanntes Agens dient dazu, um die Entwicklung in die richtigen Bahnen zu lenken, resp. die Tendenz zur Zytolyse zu hemmen.

2. Im Anschluß an Boveri könnte man sich vorstellen,

daß es sich bei dem zweiten Agens um die Bildung von Astrosphären handele, für welche die bloße Lysinwirkung nicht ausreiche. Aber diese Annahme wird durch die Beobachtung direkt widerlegt, da ja die Eier infolge der bloßen Membranbildung zur Bildung von Astrosphären veranlaßt werden und sich bei niedriger Temperatur auch furchen, ja sich bis zu Blastulen entwickeln können. Es läßt sich auch zeigen, daß die 30 Minuten lange Behandlung des Eies mit hypertonischem Seewasser nicht ausreicht, um künstliche Astrosphärenbildung im Ei zu veranlassen. Bringt man nämlich Purpuratuseier nach der Befruchtung mit dem Samen der eigenen Art 30 Minuten lang in hypertenisches Seewasser (50 ccm Seewasser + 8 ccm $2\frac{1}{2}$ n NaCl), so findet bei diesen Eiern die Furchung wie gewöhnlich in zwei und nicht in drei oder vier Zellen statt, wie es ja der Fall sein müßte, wenn die hypertonische Lösung zur Bildung überzähliger Astrosphären oder Zentrosomen geführt hätte.

3. In dem Kapitel über die Entwicklungserregung des Eies mittels artfremden Serums blieben wir den Beweis schuldig, daß Serum der eigenen Art die Membranbildung nicht anregt. Diesen Beweis wollen wir nun hier nachholen. Da Blutserum beim Seeigel nicht leicht ohne Verunreinigung zu gewinnen ist, so benutzen wir zu dem Zweck Extrakte von Hoden. Die Spermatozoen können wir durch langsames Erhitzen auf 50° töten; die Erwärmung des Serums auf 50° vermindert ja, wie wir früher sahen, seine membranbildende Wirkung nicht. Ich wählte zu diesen Versuchen sehr empfindliche Franciscanuseier. Der Zusatz weniger Tropfen von Blutserum des Rindes genügte, um die Eier zur Membranbildung zu veranlassen. Der gleiche Erfolg wurde erzielt mit dem Hodenextrakt eines Hahnes und dem toten Samen des Seesterns oder von Mollusken. Wenn aber der tote Same des Seeigels, gleichviel ob von Purpuratus oder Franciscanus, zugefügt wurde, so bildeten diese Eier keine Membranen. Selbst konzentrierter Same, der fast frei von Seewasser war, blieb wirkungslos. Dieselben Resultate erhielt ich mit den Eiern von Purpuratus, nur mit dem Unterschied, daß diese Eier überhaupt weniger empfindlich oder durchgängig für artfremdes Serum sind, als die Eier von Franciscanus. Es ist mir nie gelungen, die Eier von Franciscanus oder Purpuratus mit dem toten Seeigelsamen zur Membran-

bildung zu veranlassen, während das bei Franciscanus wenigstens relativ leicht mit dem toten Samen fremder Arten gelingt.

Was bedingt nun diese Immunität der Seeigeleier gegen die Lysine naher verwandter Arten? Darauf lautet die Antwort: Die Eier sind viel durchgängiger für die Lysine fremder Arten, als für die Lysine der gleichen oder verwandten Art. Die Lysine, namentlich die des Spermatozoons, besitzen offenbar nur eine geringe Löslichkeit im Seewasser. Sind nun die Eier schwer durchgängig für die Lysine der eigenen Art, so bleibt die im Seewasser lösliche Menge der eigenen Lysine wirkungslos; und die für die Membranbildung nötige Menge Autolysin muß durch einen besonderen Motor, das Spermatozoon, in das Ei getragen werden.

Die Richtigkeit dieses Schlusses wird durch die folgende Überlegung klar. Die Immunität des Franciscanuseies gegen die Lysine der eigenen Art kann auf einem von zwei Umständen beruhen; entweder ist das Seeigelei für die Lysine der eigenen Art undurchgängig, während es für artfremde Lysine leicht durchgängig ist, oder die Lysine der eigenen Art werden im Ei (etwa durch Antily sine) unwirksam gemacht und können daher keine Membranbildung hervorrufen. Daß diese letztere Ansicht unrichtig ist, wird dadurch erwiesen, daß, wenn das Seeigelspermatozoon in das Seeigelei eintritt, das Lysin des Spermatozoons sehr prompt die Membranbildung hervorrufft.

Wir wissen durch die Arbeiten von Landois, Nuttall und Friedenthal, daß das Serum jedes Tieres Lysine für die Zellen fremder Tierarten enthält. Auch hier entsteht die Frage, warum diese Lysine die Zellen des eigenen Körpers oder solche nahe verwandter Arten nicht angreifen. Es handelt sich hier wohl ebenfalls um Fragen der Durchlässigkeit. Die Zellen sind, wie die Eier für die Lysine der eigenen Art, schwerer durchgängig als für die Lysine fremder Arten. Was diese Unterschiede der Durchgängigkeit bedingt, wissen wir einstweilen ebensowenig, wie uns die Ursache des Umstandes bekannt ist, daß die Eier von Franciscanus für artfremde Lysine durchgängiger sind als die von Purpuratus, oder daß die Eier verschiedener Franciscanusweibchen in ihrer Durchgängigkeit für artfremde Sera oder Spermatozoen variieren.

Namenverzeichnis.

- | | | |
|--|--|--|
| <p>Amelung 220.
 Arrhenius 83, 99.</p> <p>Barthélemy 24, 25, 26.
 Bataillon 38.
 v. Berlepsch 23.
 Bernard, Claude 233,
 234, 235.
 Bichat 233, 234.
 Bois, Du 10.
 Bonnet 22.
 Boursier 26.
 Boveri 11, 12, 31, 204,
 205, 206, 211, 212,
 219, 220, 221, 250.
 Bresslau, E., 23.
 Bullot 178.
 Burian 18, 19.
 Bütschli 5.</p> <p>Chun 245, 246.
 Cohen 84.
 Connstein 197.</p> <p>De Geer 22.
 Delage 39, 94, 98, 154,
 155, 156, 167, 168,
 169, 184.
 Dewitz, J. 28.
 Du Bois 10.
 Donaldson 229.
 Driesch 204, 220, 221.
 Dzierzon 22, 23.</p> <p>Elder 116, 129, 249, 250.
 Euler 246.</p> | <p>Famulener und Madsen
 243, 244.
 Fischer, A. 216, 217.
 — M. H. 44, 156, 178,
 216, 217.
 — Loeb und Neilson 44.
 — und Ostwald 217, 218.
 Francotte 177.
 Friedenthal 252.
 — und Salm 45.
 Fühner 102, 107.</p> <p>Garrey, W. E. 38, 39,
 40, 94, 96.
 Geer, de 22.
 Geppert 55.
 Gibbs 125.
 Gies, W. J., 194, 195.
 Godlewski, E. 9, 13, 110,
 167, 215.
 Greene, C. W. 33.</p> <p>Hagedoorn, A. 7, 112,
 215, 245.
 Hamburger, H. J. 98.
 Helmholtz 10.
 Herbst 63, 67, 130, 154,
 165, 187, 213, 214, 215.
 Herold 24, 27.
 Hertwig, O. 63, 187,
 211, 221, 222, 224.
 — Rich. 29, 30, 34, 63,
 187, 221.
 Hoff, van't 83.
 Holborn 96.
 Hoppe-Seyler 19.</p> | <p>Hoyer 197, 198, 199.
 Humboldt 234.</p> <p>Jones, H. C. 99, 100.</p> <p>Kirby 22.
 v. Knaffl-Lenz, E. 126,
 137, 145, 146, 147,
 148.
 Kohlrausch 96.
 Küppe 132, 144, 145, 146.
 Kossel, A. 19, 20.
 Kostanecki 179, 180.
 Kupelwieser, H., 9, 103,
 195, 196, 210.</p> <p>Landois 252.
 Laplace 15.
 Lavbisier 15.
 Lefèvre, G. 159, 175,
 176, 177.
 Leuckart 23, 25.
 Lillie, R. S. 145, 165,
 166, 178.
 Ludwig 10.
 Lyon, E. P. 94, 152, 153.</p> <p>Madsen und Famulener
 243, 244.
 Manchot 21.
 Mathews, A. P., 160, 168,
 169, 241.
 Maxwell, S. S. 84.
 Mead, A. D. 31, 32, 33,
 159, 178, 212.
 Mendel 219.</p> |
|--|--|--|

- | | | |
|---|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Meyer, Hans 107. | P eter, K. 222, 224. | Scott 178. |
| Miescher 18. | Piéri, J. B. 192, 193. | v. Siebold 22, 23, 24,
25, 26, 27. |
| Minot 242. | Q uetelet 231. | Snyder, C. D. 84. |
| Monnier 229. | Quincke 5, 125. | Steudel 19. |
| Moore 78. | R atzeburg 22. | T aylor 21. |
| Morgan 30, 31, 33, 205,
220. | Réaumur 22. | Tichomirow 19, 26, 27,
28. |
| Neilson 44, 167. | Ringer 33. | Traube, Moritz 15, 16,
200. |
| — Loeb, Fischer und 44. | Robertson, T. B. 5, 227,
229, 246. | Treadwell 178. |
| Neubauer 102, 107. | Roux, W. 29. | van't Hoff 83. |
| Norman, W. W. 30. | S achs 220, 221. | W arburg, O. 15, 59, 201. |
| Nuttall 252. | Salm u. Friedenthal 45. | Wartenberg 197. |
| O stwald, W. 15, 156,
216, 217, 218, 227,
229. | Samassa 13. | Weismann 236. |
| — Fischer und 217, 218. | Schmid 24. | Winkler, H. 193, 194,
195. |
| Overton 102, 103, 107. | Schmiedeberg 236. | |
| | Schönlein 55. | |

Sachverzeichnis.

- A**
Acmaea 179.
Adenin 18.
Agenzien, hämolytische 132.
Aldehyde 141.
Alkali, Durchgängigkeit des Eies für 116.
— und hypertensive Lösung 124.
Alkalien, Entwicklungserregung durch 118.
Alkalinität 91.
— des Seewassers 45, 172.
Alkalische Reaktion 90.
Alkalizytolysen 115.
Alkohol 131, 141.
Ameisensäure 61, 101.
Amylen 64, 141.
— -Seewasser 163.
Annelideneier 170, 177.
Antifermente 213.
Apus 26.
Arbacia 33, 36, 37, 39, 44, 193.
Artemia 26.
Artfremde Sperma 196.
Artfremdes Blut 185.
Asterias Forbesii 44, 168, 195.
Asterina 163, 195.
Astrosphären 31, 32, 65, 205, 206, 209, 210, 216.
Astrosphärenbildung 216.
Äther 131, 141.
Äthylazetat 60.
Atmung 15.
Autokatalyse 219, 227.
Autokatalytischer Charakter der Nukleinsynthese 219.
Azeton 191.
- B**
Basen 37.
Befruchtungsmembran 2, 60.
— Mechanismus der Entstehung 125.
Befruchtungsvorgang, chemischer Charakter 10.
Benzoessäure 102, 109.
Benzol 63, 64, 69, 131, 141, 163.
— -Seewasser 163.
Bernsteinsäure 100, 105.
Berührung der Eier mit Seesternspermatozoen 249.
Beschleunigung von Oxydationsvorgängen 15.
Bestimmung des Geschlechts 25.
 β -Oxybuttersäure 103.
Bienen 183.
Bispira polymorpha 188.
Blastula 6, 86.
Blattläuse 22, 183.
Blausäure 72.
Blut, artfremdes 185.
— von Säugetieren 185.
Blutserum 150, 185, 251.
Bombix mori 23.
Buttersäure 61, 62, 101, 102, 106, 108, 109.
Caprylsäure 69, 101.
Charakter, chemischer, des Befruchtungsvorgangs 10.
Charaktere, männliche 214.
Chaetopterus 11, 32, 33, 43, 159, 177, 212.
Chemische Entwicklungserregung 65.
Chiton 195.
Chloralhydrat 57, 70.

Chlornatriumlösung 117.
 Chloroform 64, 141.
 Chlorostoma 9.
 Cholin 5.
 Chorion 116, 128, 149, 171, 181.
 Chromatinsubstanz 12.
 Chromosom 12, 206.

Dendrostoma 185, 186, 188, 190.
 Dendrostomaserum 186.
 Digitalin 133, 137.
 Druck, osmotischer 80, 126, 208.
 — — des Seewassers 39.
 Durchgängigkeit des Eies für Alkali 116.

Eier, mit Samen befruchtet 82.
 Emulsion 148, 202.
 Emulsionserscheinungen 209.
 Entstehung der Membran 127.
 Entwicklungserregende Wirkung der Säuren 62.
 Entwicklungserregung 116, 118.
 — chemische 65.
 — durch Alkalien 118.
 — durch das Spermatozoon 247.
 — ohne Membranbildung 149.
 — osmotische 44, 60.
 — — Methode der 50.
 — spontane 201.
 Entwicklungsfähigkeit der parthenogenetischen Eier 183.
 Entwicklungsgeschwindigkeit 222.
 Enzym 225.
 — lipolytisches 198.

Erwärmung der Eier 165.
 Essigsäure 61, 101, 163.
 Extrakt von Hoden 252.
 — von Seeigelsamen 196.
 — von Spermatozoen 195.

Fettsäure 61, 62, 100, 145.
 Fettsäuren, einbasische 100.
 Fettsäurebehandlung 64.
 Filtrat von Sperma 195.
 Froscheier 222.
 Furchung 4, 65, 74.

Gallenbildung 36.
 Gastrulastadium 7.
 Gefrierpunktserniedrigung 39.
 Gerbsäure 126.
 Gerinnungstheorie 216.
 Geschlechtsbestimmung 25, 220.
 Gewebszellen 203.
 Glukoside 132.
 Glykocholsaures Natron 137.
 Glycerin 197.
 Guanin 18.

Hämolytische Agenzien 132.
 Harnstoff 39, 40.
 Heterogene Hybridisation 196, 247.
 Histologische Untersuchung 249.
 Histone 18.
 Hoffsche, van't, Lösung 40, 48, 49, 120, 121, 122.
 HO-Ionen 21.
 Holothurien 196.
 Hybriden 215, 219.
 Hybridisation, heterogene 196, 247.
 Hydrolysen 17, 76, 235, 246.
 Hydroxylionen 35, 46, 47, 48, 49, 113, 114, 117, 118, 157, 159, 180, 207.
 — bei der Entwicklung 44.
 Hypertonische Lösung 37, 50, 51, 53, 57, 58, 77, 88.
 — — und Alkali 124.
 — — Wirkung der, nach der Membranbildung 77.
 Hypertonisches Seewasser 30, 77, 182.

Ionenwirkungen 34.

Jones' Solvattheorie 99.

Kalium 159.
 Kaliumsalz 44.
 Kaninchenserum 190.
 Kaprylsäure 69, 101.
 Katalysator 213, 227.
 Keimung ölhaltiger Samen 196, 200.
 Kernmaterial, spezif., Synthese von 13.

- Kernmembran, Verflüssigung der 42.
 Kernsynthese 16.
 Kernteilung 3, 14, 30.
 Kohlensäure 62, 100, 110, 198.
 Kohlensäurebehandlung 167.
 Kohlenwasserstoffe 64.
 Konstitution, chemische 100.
 Kontinuität des Lebens 219.
 — der Organismen 219, 233.
 Körpersäfte 185.
 Kreosot 63.
 Krinoiden 9.
 Krinoidensamen 215.
 Künstliche Membranbildung 66.
 — Parthenogenese, Superposition 203.

 Leben, Kontinuität des 219.
 — Verlängerung des 233.
 Lebensdauer 242.
 Lezithin 5, 19.
 Limnadia 26.
 Lipoid 131, 147, 148, 217.
 Lipoid-Eiweißverbindung 92.
 Lipoidkontroverse 148.
 Lipoidverflüssigung 92.
 Lipolytisches Enzym 198.
 Lösung des Chorions 181.
 — hypertonische 37, 50, 51, 53, 57, 58, 77, 88.
 — — und Alkali 124.
 — sauerstofffreie 123.
 — van't Hoff'sche 40, 48, 49, 120, 121, 122.
 Lottia gigantea 128, 179, 180.
 Luft oder Sauerstoff 13.
 Lysin 252.
 — des lebenden Spermatozoons 250.
 Lysintheorie 247.

 Mactra 179.
 Männliche Charaktere 214.
 Massenwirkungsgesetz 226.
 Mechanismus der Entstehung der Befruchtungsmembran 125.
 Medusen 97.
 Membran, Entstehung der 127.

 Loeb, Parthenogenese.
- Membranbildung 2, 62, 92, 100, 132, 149, 202.
 — durch eine Fettsäure 64, 250.
 — künstliche 66.
 — Nebenwirkungen der 76.
 — und Zytolyse 69.
 Membranbildungsprozeß 60.
 Mendelsche Spaltungsregel 233.
 Mg-Ionen 39.
 Milchsäure 17, 198.
 Mineralsäuren 111.
 Mitotische Zellteilung 32.
 Molluskeneier 179.
 Mütterliche Skelette 214.
 Mytilus 9, 195.

 Narcotica 57.
 Narkotische Wirkung 103.
 Natriumbutyratlösung 151, 152.
 Natriumoleat 138, 140, 141.
 Natron, glykochol- und taurocholsaures 137.
 Natronlauge 46.
 Natürliche Parthenogenese 22, 196, 200.
 Nebenwirkungen der Membranbildung 76.
 Nematius 25.
 Nereis 161.
 Nonylsäure 69, 101.
 Notwendigkeit des Sauerstoffs für die Reifung 241.
 Nukleinsäure 18, 19.
 Nukleinsäuremolekül 18.
 Nukleinsynthese 13, 15, 18, 220, 226.
 — autokatalytischer Charakter der 219.

 Oberflächenlamelle des Eies 128.
 Oogonien 11.
 Oozyte 11.
 Oozytenstadium 175.
 Ophiuriden 196.
 Organische Synthesen 236.
 Organismen, Kontinuität der 219.
 Osmotische Entwicklungserregung 44, 60.

- Osmotische Methode der Entwicklungserregung 50.
 — Wirksamkeit verschiedener Stoffe 94.
 Osmotischer Druck 80, 176, 208.
 — — des Seewassers 39.
 Oxalsäure 100, 105.
 Oxydasen 15, 93.
 Oxydationen 15, 90, 117, 201.
 Oxydationsbeschleunigung 59.
 Oxydationsprozesse 16, 219.
 — im Ei 219.
 Oxydationsvorgänge 14, 15, 56, 90, 93, 213.
 — Beschleunigung von 15.
 — im Ei 51, 56, 57.
 Oxyisobuttersäure 104.
 Oxypropionsäure 103, 104.
 Oxyssäuren 100.
- Pacific Grove** 36, 39, 47.
 Parthenogenese bei Bienen 22.
 — natürliche 22, 196, 200.
 Phosphorsäure 18.
 Pluteus 7.
 Polistes 25.
 Polkörperchen 11, 157, 177.
 Polynoë 11, 15, 66, 158, 159, 170, 171, 172, 174, 175, 241.
 Polyorchis 97.
 Propionsäure 61, 101.
 Propylalkohol 143.
 Protamine 18.
 Protoplasmalipoide 146.
 Psyche helix 22.
 Purinbasen 18.
- Rana fusca** 28.
 Reaktion, alkalische 90.
 Reifezustand 11.
 Reifung der Eier 157.
 Reifungsprozeß 11.
 Reizung 10.
 Reizwirkung 207.
 Rinderserum 190.
 Rizinusölsäure 197.
 Rizinussamen 197.
- Rohrzucker 39, 40, 96, 97.
 Rohrzuckerlösung, reine 40, 96, 97.
- Sachssches Gesetz** 221.
 Salizylaldehyd 142.
 Salzsäure 106.
 Samen, Keimung ölhaltiger 200.
 Samenbefruchtung 203.
 Samenextrakt 192.
 Saponin 69, 128, 131, 133, 134, 159, 171.
 Saponinlösung 131, 134, 136, 171.
 Saponinwirkung 131.
 Sauerstoff 13, 53, 55, 57, 58, 66, 70, 88, 123, 157, 167, 180.
 — Eier in einer Lösung ohne 55.
 — Notwendigkeit des, für die Reifung 241.
 — oder Luft 13.
 Sauerstoffabschluß 16.
 Sauerstofffreie Lösung 123.
 Sauerstoffmangel 168.
 Sauerstoffverbrauch beim befruchteten und unbefruchteten Seeigelei 15.
 Säugetierserum 188.
 Säuremoleküle, undissoziierte 110.
 Säuren 37, 100, 176, 198.
 Schatten 63.
 Schlangensterne 9.
 Schütteln 168, 169.
 Schweineserum 190.
 Seesterne 9, 44, 196.
 Seesternei 157, 162, 237, 241.
 Seesternspermatozoen, Berührung der Eier mit 249.
 Seewasser, Alkalinität des 45, 172.
 — hypertonisches 30, 77, 182.
 — zyankaliumhaltiges 73.
 Seidenspinner 24, 25, 183.
 Seife 69, 138.
 Seifenbildung 5.
 Seifenlösung 138, 139, 140.
 Semipermeabilität 127.
 Serum 126, 150, 191.
 — der eigenen Art 251.
 Skelettbildung 7.
 Skelette, mütterliche 214.

- Solanin 133, 137, 171.
 Solenobia 22, 25.
 Sommereier der Seidenspinner 183.
 Solvattheorie, Jones' 99.
 Spaltungsregel, Mendelsche 233.
 Spaltungsvorgänge 17, 213.
 Sperma, artfremde 196.
 — von Chiton usw. 195.
 — Filtrat von 195.
 Spermakern 250.
 Spermatozoon, Entwicklungs-
 erregung durch das 247.
 Sphaerechinus 193, 215.
 Spindeln 210.
 Spontane Entwicklungserregung 201.
 Strongylocentrotus franciscanus 195.
 — purpuratus 195.
 Strontium 189.
 Strychninlösung 29.
 Sublimatlösung 28.
 Superposition künstlicher Partheno-
 genese und Samenbefruchtung 203.
 Synthese 219, 246.
 — für Kernmaterial 225.
 — von spezifischem Kernmaterial
 13.
 Synthesen, organische 236.
 — oxydative 20.
 Taurocholsaures Natron 137.
 Temperatur 67, 223.
 Temperaturkoeffizient 85, 112, 221,
 223, 224, 225, 242.
 — für die Lebensdauer 242.
 Thalassema 11, 66, 159.
 — mellita 175.
 Tod 235.
 — der Eier 239.
 — natürlicher, Ursache des 242.
 Toluol 63, 64, 141.
 Tumoren 202.
 Tumorenbildung 36.
 Untersuchung, histologische 249.
 Ursache des natürlichen Todes 242.
 Valeriansäure 61.
 van't Hoff'sche Lösung 40, 48, 49,
 120, 121, 122.
 Verbindungsmembran 130.
 Vererbung 214, 220.
 Verflüssigung der Kernmembran 42.
 Verlängerung des Lebens des Eies
 233.
 Vespa 25.
 Wasserstoffionen 35, 110.
 Weinsäure 105, 108.
 Wesen des Todes 233.
 Wespen 183.
 Wirksamkeit, osmotische, verschie-
 dener Stoffe 94.
 — physiologische, der Säuren 100.
 Wirkung, entwicklungserregende,
 der Säuren 62.
 — der hypertensiven Lösung nach
 der Membranbildung 77.
 — narkotische 103.
 Woods Hole 36, 39, 47.
 Zellkerne 18.
 Zellteilung 14, 30.
 — mitotische 32.
 Zentrosom 209, 211, 212, 216.
 Zentrosomenbildung 209.
 Zerfall des Eies 56.
 Zerfallprozeß 67.
 Zitronensäure 100, 105.
 Zuckerlösung 94.
 Zyankalium 14, 56, 72, 74, 87, 166.
 Zyankaliumhaltiges Seewasser 73.
 Zytolyse 51, 63, 64, 69, 76, 132,
 133, 141, 146, 148, 151, 163.
 — und Membranbildung 69.
 Zytoplasma 70.