

Über den Mechanismus der heterogenen Befruchtung.

Von

Jacques Loeb.

(Aus dem Rockefeller Institute for Medical Research, New York.)

Eingegangen am 12. Mai 1914.

I.

Die Befruchtungsfähigkeit des Eies durch ein Spermatozoon gehört in das Gebiet der spezifischen Erscheinungen, insofern als im allgemeinen nur ein Spermatozoon derselben oder einer nahe verwandten Art in das Ei eindringen kann. Das Ei des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus* wird normalerweise nicht durch das Spermatozoon vom Seestern (z. B. *Asterias ochracea*) befruchtet. Der Verfasser fand aber vor 11 Jahren, daß 80 % und manchmal alle Eier dieses Seeigels durch *Asterias*-Samen befruchtet werden können, wenn man die Alkalinität des Seewassers nur leicht erhöht¹⁾. Man kann sagen, daß in diesem Falle die Erhöhung der Alkalinität des Seewassers dazu dient, dem Seesternsamen die spezifischen Eigenschaften gegenüber dem Seeigelei zu verleihen, welche das Seeigelspermatozoon natürlicherweise dem Seeigelei gegenüber besitzt. Wenn wir deshalb das Wesen derjenigen spezifischen Eigenschaften herausfinden wollen, die dem Seeigelsamen den Eintritt in das Seeigelei gestatten, so gehen wir am besten von einer Untersuchung der Bedingungen aus, durch welche wir beim Seesternsamen diese spezifischen Eigenschaften ersetzen können.

Das Alkali wirkt nicht bloß durch eine Erhöhung der Motilität des Seesternspermatozoons²⁾, denn wie der Verfasser schon damals

¹⁾ LOEB, Univ. Cal. Pub., Physiology. Vol. 1. 1903. p. 1; Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 99. 1903. S. 323; Bd. 104. 1904. S. 325; Arch. f. Entw.-Mech. Bd. 30. 1910. S. 44.

²⁾ Daß eine solche Wirkung stattfindet, hat MOORE durch einen hübschen Versuch gezeigt. Arch. f. Entw.-Mech. Bd. 37. 1913. S. 433.

zeigte, findet die Befruchtung nur statt, wenn die Eier und der Same sich gleichzeitig im hyperalkalischen Seewasser befinden. Behandelt man Seeigeleier und Seesternsamen getrennt mit hyperalkalischem Seewasser und mischt man sie dann hinterher in normalem Seewasser, so findet meist keine Befruchtung statt oder nur eine Befruchtung einer kleinen Zahl von Eiern¹⁾. Die hohe Beweglichkeit des Samens dauert aber in dem normalen Seewasser weiter.

Bei Versuchen, welche KUPELWIESER (1906) im Laboratorium des Verfassers anstellte, beobachtete er, daß, wenn Seeigeleier mit dem Samen von *Mytilus* zusammengebracht werden, die Eier gewisser Weibchen eine Befruchtungsmembran bildeten, daß die Eier dann aber zerfielen²⁾.

Diese Beobachtung war für die Theorie der künstlichen Parthenogenese von Bedeutung. Ich hatte gezeigt, daß man die Befruchtung des Eies durch Samen künstlich nachahmen kann, indem man die Eier erst mit einer Fettsäure behandelt, welche die Membranbildung veranlaßt. Geschieht nichts weiter mit solchen Eiern, so fangen sie an, sich zu furchen und zerfallen dann. Behandelt man sie aber hinterher kurze Zeit mit einer hypertонischen Lösung oder entzieht man ihnen länger den Sauerstoff, so können sich viele oder alle zu Larven entwickeln. In KUPELWIESERS Versuchen benehmen sich also die mit *Mytilus*-Samen behandelten Seeigeleier, wie wenn man die Membranbildung künstlich mit Buttersäure hervorgerufen hätte.

Befruchtet man nun Seeigeleier (*Purpuratus*) mit Seesternsamen, so beobachtet man, daß zwei Arten von Eiern vorhanden sind. Die einen entwickeln sich zu Larven, die andern benehmen sich, als ob bloß die künstliche Membranbildung bei ihnen veranlaßt wäre: sie fangen an, sich zu furchen, zerfallen aber rasch. Behandelt man sie aber mit einer hypertонischen Lösung, so entwickeln sie sich alle.

Hier entstand nun eine Schwierigkeit. KUPELWIESER hatte gezeigt, daß auch der wässerige Extrakt von totem Seesternsamen die Membranbildung beim Seeigelei (*Purpuratus*) hervorrufen kann. Man hätte nun denken können, daß auch die Seeigeleier, welche unter dem Einfluß von lebendem Seesternsamen in diesen Versuchen Membranen bildeten, ohne sich hinterher zu entwickeln, das nur unter dem Einfluß von Stoffen taten, welche das Spermatozoon an das Seewasser abgegeben hatten. Es ließ sich aber zeigen, daß toter Samen in der

¹⁾ Daß unter solchen Umständen einige Eier befruchtet werden können, hat GODLEWSKI gezeigt. Arch. f. Entw.-Mech. Bd. 20. 1906. S. 579.

²⁾ KUPELWIESER, Arch. f. Entw.-Mech. Bd. 27. 1909. S. 434.

niedrigen Konzentration, in der der lebende Same in diesen Versuchen wirksam war, keine Membranbildung hervorruft. Bei diesen Versuchen wurde nämlich sehr wenig lebender Seesternsamen zugefügt, während zur Hervorrufung der Membranbildung durch toten Samen eine sehr konzentrierte Samensuspension nötig war. Der Verfasser konnte ferner zeigen, daß die Erhöhung der Alkalinität des Seewassers, welche für die Befruchtung des Seeigeleies durch lebenden Seesternsamen unerlässlich ist, auf die Befruchtung durch toten Samen (oder durch wässrigen Samenextrakt) keinen Einfluß ausübt. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen beiden Fällen bestand darin, daß, während es gelingt in hyperalkalischem Seewasser praktisch alle oder die meisten Eier jedes beliebigen *Purpuratus*-Weibchens zu befruchten, das mit dem toten Samen (wie schon KUPELWIESER beobachtete) nur mit den Eiern eines kleinen Prozentsatzes von Weibchen gelingt. Endlich ließ sich zeigen, daß bei Lähmung der Seesternspermatozoen durch KCN die Membranbildung der *Purpuratus*-Eier in der hyperalkalischen Lösung in diesen Versuchen, in denen nur wenig Seesternsamen zugesetzt wurde, ausbleibt. Aus all diesen Beobachtungen mußte geschlossen werden, daß die Erhöhung der Alkalinität des Seewassers bei der heterogenen Befruchtung dazu dient, den lebenden Seesternspermatozoen den Eintritt in das Seeigelei zu ermöglichen.

Die Tatsache nun, daß unter dem Einfluß von Alkali der Seesternsamen bei den meisten oder allen Eiern des Seeigels (*Purpuratus*) die Membranbildung hervorruft, daß aber nur ein Prozentsatz dieser Eier sich zu Larven entwickelt, während die andern Eier zerfallen, erklärte ich im Anschluß an meine Theorie der künstlichen Parthenogenese.

Ich nahm an, daß das Spermatozoon neben einer membranbildenden Substanz, welche an seiner Oberfläche gelegen ist, noch einen zweiten korrektiven Faktor ins Ei trägt. Kommt das Spermatozoon nur mit dem Empfängnishügel des Eies in intime Berührung, ohne daß es völlig ins Ei aufgenommen wird, so gibt das Spermatozoon bloß die membranbildende Substanz an das Ei ab. Das letztere benimmt sich alsdann wie die Eier, bei denen die künstliche Membranbildung durch eine Fettsäure oder durch artfremdes Blut hervorgerufen ist, d. h. das Ei fängt an, sich zu entwickeln, geht aber bei Zimmertemperatur rasch zugrunde (wenn es nicht mit dem zweiten Agens der künstlichen Parthenogenese behandelt wird). Dringt aber das Spermatozoon völlig in das Ei ein, so gibt es außer der ersten

membranbildenden Substanz noch eine zweite korrektive Substanz an das Ei ab, so daß das letztere sich entwickeln kann¹⁾.

Auf Grund dieser Erwägungen kam also der Verfasser zu dem Schluß, daß bei der Befruchtung des Seeigeleies durch lebenden Seesternsamen in hyperalkalischem Seewasser zwei Arten von Eiern mit Befruchtungsmembranen vorhanden sind: erstens solche, in welche ein Spermatozoon eingedrungen ist und zweitens solche, deren Eiprotoplasma mit dem Spermatozoon nur in intime Berührung gekommen ist, ohne dasselbe aufzunehmen. Solche Eier bilden nur die Befruchtungsmembran, gehen dann aber rasch zugrunde. Um diese Annahme zu prüfen, veranlaßte der Verf. vor 5 Jahren Herrn ELDER cytologisch festzustellen, ob in jedem Versuche der Prozentsatz der Seeigeleier, welche sich unter dem Einfluß von Seesternsamen zu Larven entwickeln, auch dem Prozentsatz von Eiern entspricht, in denen sich ein Spermatozoon in den ersten Minuten nach der Befruchtung cytologisch nachweisen läßt. ELDER fand, daß das anscheinend der Fall war. Da aber diese Versuche nie zu Ende geführt wurden, nahm der Verf. diese Versuche diesen Winter, zusammen mit seinem Assistenten Herrn Dr. GELARIE, von neuem auf. Herr Dr. GELARIE fand eine Methode, welche es gestattet, im intakten Ei die Anwesenheit des Spermatozoons mit Leichtigkeit und Sicherheit nachzuweisen. Auf diese Weise waren wir imstande uns zu überzeugen, daß in jedem einzelnen Versuche der Prozentsatz der Seeigeleier, welche sich unter dem Einfluß des Seesternsamens zu Larven entwickelten, identisch war mit dem Prozentsatz der Eier, in denen 10 bis 20 Minuten nach der Membranbildung das Spermatozoon nachweisbar war. In Versuchen, in denen die Eier nur Membranen bildeten, ohne sich zu entwickeln, war zu keiner Zeit ein Spermatozoon in den Eiern nachweisbar.

II.

Diese Erscheinung, daß ein lebendes Spermatozoon die Membranbildung des Eies veranlaßt, ohne in das Ei einzudringen, ist nur eine Eigentümlichkeit der heterogenen Hybridisation. Bis jetzt ist es dem Verfasser noch nicht mit Sicherheit gelungen, diese Erscheinung bei der Befruchtung des Eies mit Samen der eigenen Art hervorzurufen. Kommt das Spermatozoon mit dem Ei der eigenen Art in Berührung, so dringt es auch ein. Das gilt auch für hyperalkalische Lösungen.

¹⁾ Artificial Parthenogenesis and Fertilization. Chicago 1913.

Es schien unter diesen Umständen von Interesse, die Bedingungen zu untersuchen, von welchen diese eigentümliche Erscheinung bei der heterogenen Befruchtung abhängt. Unter den verschiedenen Versuchen, welche der Verfasser diesen Winter zur Aufklärung dieses Problems unternommen hat, scheint der folgende von Interesse zu sein. Die Eier eines Seeigels wurden in Seewasser gebracht, dem wachsende Mengen einer Base zugesetzt wurden. Es stellte sich heraus, daß bei niederem Alkaligehalt des Seewassers nicht so viele Eier mit Seesternsamen Membranen bildeten, daß aber ein relativ großer Prozentsatz der Eier, welche Membranen bildeten, sich zu Larven entwickelten; während bei höherem Alkalizusatz mehr oder alle Eier Membranen bildeten, aber ein viel geringerer Prozentsatz der Eier mit Membran sich zu Larven entwickelte.

Das gilt für jede beliebige Base, wobei nur zu bemerken ist, daß die schwachen Basen, wie Ammoniak und die Amine, die Spermatozoen in geringerer Konzentration schädigen als die starken Basen. Der folgende Versuch mag als ein Beispiel gelten. Zu je 50 ccm Seewasser wurden verschiedene Mengen verschiedener Basen zugesetzt und die Lösung gründlich gemischt. Dann wurden je 3 Tropfen der Eier eines Seeigelweibchens (*Strongylocentrotus purpuratus*) und dann ein Minimum von Seesternsamen (*Asterias ochracea*) zugesetzt. Nach

Tabelle I.

Prozentsatz der mit Seesternsamen befruchteten und sich entwickelnden Seeigeleier.

Natur der Base		50 ccm Seewasser +					
		0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
		ccm Base					
		%	%	%	%	%	%
NaOH	befruchtet	5	40	50	80	70	60
	entwickelt	71	33	15	5	11	8
Ca(OH) ₂	befruchtet	2	80	90	80	90	60
	entwickelt	84	7	7	6	3	9
Tetraäthylammoniumhydroxyd	befruchtet	3	20	50	50	50	50
	entwickelt	72	21	17	29	13	10
NH ₃	befruchtet	5	70	70	15	0	0
	entwickelt	86	9	5			
Äthylamin	befruchtet	2	2	10	0	0	0
	entwickelt	93	60	30			
Butylamin	befruchtet	10	8	60	0	0	0
	entwickelt	88	52	19			

1 Stunde wurden die Eier in normales Seewasser übertragen, und der Prozentsatz der Eier, welche Membranen gebildet hatten, ermittelt. Am nächsten Tage wurde der Prozentsatz der Eier, welche sich zu Larven entwickelt hatten, festgestellt. Die Eier, welche sich nicht zu Larven entwickelten, zerfielen bald in der Weise, die für die Eier nach bloßer künstlicher Membranbildung charakteristisch ist.

Es ist deutlich, daß bei niedrigem Alkaligehalt weniger Eier eine Membran bilden, daß aber relativ mehr dieser Eier sich zu Larven entwickeln. Es mag nebenbei bemerkt werden, daß die Eier verschiedener Weibchen individuelle Unterschiede zeigen, erstens insofern, als für dieselbe Konzentration von Alkali bei manchen Weibchen weniger Eier befruchtet werden als bei andern, und zweitens insofern, als bei dem gleichen Prozentsatz von befruchteten Eiern der Prozentsatz der sich entwickelnden Eier variiert. Das folgende Beispiel mag das illustrieren. Die Eier von fünf *Purpuratus*-Weibchen wurden in fünf Lösungen von 50 ccm Seewasser + 0,4 ccm N/10 NaOH verteilt und wie gewöhnlich wurde das Minimum von Samen zugesetzt. Die folgende Tabelle gibt den Prozentsatz der befruchteten und sich entwickelnden Eier.

Tabelle II.

	Weibchen				
	1	2	3	4	5
Eier befruchtet	% 100	% 100	% 5	% 2	% 60
Davon entwickelten sich zu Larven	10	10	100	50	1

Wir sehen also, daß erstens innerhalb gewisser Grenzen mit zunehmendem Alkaligehalt der Lösung der Prozentsatz der Seeigelleier (*Purpuratus*), welche mit Seesternsamen (*Asterias ochracea*) Membranen bilden, zunimmt; und zweitens, daß mit zunehmendem Basengehalt auch der Prozentsatz der Eier zunimmt, welche nur eine Membran bilden, ohne sich zu entwickeln, d. h. der Eier, mit deren Protoplasma der Samen in intime Berührung kommt, ohne eindringen zu können. Diese Tatsachen werden am leichtesten verständlich unter der Annahme, daß der Zusatz von Alkali zwei verschiedene Wirkungen ausübt, er bewirkt erstens, daß mehr Spermatozoen von *Asterias* mit dem Eiprotoplasma in die intime Berührung kommen, die zur Auslösung der Membranbildung durch das Spermatozoon nötig ist; und zweitens, daß die Base ein Hindernis schafft, das dem völligen Eindringen des Spermatozoons ins Ei im Wege steht. Die beiden Wirkungen sind bei den Eiern verschiedener Weibchen nicht ganz gleich.

III.

In früheren Versuchen hatte der Verfasser bereits ermittelt, daß dem Calcium eine fast spezifische Wirkung für den Eintritt des Spermatozoons in das Seeigelei zukommt. Ohne Calcium ist keine Befruchtung des *Purpuratus*-Eies möglich, während in einer Mischung von $\text{NaCl} + \text{CaCl}_2$ die Befruchtung des Seeigeleies mit Seeigelsamen sowohl wie mit Seesternsamen leicht gelingt¹⁾. Der Unterschied zwischen beiden Fällen besteht nur darin, daß für die Befruchtung des Seeigeleies mit Seesternsamen die Lösung einen gewissen Grad von Alkalinität besitzen muß, während für die Befruchtung desselben Eies mit Seeigelsamen die Reaktion der Lösung neutral sein darf. In meinen früheren Versuchen hatte ich gefunden, daß auch für die Befruchtung des Seeigeleies durch Seeigelsamen die Lösung eine Spur alkalisch sein muß. Vielleicht lag das daran, daß das destillierte Wasser, das ich vor 11 Jahren benutzte, eine Spur Säure enthielt.

Ich hatte schon damals eine Beobachtung mitgeteilt, welche andeutete, daß Erhöhung des Calciumgehaltes der Lösung die Befruchtung des Seeigeleies durch Seesternsamen erleichtert, so daß man weniger NaOH zuzufügen braucht, um die heterogene Hybridisation zu erzielen. Der Verfasser hat sich diesen Winter überzeugt, daß es gelingt, einen großen Prozentsatz der Eier gewisser Weibchen in Seewasser zu befruchten, dessen Alkaligehalt nicht erhöht ist, wenn man zu 50 ccm Seewasser etwa 4 ccm $\frac{3}{8}$ m CaCl_2 zusetzt. In allen Fällen aber ließ sich zeigen, daß man bei Zusatz von 1 bis 4 ccm $\frac{3}{8}$ m CaCl_2 zu 50 ccm Seewasser viel weniger NaOH zusetzen braucht, um bei den meisten oder allen Eiern eines Seeigelweibchens die Membranbildung hervorzurufen. Das folgende Beispiel zeigt deutlich, wie bei niedrigem NaOH-Gehalt eine Erhöhung des CaCl_2 -Gehaltes bei künstlichem Seewasser die Zahl der Seeigeleier erhöht, die durch Seesternsamen befruchtet werden.

Zu je 3 ccm künstlichem Seewasser, d. h. einer Mischung von 50 ccm $\frac{m}{2}$ $\text{NaCl} + 1,1$ ccm $\frac{m}{2}$ $\text{KCl} + 1,0$ ccm $\frac{3}{8}$ m CaCl_2 , wurden der Reihe nach 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 ccm $\frac{3}{8}$ m CaCl_2 zugesetzt. Jeder Lösung wurde 0,1 ccm N/100 NaOH zugefügt, und jede Lösung erhielt 1 Tropfen *Asterias*-Samen und 1 Tropfen Seeigeleier (die beide in NaCl aufgefangen waren). Die folgende Tabelle gibt das Resultat.

¹⁾ LOEB, PFLÜGERS Archiv. Bd. 99. 1903. S. 323.

Tabelle III.
Purpuratus ♀ *Asterias* ♂.

3 ccm künstliches Seewasser + 0,1 ccm N/100 NaOH	
+ 0,0 ccm 3/8 m CaCl ₂ . . }	kein Ei befruchtet
+ 0,05 ccm 3/8 m CaCl ₂ . . }	
+ 0,1 ccm 3/8 m CaCl ₂ . .	30 % befruchtet
+ 0,2 ccm 3/8 m CaCl ₂ . .	30 % befruchtet
+ 0,3 ccm 3/8 m CaCl ₂ . .	80 % befruchtet
+ 0,4 ccm 3/8 m CaCl ₂ . .	60 % befruchtet
+ 0,6 ccm 3/8 m CaCl ₂ . .	5 % befruchtet
+ 0,8 ccm 3/8 m CaCl ₂ . .	nur wenige befruchtet

Erst wenn der Calciumgehalt des künstlichen Seewassers auf mehr als das Doppelte erhöht ist, findet eine Befruchtung bei dem geringen Alkaligehalt des Versuches statt. Die Eier verschiedener Weibchen verhalten sich aber nicht alle gleich, in manchen ist der minimale Calciumgehalt etwas niedriger als in dem zitierten Versuche. Es ist beachtenswert, daß, wenn man mit der Erhöhung des Calciumgehaltes fortfährt, schließlich eine Grenze erreicht wird, bei der kein Ei mehr befruchtet wird.

Magnesium hat diese Wirkung nicht und es ist unmöglich, die Befruchtung durch Zusatz von Magnesiumsalzen zu fördern. SrCl₂ kann bei der reinen Befruchtung CaCl₂ ersetzen, bei der heterogenen Hybridisation aber ist diese Wirkung zweifelhaft, weil das SrCl₂ den Samen zu sehr schädigt. Das letztere gilt in noch viel höherem Grade für BaCl₂.

Auf die Frage der spezifischen Calciumwirkung kommen wir später noch zurück. Hier soll aber schon betont sein, daß es sich nicht um eine Beeinflussung der Motilität der Spermatozoen handelt, da auch ohne Ca, namentlich bei alkalischer Reaktion der Lösung, der Same sehr tätig sein kann, ohne daß eine Befruchtung stattfindet.

Da wir nun sehen, daß bei einem geringen Alkaligehalt relativ mehr Seeigeleier sich entwickeln, welche nach Befruchtung mit Seesternsamen Membranen bilden, so lag es nahe, zu untersuchen, wie sich die Seeigeleier verhalten, wenn man sie mit Seesternsamen in Seewasser befruchtet, dessen Alkaligehalt gar nicht oder nur wenig erhöht ist, dessen Calciumgehalt man aber erhöht hat. Es stellte sich heraus, daß bei Erhöhung des Calciumgehaltes der Prozentsatz der Eier, welche sich nach Membranbildung entwickeln, noch kleiner ist als ohne Calciumzusatz. Zunahme des Calciumgehaltes wirkt also ebenso wie Zunahme des NaOH-Gehaltes in Seewasser: sie erleichtert

die intime Berührung des Spermatozoons mit dem Ei und schafft gleichzeitig ein Hindernis für das Eindringen des Seesternspermatozoons. Als Beispiel diene der folgende Versuch.

Purpuratus-Eier wurden in folgenden 2 Lösungen mit *Asterias*-Samen befruchtet:

a) 50 ccm Seewasser + 0,3 ccm N/10 NaOH.

b) 50 ccm Seewasser + 0,3 ccm N/10 NaOH + 4 ccm 3/8 m CaCl_2 .

In a bildeten 90 Prozent Eier Membranen, in b 100 Prozent. In a entwickelten sich 60 Prozent der Eier, in b nur 8 Prozent. Der Zusatz von Calcium führte also zu einer Zunahme der Zahl der Eier, welche eine Membran bildeten, aber zu einer Abnahme der Zahl der sich entwickelnden Eier. Dieses letztere Resultat ist die Regel.

IV.

Bei dem Versuch, sich eine anschauliche Vorstellung darüber zu bilden, wie die Erhöhung des HO- und Ca-Gehaltes eine Förderung der intimen Berührung des Spermatozoons mit dem Ei und gleichzeitig ein Hindernis für seinen Eintritt ins Ei herbeiführen könnte, knüpfte der Verfasser an eine frühere Äußerung über die Rolle der Agglutination bei der Befruchtung an¹⁾. Er stellte sich vor, daß für die Befruchtung eine Agglutination zwischen Spermatozoon und Ei nötig sei. Im Sinne dieser Annahme würde dann Zusatz von Ca und Erhöhung der Alkalinität der Lösung die Agglutination zwischen Seesternsamen und Seeigellei erleichtern, was ja durchaus möglich ist. Gleichzeitig aber könnten dieselben Agentien auch die Agglutination des Spermatozoons am Chorion erhöhen; die letztere Agglutination würde alsdann dafür verantwortlich sein, daß das Spermatozoon, obwohl es mit dem Eiprotoplasma in intime Berührung kommt, nicht in dasselbe eindringen kann. Um in das Ei einzudringen, muß das Spermatozoon durch das Chorion dringen, bis zur gemeinsamen Berührungsfläche zwischen Chorion und dem Eiprotoplasma. Oberflächenspannungsercheinungen (Ausbreitungsvorgänge im Sinne QUINCKES) können das Eindringen des Spermatozoons ins Ei bedingen, sobald es mit dem Eiprotoplasma oder dem Empfängnishügel in Berührung kommt. Klebt aber das Spermatozoon zu fest am Chorion, so kann das Eiprotoplasma des Empfängnishügels das Spermatozoon nur teilweise umfließen. Die so erzielte intime Berührung erlaubt es dem Spermatozoon, die membranbildende Substanz an die Rindenschicht

¹⁾ LOEB, PFLÜGERS Archiv. Bd. 99. 1903. S. 323.

des Eies abzugeben, aber infolge des partiellen Anklebens des Spermatozoons am Chorion vermag das Protoplasma des Eies das Spermatozoon nicht ganz zu umfließen und das letztere kann daher nicht in das Ei eindringen. So kommt es in solchem Falle zur bloßen Membranbildung ohne völliges Eindringen des Spermatozoons in das Ei. Das letztere verhält sich also, als ob die Membranbildung mit Fettsäure oder dem Extrakt artfremder Zellen hervorgerufen wäre.

Direkte Beobachtungen verleihen der Idee, daß Agglutination des Seesternspermatozoons mit dem Chorion unter dem Einfluß eines Zusatzes von Alkali zum Seewasser stattfindet, eine Stütze. Bringt man die Spermatozoen des Seesterns in 50 ccm Seewasser + 0,4 oder 0,6 NaOH, so geraten sie nach 10 oder 15 Minuten in einen Zustand, in dem der Zusatz von Eiweißkörpern (z. B. dem Seewasser, in dem Chorionsubstanz des Seeigeleies, oder Seesterneies gelöst ist, oder Seewasser, das Seeigelsamen enthält, oder Seewasser, dem man Rinderserum zugesetzt hat, u. a. m.) sofort eine kräftige dauernde Agglutination der Seesternspermatozoen hervorruft. Diese Tatsache ist auch der Grund, weshalb in alkalischem Seewasser die Seesternspermatozoen nach einer gewissen Zeit das Seeigelei nicht mehr befruchten können. Sie agglutinieren alsdann dauernd aneinander.

V.

Die eigentümliche Erscheinung, daß das Seesternspermatozoon mit dem Eiprotoplasma in enge Berührung kommen kann, ohne ins Ei einzutreten, wurde auf den Einfluß des Seeigelchorions auf das Seesternspermatozoon zurückgeführt. Es lag nahe, diese Annahme einer Prüfung zu unterziehen an Seeigeleiern, bei denen das Chorion entfernt war. Nach HERBST ist es möglich, das Chorion durch Säure aufzulösen. Wir brachten die Seeigeleier $1\frac{1}{2}$ bis 3 Minuten in 50 ccm Seewasser + 3 ccm N/10 HCl (unter beständigem Schütteln, um das Ankleben der Eier am Glase zu verhindern) und übertrugen sie dann in Seewasser. Solche Eier schienen das Chorion verloren zu haben. Nach unserer Annahme sollten solche Eier, wenn sie mit Seesternsamen eine Membran bilden, sich alle entwickeln. Es stellte sich zunächst heraus, daß solche Eier mit dem Seeigelsamen alle leicht befruchtet werden. In diesem Falle ist die Membranbildung etwas abnorm, aber fast alle Eier entwickeln sich. Versucht man nun solche Eier in hyperalkalischem Seewasser mit Seesternsamen zu befruchten, so beobachtet man, daß das praktisch unmöglich ist. Fügt man aber dem alkalischen Seewasser noch etwas CaCl_2 zu,

etwa 1 bis 6 ccm $3/8$ m CaCl_2 zu 50 ccm Seewasser + 0,1 ccm N/10 NaOH, so bilden viele, manchmal bis zu 80 Prozent, der Eier mit dem Samen von *Asterias ochracea* Membranen. In diesem Falle entwickeln sich praktisch alle Eier, die eine Membran bilden. Die Erscheinung, daß auf Zusatz von Seesternsamen die Seeigeleier Membranen bilden, aber dann sich nicht entwickeln, wird also zum verschwinden gebracht, wenn man die Seeigeleier vorher mit HCl behandelt, wodurch das Chorion entfernt oder stark modifiziert wird. Das stützt die Ansicht, daß diese Erscheinung durch ein Agglutinieren des artfremden Spermatozoons am Chorion bedingt ist.

VI.

Theoretische Bemerkungen.

Diese Beobachtungen lenken die Aufmerksamkeit auf eine Reihe von Bedingungen, welche bei der Befruchtung des Eies durch ein Spermatozoon in Betracht kommen, die aber bei der reinen Befruchtung der Aufmerksamkeit entgehen. Dahin gehört vor allem die Rolle des Chorions. Wenn man das Chorion des Seeigeleies durch Behandlung mit HCl entfernt oder modifiziert und solche Eier dann befruchtet, so findet man, daß 100 Prozent der Eier mit dem Samen der eigenen Art befruchtet werden, daß aber mit dem Seesternsamen solche Eier auch in hyperalkalischem Seewasser praktisch nicht mehr befruchtet werden können. Erst wenn man dem hyperalkalischen Seewasser Calcium zusetzt, wird die heterogene Befruchtung möglich. Eier desselben Weibchens, die ein intaktes Chorion besitzen, werden aber mit Seesternsamen in hyperalkalischem Seewasser ohne Calciumzusatz befruchtet. Es muß also das Seeigelchorion auf das Seesternspermatozoon eine Wirkung üben, die durch eine Erhöhung des Calciumgehaltes der Lösung ersetzt werden kann. Für das Seeigelspermatozoon ist diese Wirkung nicht nötig; hier sind wohl spezifische Einrichtungen im Spiele, die auch beim Fehlen des Chorions oder bei stark modifiziertem Chorion das Eindringen des Spermatozoons ermöglichen.

Wir müssen ferner schließen, daß es möglich ist, die spezifischen Eigenschaften, welche dem Spermatozoon des Seeigels den Eintritt in das Seeigelei ermöglichen, dem Seesternspermatozoon durch einen erhöhten Gehalt an NaOH oder CaCl_2 zu verleihen.

Drittens ist es bemerkenswert, daß die eigentümliche Erscheinung, die den Hauptgegenstand dieser Abhandlung bildet, nämlich, daß

das Seesternspermatozoon oder richtiger alle heterogenen Spermatozoen oft nur die künstliche Membranbildung beim Seeigel hervorrufen, ohne in das Ei einzudringen, nur bei der heterogenen Hybridisation stattfindet, nie aber bei der Befruchtung des Seeigeleis durch Seeigelsamen. Zur Erklärung dieses Unterschiedes können wir nur eine Vermutung aufstellen. Der Verfasser ist unter dem Eindruck, daß das Seeigelspermatozoon die Chorionsubstanz rasch verflüssigt, während das Seesternspermatozoon das nicht oder nur sehr langsam zu tun vermag. Das würde genügen, das Ankleben des Seeigelspermatozoons am Chorion des Seeigeleies auch in den alkalischen Lösungen zu verhüten, in welchen das Seesternspermatozoon beim Seeigelei die Membranbildung hervorruft, ohne in das Ei einzudringen.
