

(From the Herzstein Research Laboratory of the University  
of California, Berkeley.)

## Zur Analyse der osmotischen Entwicklungs- erregung unbefruchteter Seeigeleier.

Von

**Jacques Loeb.**

### I. Einleitung.

In früheren Arbeiten<sup>1)</sup> habe ich gezeigt, dass man den Vorgang der normalen Befruchtung oder Entwicklungserregung beim Seeigelei durch zwei verschiedene Eingriffe nachahmen kann. Der erste Eingriff besteht in der künstlichen Hervorrufung der Membranbildung im Ei. Bringt man die unbefruchteten Seeigeleier  $1\frac{1}{2}$ — $2\frac{1}{2}$  Minuten (bei  $15^{\circ}$  C.) in eine Mischung von 50 ccm Seewasser + 2,8 ccm einer  $n/10$  einbasischen Fettsäure (z. B. Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure usw.) so bilden alle Eier eine Membran, nachdem sie in normales Seewasser zurückgebracht sind. Diese Membran lässt sich von der durch das Eindringen des Spermatozoons in's Ei hervorgerufenen „Befruchtungsmembran“ nicht unterscheiden.

Dieser künstliche Membranbildungsprozess durch Buttersäure setzt im unbefruchteten Seeigelei die Entwicklung in den Gang. Nach  $1\frac{1}{2}$ —3 Stunden (je nach der Temperatur) bilden sich zwei Astrosphären, und in einer Zahl der Fälle erfolgt die erste Zelltheilung bald darauf. Ist die Temperatur sehr niedrig (z. B. etwa  $4$ — $5^{\circ}$  C.), so kann sehr langsam auch eine Reihe weiterer Zelltheilungen, ja die Entwicklung bis zur Blastula stattfinden. Bei Zimmertemperatur, d. h. bei einer Temperatur von über  $10^{\circ}$  C., z. B. bei  $15^{\circ}$  C. geht die Entwicklung meist nicht über die erste Astrosphärenbildung. Sobald dieselben gebildet sind, beginnt der Zerfall und Tod des Eies.

---

1) Untersuchungen über künstliche Parthenogenese. Leipzig 1906. Versuche über den chemischen Charakter des Befruchtungsvorgangs. Biochem. Zeitschr. Bd. 1 S. 183. 1906.

Weitere Versuche zeigten, dass die Bildung der Astrosphären (die Zelltheilungen bei niederer Temperatur) und der Tod des Eies nach der künstlichen Membranbildung nur dann stattfinden, wenn freier Sauerstoff im Seewasser vorhanden ist. Ersetzt man den freien Sauerstoff durch Wasserstoff oder hindert man die Oxydationsvorgänge im Ei durch den Zusatz einer kleinen Menge von Cyankalium zum Seewasser, so tritt keine Astrosphärenbildung, keine Zelltheilung und kein Zerfall des Eies ein. Es folgt daraus, dass die Hervorrufung der Membranbildung im unbefruchteten Ei Oxydationsvorgänge in den Gang setzt oder erheblich beschleunigt, welche vorher im Ei nicht oder nur in unwirksamer Geschwindigkeit existirten, und dass diese Oxydationsvorgänge die Nucleïnsynthese bewirken, welche das Wesen der Entwicklungserregung oder Befruchtung ausmachen, dass aber diese Oxydationen in fehlerhaften Bahnen verlaufen, d. h. zur Entwicklung toxischer Stoffe führen, die den raschen Tod des Eies bedingen <sup>1)</sup>.

Bringt man aber unbefruchtete Eier sofort oder bald nach der künstlichen Membranbildung mit Buttersäure in hypertonisches Seewasser, d. h. eine Mischung von 50 ccm Seewasser + 8 oder 10 ccm  $2\frac{1}{2}$  norm. NaCl-Lösung, und lässt man die Eier in dieser Lösung 30—60 Minuten, so entwickeln sie sich — bei richtiger Wahl der Expositionsdauer — so gut wie alle, und ein mehr oder weniger grosser Procentsatz der Eier furcht und entwickelt sich in vollkommen normaler Weise. Im Zusammenhang mit dem vorauf Gesagten müssen wir schliessen, dass durch die nachfolgende Behandlung der Eier mit hypertonischem Seewasser die Oxydationsprocesse, welche durch den Membranbildungsprocess in den Gang gesetzt wurden, in die richtigen Bahnen gelenkt werden, und dass die Bildung der toxischen Stoffe verhindert wird. Diese Wirkung der hypertonischen Lösung findet nur in der Gegenwart von freiem Sauerstoff statt. Ersetzt man in der hypertonischen Lösung den Sauerstoff durch (sorgfältig gereinigten) Wasserstoff oder verhindert man die Oxydationen im Ei durch Zusatz einer Spur von Cyankalium, so bleibt die Wirkung der hypertonischen Lösung aus, und die Eier gehen genau so zu Grunde, wie

---

1) Der Umstand, dass das Ei bei niederer Temperatur sich eine Zeitlang entwickeln kann, weist vielleicht darauf hin, dass der Temperaturcoëffizient für die Bildung dieser giftigen Substanz viel grösser ist als der Temperaturcoëffizient für die Nucleïnsynthese.

sie es nach der Membranbildung ohne nachfolgende Behandlung mit hypertonischem Seewasser thun.

Ich fand nun ferner, dass man eine normale Entwicklung auch erzielen kann, wenn man die unbefruchteten Eier erst in die hypertonische Lösung bringt und später die künstliche Membranbildung durch Buttersäure hervorruft. Bei dieser Reihenfolge der beiden Eingriffe muss man die Eier lange, nämlich 90—120 Minuten, dem hypertonischen Seewasser aussetzen<sup>1)</sup>.

Ich wies ferner darauf hin<sup>2)</sup>, dass auch bei der normalen Befruchtung durch Säuren der Vorgang der Entwicklungserregung aller Wahrscheinlichkeit nach sich aus zwei getrennten Processen zusammensetzt, nämlich dem Vorgang der Membranbildung (oder dem dieser Bildung zu Grunde liegenden chemischen Prozesse) und dem Vorgang, durch welchen die Oxydationsvorgänge in die richtigen Bahnen gelenkt werden. Herrn Kupelwieser<sup>3)</sup> ist es nämlich im hiesigen Laboratorium gelungen, zu zeigen, dass man durch den toten, vorher auf 100 ° C. erhitzten Samen von Mollusken (und auch Echinodermen) die Membranbildung bei Seegeleiern hervorrufen kann. Solche Eier verhalten sich genau so wie die Eier, bei denen man die Membran durch Buttersäure hervorruft. Sie bilden nach einiger Zeit die Astrosphären und gehen dann zu Grunde; setzt man sie aber eine  $\frac{1}{2}$  bis 1 Stunde dem hypertonischen Seewasser aus, so entwickeln sie sich in normaler Weise zu Larven. Ich zog aus all diesen und anderen schon früher veröffentlichten Thatsachen den Schluss, dass das Wesen der Entwicklungserregung in der Hervorrufung oder erheblichen Beschleunigung von Oxydationsprocessen besteht. Diese Oxydationsprocesse bilden die Voraussetzung der Nucleinsynthese aus Protoplasmabestandtheilen, welche den Furchungsvorgängen zu Grunde liegt<sup>4)</sup>; möglicher Weise ist die Nucleinsynthese eine oxydative Synthese.

In dieser Discussion ist aber eine Gruppe von Thatsachen unberücksichtigt geblieben, nämlich die rein osmotische Entwicklungserregung. In meinen ersten Versuchen über künstliche Parthenogenese brachte ich die Entwicklung von Larven aus den unbefruchteten Eiern

1) Untersuchungen über künstliche Parthenogenese S. 322 und 329.

2) Biochem. Zeitschr. Bd. 1 S. 183. 1906.

3) Kupelwieser, Biolog. Centralbl. Bd. 26 S. 744. 1906.

4) Untersuchungen über künstliche Parthenogenese. Vorrede. Pflüger's Arch. Bd. 113 S. 487. 1906. Biochem. Zeitschr. Bd. 1 S. 183 und Bd. 2 S. 34. 1906.

von Seeigeln dadurch zu Stande, dass ich dieselben 2—3 Stunden hypertonischem Seewasser oder einer das letztere ersetzenden Lösung aussetzte und dann in normales Seewasser zurückbrachte. Von einer absichtlichen künstlichen Membranbildung war dabei keine Rede, da die Bedeutung dieses Processes damals unbekannt war. Ich hatte schon im vorigen Jahre festgestellt<sup>1)</sup>, dass diese rein osmotische Methode der Entwicklungserregung insofern mit der oben erwähnten Oxydationstheorie übereinstimmt, als die hypertonische Lösung nur dann die Entwicklung unbefruchteter Seeigeleier anzuregen im Stande ist, wenn sie freien Sauerstoff enthält. Verdrängt man die Luft in der hypertonischen Lösung durch Wasserstoff oder hemmt man die Möglichkeit von Oxydationsvorgängen im Ei während der Einwirkung der hypertonischen Lösung durch Zusatz von KCN zu der letzteren, so ist kein Ei im Stande, sich zu entwickeln.

Allein der Vorgang der rein osmotischen Entwicklungserregung war nicht näher analysirt, und es war nicht ohne Weiteres klar, dass es sich hier ebenfalls um zwei verschiedene Eingriffe handle wie bei der Entwicklung mit Membranbildung. Die hier bestehende Lücke wird nun, wie ich glaube, durch die folgenden neuen That-sachen ausgefüllt.

Um diese That-sachen leichter zu verstehen, muss ich einige Bemerkungen über die Concentration der Hydroxylionen voraus-schicken. Das Seewasser in Pacific Grove, das bei diesen Versuchen benutzt wurde, wurde direct aus dem Ozean geschöpft und filtrirt. Es gab mit Phenolphthalein keine Rothfärbung, färbte sich aber orange mit Neutralroth. Seine Concentration der Hydroxylionen ( $C_{HO}$ ) war also nach Friedenthal und Salm  $\geq 10^{-6}$  norm. und kleiner als  $10^{-5}$  norm. Solche Lösungen will ich als isoalkalisch bezeichnen; Lösungen mit einer niedrigeren Concentration der Hydroxylionen bezeichne ich als hypoalkalisch und Lösungen mit höherem Concentrationsgrad der Hydroxylionen als hyperalkalisch. Da schon meine voraufgehenden Versuche<sup>2)</sup> die Bedeutung geringer Schwankungen in der  $C_{HO}$  gezeigt haben, so wird es sich vielleicht als wünschenswerth herausstellen, diese Unterscheidung allgemeiner anzuwenden. In dem Falle wären Lösungen mit derjenigen Concentration der

---

1) l. c.

2) Ueber die Ursachen der Giftigkeit einer reinen Chlornatriumlösung und ihrer Entgiftung durch K und Ca. Biochem. Zeitschr. Bd. 2 S. 82. 1906.

Hydroxylionen, die im Blute oder in der eine Zelle umgebenden Lösung normaler Weise gefunden wird, als isoalkalisch zu bezeichnen, die mit niedrigerer Concentration als hypoalkalisch und die mit höherer Concentration der Hydroxylionen als hyperalkalisch.

Da das Seewasser wegen seines Gehaltes an Carbonaten zu Versuchen über den Einfluss der Concentration der Hydroxylionen nicht bequem ist, so benutzte ich oft eine Lösung von künstlichem Seewasser, welche in Bezug auf osmotischen Druck und Zusammensetzung mit dem Seewasser annähernd identisch ist. Es handelt sich um eine Mischung halbgrammolekularer Lösungen von 100 ccm NaCl, 2,2 ccm KCl, 2 ccm CaCl<sub>2</sub> und 11,6 ccm MgCl<sub>2</sub>. Diese Lösung will ich als van't Hoff'sche Lösung bezeichnen. Die von mir benutzte Lösung gab mit Neutralroth eine röthliche Färbung, die aber auf Zusatz von 0,1—0,2  $\frac{n}{100}$  NaHO zu 50 ccm der Lösung (bei zwei Tropfen  $\frac{m}{100}$  Neutralroth) für ein paar Minuten einer Orangefärbung Platz machte. Es handelte sich also um eine Lösung, deren Concentration der Hydroxylionen  $< 10^{-6}$  vielleicht  $< 10^{-7}$  norm. war und die CO<sub>2</sub> aus der Luft absorbirte. Diese Absorption war bei der Natur der Versuche unvermeidlich. Die van't Hoff'sche Lösung war also für die Eier hypoalkalisch.

Um Missverständnisse zu vermeiden, will ich noch ausdrücklich bemerken, dass es sich im Folgenden, wenn nicht das Gegentheil erwähnt ist, um die rein osmotische Entwicklungserregung (ohne künstliche Membranbildung durch eine Fettsäure) handelt. Diese Methode besteht lediglich darin, dass die unbefruchteten Eier des Seeigels (in diesem Falle Strongylocentrotus purpuratus) 2—3 Stunden in hypertonisches Seewasser oder van't Hoff'sche Lösung gebracht und dann in normales Seewasser übertragen werden, in dem dann die Entwicklung erfolgt.

## II. Nachweis, dass in hypoalkalischer und meist auch in isoalkalischer Lösung die maximale Erhöhung des osmotischen Druckes keine Entwicklungserregung im unbefruchteten Seeigelei hervorzurufen vermag.

Als ich die rein osmotische Methode der künstlichen Parthenogenese an der in Woods Hole (im Atlantischen Ozean) vorkommenden Seeigelform *Arbacia* anwendete, gelang es mir stets, eine grosse Zahl von Larven zu erzielen. Bei der Wiederholung dieser Versuche am Stillen Ozean in Pacific Grove an der Form *Strongylocentrotus*

purpuratus gelangen die Versuche mit derselben Methode in keineswegs zufriedenstellender Weise. Manchmal erhielt ich eine kleine Zahl von Larven, in einzelnen Fällen waren die Larven zahlreich, meist aber hatte ich negative Resultate. Es war klar, dass bei dieser Methode noch eine Variable im Spiel war, die ich nicht berücksichtigt hatte. Als ich im vorigen Jahre die Versuche über den Einfluss der Concentration der Hydroxylionen auf die Giftigkeit der NaCl-Lösungen anstellte<sup>1)</sup>, kam mir der Unterschied in der Alkalinität des Seewassers in Woods Hole und hier deutlich zum Bewusstsein. Das Erstere gab eine Rothfärbung mit Phenolphthaleïn, hatte also eine Hydroxylionenconcentration von mindestens  $10^{-5}$  norm., während die Hydroxylconcentration im hiesigen Seewasser, wie schon erwähnt  $< 10^{-5}$  norm. ist. Das regte die Frage an, ob der Unterschied in der Alkalinität des Seewassers hier und in Woods Hole für die Verschiedenheit der Resultate in beiden Orten verantwortlich sein könne. Es stellte sich in der That heraus, dass eine für verschiedene Eiculturen etwas verschiedene minimale Concentration der Hydroxylionen in der hypertonen Lösung nöthig ist, wenn man aus unbefruchteten Eiern Larven hervorbringen will, und dass diese minimale Concentration meist  $> 10^{-6}$  norm. oder selbst  $> 10^{-5}$  norm. ist. Ist diese minimale Concentration der Hydroxylionen in der hypertonen Lösung nicht erreicht, so führt auch die maximale Erhöhung des osmotischen Druckes zu keiner Larvenbildung.

Ein paar Versuchsbeispiele sollen das erläutern. In je 50 ccm der van't Hoff'schen Lösung wurden 8, 12, 16, 24 und 32 ccm  $2\frac{1}{2}$  norm. KCl-Lösung zugesetzt. Die Eier eines Weibchens wurden in diese Lösungen vertheilt, nachdem sie vorher durch zweimaliges Waschen in einer van't Hoff'schen Lösung von allem Seewasser befreit waren. (Die Vorsichtsmaassregel ist unerlässlich und wurde in allen Versuchen mit dieser Lösung angewendet.) Die Temperatur der Lösungen betrug  $13^{\circ}$  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  $2\frac{1}{2}$  normal. KCl zu 50 ccm der van't Hoff'schen Lösung war der maximale osmotische Druck

---

1) Biochem. Zeitschr. Bd. 2 S. 81. 1906.

erreicht, da bei dieser Grenze oder etwas darüber die Cytolyse der Eier anfängt, die ich in einer früheren Arbeit beschrieben habe<sup>1)</sup>.

Allein nicht nur in hypoalkalischen, sondern auch in isoalkalischen Lösungen ist der stärkste osmotische Druck meist ausser Stande, die Larvenbildung in unbefruchteten Seeigeleiern anzuregen. So wurden in einem Falle zu je 50 ccm Seewasser 4, 8, 12, 16, 24 und 32 ccm  $2\frac{1}{2}$  norm. NaCl zugefügt und ein Theil der Eier eines Weibchens in diese Lösung vertheilt. Nach 20, 40, 70, 100, 135, 210, 273, 346 und 426 Minuten wurde je eine Portion Eier in normales Seewasser übertragen. In keinem Falle kam es zur Bildung einer Larve (obwohl viele Eier sich zu furchen begannen, ein Umstand, worauf wir später noch zurückkommen). Man hätte nun glauben können, dass es sich hier um Eier handle, die überhaupt in keiner Weise durch osmotische Einwirkungen zur Entwicklung veranlasst werden können. Um diesen Einwand zu prüfen, wurde mit den Eiern desselben Weibchens folgender Versuch angestellt. Zu je 50 ccm der van't Hoff'schen Lösung + 16 ccm  $2\frac{1}{2}$  norm. NaCl wurden 0, 0,1, 0,2, 0,4 und 0,8 ccm norm.  $\frac{n}{10}$  NaHO hinzugefügt. Die Eier wurden in diese Lösungen vertheilt und nach 30, 60, 90, 120 und 210 Minuten je eine Portion der Eier in normales Seewasser übertragen. Von den Eiern, die in der neutralen van't Hoff'schen Lösung — ohne Alkalizusatz — gewesen waren, entwickelte sich keines zu einer Larve, während in all den hyperalkalischen Lösungen — mit 0,1 ccm oder mehr  $\frac{n}{10}$  NaHO — sich zahlreiche Larven bildeten, wie die folgende Tabelle I zeigt. Unter Expositionsdauer ist dabei der Aufenthalt der Eier in der hyper-tonischen Lösung verstanden, unter Alkalizusatz der Betrag von  $\frac{n}{10}$  NaHO, der zu 50 ccm van't Hoff'scher Lösung zugesetzt wurde. Die Zahlen bedeuten den Prozentsatz der Eier, die sich zu schwimmenden Larven entwickelten.

Tabelle 1.

Expositionsdauer	Alkalizusatz in Kubikcentimetern $\frac{n}{10}$ NaHO				
	0	0,1	0,2	0,4	0,8
30 Minuten . . . .	0	0	0	0	0
60   "   . . . .	0	0	0	0	0
90   "   . . . .	0	20 %	25 %	zahlreich	80 %
120   "   . . . .	0	zahlreich	zahlreich	zahlreich	zahlreich
210   "   . . . .	0	0	0	0	0

1) Untersuchungen über künstliche Parthenogenese S. 288.

In Bezug auf die Thatsache, dass die 210 Minuten in der hypertonen Lösung verweilenden Eier keine Larven bildeten, sei bemerkt, dass diese Eier in Folge der Ueberexposition gelitten hatten und an schwarzer Cytolyse zu Grunde gingen<sup>1)</sup>. Auch von den nach 120 Minuten aus der hypertonen Lösung genommenen Eiern waren viele an Cytolyse zu Grunde gegangen. Ich gehe im Folgenden auf diesen Umstand nicht näher ein, da er in anderen Arbeiten bereits zur Sprache gekommen ist. Aus diesen Versuchen folgt also, dass, während bei einer Concentration der Hydroxylionen zwischen  $10^{-6}$  und  $10^{-5}$  norm. auch der stärkste zulässige osmotische Druck keine Larvenbildung hervorzurufen vermochte, ein viel geringerer osmotischer Druck bei einer  $C_{\text{HO}} = 2 \times 10^{-4}$  norm. eine grosse Zahl derselben Eier zur Larvenbildung veranlasste.

Diese Versuche wurden oft und mit demselben Resultat wiederholt, nämlich dass bei einer unteren Grenze für die Concentration der Hydroxylionen, die meist zwischen  $10^{-6}$  und  $10^{-5}$  norm. liegt, gelegentlich auch etwas höher oder niedriger ist, selbst der stärkste osmotische Druck keine künstliche Parthenogenese hervorruft, während eine Erhöhung der Concentration der Hydroxylionen über dieses Niveau die hypertonen Lösungen wirkungsvoll machte.

Es wahr nunmehr ein Leichtes, ebenso günstige Resultate durch die rein osmotische Methode der Entwicklungserregung bei *Strongylocentrotus* zu erzielen wie früher bei *Arbacia*, wenn man nur die Alkalinität des Seewassers erhöhte. So wurde in einem Versuche beispielsweise eine Mischung von 210 ccm Seewasser und 40 ccm  $2\frac{1}{2}$  norm. NaCl hergestellt. In je 50 ccm dieser Lösung wurde 0, 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 ccm  $\frac{n}{10}$  NaHO zugesetzt. Die Eier eines Weibchens wurden in die Lösungen vertheilt. Nach 60, 90, 120, 150 und 240 Minuten wurde je eine Portion der Eier in normales Seewasser zurückgebracht und ihr Verhalten beobachtet. Die Temperatur des hypertonen Seewassers von  $13\frac{1}{2}^{\circ}$  C. Nur eine dieser hypertonen Lösungen, nämlich die mit der höchsten Concentration der Hydroxylionen (2 ccm  $\frac{n}{10}$  NaHO zu 50 ccm des hypertonen Seewassers) regte die Entwicklung einer erheblichen Zahl von Larven aus den unbefruchteten Eiern an. Ein Theil dieser Larven erreichte das Pluteusstadium und schwamm sogar an der Oberfläche des Gefässes. Von den Eiern, welche dem hypertonen

---

1) Pflüger's Arch. Bd. 113 S. 487. 1906.



Seewasser mit 1,5 ccm NaHO  $1\frac{1}{2}$  Stunden ausgesetzt gewesen waren, entwickelten sich nur wenige zu Larven.

Delage hat neuerdings Versuche über künstliche Parthenogenese von Seeigeleiern mitgetheilt, bei denen er mit hypertonen Lösungen arbeitet, welchen er Natriumhyposulphit zusetzt. Ich zweifle nicht daran, dass er finden würde, dass NaHO genau ebenso wirkt bei gleicher Erhöhung der Concentration der Hydroxylionen<sup>1)</sup>.

### III. In hyperalkalischen Lösungen vermag schon eine geringe Erhöhung des osmotischen Druckes die unbefruchteten Seeigeleier zur Entwicklung in Larven zu veranlassen.

Vorversuche zeigten, dass die Eier von *Strongylocentrotus purpuratus* die relativ hohe Concentration der freien Hydroxylionen von  $4 \times 10^{-3}$  norm. in einer van't Hoff'schen Lösung für die Zeitdauer, welche für die Entwicklungserregung nöthig ist, zu ertragen vermögen. Ich versuchte nun, ob bei einer relativ hohen Concentration der Hydroxylionen eine geringe Erhöhung des osmotischen Druckes der Lösung zur Entwicklungserregung ausreicht. Gewöhnlich arbeitete ich mit Lösungen, deren osmotischer Druck um rund 60—100 % erhöht war, d. h. mit Lösungen von 50 ccm Seewasser (oder einer damit isotonischen Lösung) + 8—16 ccm  $2\frac{1}{2}$  norm. NaCl. Es stellte sich nun heraus, dass bei hinreichend hoher  $C_{HO}$  ein erheblich geringerer osmotischer Druck zur Anregung der Larvenbildung ausreicht. Als Beispiel diene folgender Versuch. Zu je 50 ccm der van't Hoff'schen Lösung + 2,0  $n_{10}$  NaHO wurden 0, 2, 4, 8 und 16 ccm  $2\frac{1}{2}$  norm. KCl zugefügt. Die unbefruchteten Eier eines Weibchens wurden in diese fünf Lösungen vertheilt, und nach 45, 64, 89, 114 und 144 Minuten wurde je eine Partie dieser Eier in normales Seewasser übertragen. Tabelle 2 gibt eine Uebersicht über das Resultat. Die Erhöhung des osmotischen Druckes ist in der Tabelle abgerundet in Procenten des Druckes der isotonischen halbgrammolekularen NaCl-Lösung angegeben. Die Temperatur war 16° C.

Es war also möglich, durch Zusatz von 4 ccm  $2\frac{1}{2}$  norm. KCl zu 50 ccm der van't Hoff'schen Lösung in stark hyperalkalischer Lösung eine grosse Zahl von Eiern zur Entwicklung in Larven anzuregen.

1) Delage, Compt. rend. de l'Acad. t. 143 p. 863. 1906.

Tabelle 2.

Expositionsdauer	Erhöhung des osmot. Druckes der Lösung um				
	0 ‰	16 ‰	30 ‰	55 ‰	97 ‰
45 Minuten . . . .	0	0	0	0	zahlr. Larven
64 „ . . . .	0	0	0	zahlr. Larven	zahlr. Larven
89 „ . . . .	0	0	zahlr. Larven	zahlr. Larven	zahlr. Larven
114 „ . . . .	0	0			
144 „ . . . .	0	0			

Ich stellte Versuche an, ob es möglich sei, durch Zusatz von bloss 2 ccm  $2\frac{1}{2}$  norm. KCl zu 50 ccm Seewasser Larven zu erzielen. Ich erhielt positive Resultate nur in zwei Versuchen. Bei einem dieser Versuche wurde zu je 50 ccm Seewasser + 2 ccm  $2\frac{1}{2}$  norm. KCl 1,0, 1,5 und 2,0 ccm  $n_{10}$  NaOH zugesetzt. Die Temperatur betrug  $12\frac{1}{2}^{\circ}$  C. Nach 120, 190, 265 und 550 Minuten wurde je eine Portion der Eier aus der hypertonischen Lösung in normales Seewasser übertragen. Eine beträchtliche Larvenbildung fand bei den Eiern statt, welche 550 Minuten in der Lösung mit 2 ccm  $n_{10}$  NaHO gewesen waren.

In einem zweiten Falle erhielt ich ein paar schwimmende Larven aus unbefruchteten Eiern, welche 14 Stunden in einer Mischung von 50 ccm Seewasser + 2 ccm  $2\frac{1}{2}$  norm. NaCl + 0,5 ccm  $n_{10}$  NaHO gewesen waren.

In diesen Versuchen betrug die Erhöhung des osmotischen Druckes des Seewassers nur ungefähr 16 ‰. Eine solche Druckerhöhung gestattet noch die normale Entwicklung befruchteter Seeigeleier. Diese Thatsache regte wieder den Gedanken an, mit dem ich vor beinahe 8 Jahren an diese Versuche herantrat, nämlich dass es gelingen müsse, durch blosser Erhöhung der Concentration der Hydroxylionen (ohne Erhöhung des osmotischen Druckes) unbefruchtete Seeigeleier zur Entwicklung zu bringen. Es gelang mir damals nur, Furchungsvorgänge der Eier ohne Larvenbildung hervorzurufen<sup>1)</sup>, und diesmal fielen meine Versuche nicht besser aus. Wir dürfen also sagen, dass in hyperalkalischen Lösungen eine sehr geringe Erhöhung des osmotischen Druckes zur Anregung von Larvenentwicklung ausreicht, dass aber, nach unserem jetzigen Wissen wenigstens, diese Erhöhung des osmotischen Druckes für Strongylocentrotus nöthig ist.

1) Untersuchungen S. 77.

Die Zunahme der Expositionsdauer mit Abnahme des osmotischen Druckes zeigt, dass diese Thatsachen einer quantitativen und theoretischen Behandlung zugänglich sind.

#### IV. Die Wirkungen der hypertonischen und hyperalkalischen Lösung lassen sich bei diesen Versuchen zeitlich trennen.

Wir kommen nun zu dem wesentlichen Ergebniss dieser Abhandlung, nämlich dass wir es bei der rein osmotischen Methode der künstlichen Parthenogenese mit einer Combination von zwei Agentien zu thun haben, die auch zeitlich getrennt zur Wirkung kommen können. Bringt man die unbefruchteten Seeigeleier erst in eine wirkungslose hyperalkalische oder isoalkalische, hypertonische Lösung und später in eine isotonische, hyperalkalische Lösung, so erhält man nicht nur ebenso gute, sondern meist bessere Resultate, als wenn man die Eier in eine Lösung, die beides, hypertonisch und hyperalkalisch, zugleich ist, wie das in den vorhin erwähnten Versuchen der Fall war. Zur Illustration des Gesagten und der Methode diene folgender Versuch. Die unbefruchteten Eier eines Weibchens wurden  $2\frac{1}{4}$  Stunden lang bei einer Temperatur von  $16^{\circ}$  C. in eine Mischung von 50 ccm Seewasser + 10 ccm  $2\frac{1}{2}$  norm. NaCl gebracht. Ein Theil der Eier wurde dann zur Controlle in normales Seewasser gelegt, während der Rest eine Zeitlang in 50 ccm Seewasser + 1 ccm  $\frac{n}{10}$  NaHO und dann in normales Seewasser übertragen wurde. Die nur mit hypertonischem Seewasser behandelten Controlleier entwickelten sich nicht und blieben nahezu alle ungefurcht, nur ein paar Eier theilten sich in zwei oder vier Zellen. Ganz anders aber verhielten sich die Eier, welche nach der Behandlung mit hypertonischem Seewasser vorübergehend in das stärker alkalisch gemachte Seewasser (50 ccm Seewasser + 1 ccm  $\frac{n}{10}$  NaHO) übertragen wurden. Nach 50, 95 und 125 Minuten wurde je eine Portion dieser letzteren Eier in normales Seewasser zurückgebracht. Von den Eiern, welche 50 Minuten im hyperalkalischen Seewasser gewesen waren, entwickelten sich ca. 20 % zu schwimmenden Larven, von den nach 95 Minuten zurückgebrachten etwa 50 %, und die nach 125 Minuten aus dem hyperalkalischen Seewasser übertragenen Eier entwickelten sich sämmtlich zu Larven. Dieser Versuch stellt also eine Parallele dar zu derjenigen Methode der künstlichen Parthenogenese, bei der erst die Eier  $1\frac{1}{2}$ —2 Stunden lang hyper-

tonischem Seewasser ausgesetzt und dann dem Membranbildungsprozess durch eine Fettsäure unterworfen werden.

Die so behandelten Eier entwickeln sich alle oder doch in grosser Zahl, während die nur mit hypertonischem Seewasser behandelten Eier sich gar nicht oder nur in geringer Zahl entwickeln. In diesem Falle entspricht die Behandlung des Eies mit Buttersäure der Behandlung der Eier mit der hyperalkalischen Lösung in den neuen Versuchen. Wie in jenen Versuchen die Eier länger als 1 Stunde im hypertonschen Seewasser bleiben müssen, ehe die künstliche Membranbildung ihre Entwicklung zu Larven veranlassen kann, so müssen auch in diesen neuen Versuchen die Eier längere Zeit in der hypertonschen Lösung bleiben, ehe die hyperalkalische Lösung diese Entwicklung hervorruft. Das wird durch folgenden Versuch illustriert.

Die Eier eines Weibchens wurden in 50 ccm Seewasser + 10 ccm  $2\frac{1}{2}$  norm. NaCl gebracht. Die Temperatur war  $14^{\circ}$  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—160 Minuten, in normales Seewasser zurückgebracht. Von den Eiern, welche nur 70 Minuten in hypertonischem Seewasser gewesen waren, entwickelte sich keines zur Larve, trotz der Behandlung mit hyperalkalischem Seewasser. Dagegen ergaben die Eier, welche 130 und 170 Minuten in hypertonischem und dann in hyperalkalischem Seewasser gewesen waren, positive Resultate, d. h. es bildete sich ein sehr grosser Procentsatz zum Theil vollkommener Larven. Die Tabelle gibt eine Uebersicht über das Resultat. Die linke verticale Reihe gibt die Expositionsdauer im hypertonschen, die obere horizontale Reihe die Expositionsdauer im hyperalkalischen Seewasser.

Tabelle 3.

Expositionsdauer im hyperton. Seewasser	Expositionsdauer im hyperalkal. Seewasser in Minuten				
	40	70	100	130	160
70 Minuten . . . .	0	0	0	0	0
100 " . . . .	0	0	1 Larve	2 Larven	0
130 " . . . .	zahlreiche Larven	zahlreiche Larven	zahlreiche Larven	fast alles entwickelt	fast alles entwickelt
170 " . . . .	zahlreiche Larven	zahlreich Larven	zahlreiche Larven	fast alles entwickelt	fast alles entwickelt

Die grösste Zahl der Larven entwickelte sich in der letzten Reihe, Expositionsdauer in hypertonischem Seewasser 170 und in hyperalkalischem Seewasser 70—160 Minuten.

Es war selbstverständlich ein Controllversuch über die Wirkung des hypertonen Seewassers allein auf diese Eier angestellt worden. Eier wurden nach 90, 120, 155, 235 und 310 Minuten aus dem hypertonen in normales Seewasser übertragen. In den nach 155 und 235 Minuten herausgenommenen Eiern fanden sich je ein paar Larven. Die länger dem hypertonen Seewasser exponierten Eier gingen alle an schwarzer Cytolyse zu Grunde. Es versteht sich nach diesen Resultaten von selbst, dass die Hydroxylionen, welche in der hypertonen Lösung sind, auch wirken, und dass daher die minimale Expositionsdauer in hypoalkalischen, hypertonen Lösungen länger ausfällt, als in isoalkalischen, hypertonen Lösungen, wobei wir voraussetzen, dass beide Lösungen nur dann die Entwicklung ermöglichen, wenn eine Nachbehandlung derselben mit hypertonischem Seewasser erfolgt.

Mit den Eiern desselben Weibchens, das im letzten Versuch (Tabelle 3) benutzt wurde, wurde gleichzeitig ein Parallelversuch angestellt, in welchem die hypertone Lösung aus 50 ccm van't Hoff'scher Lösung + 10 ccm  $2\frac{1}{2}$  norm. NaCl bestand. Das isoalkalische Seewasser des vorigen Versuches (Tabelle 3) war also durch die hypoalkalische van't Hoff'sche Lösung ersetzt. Die Eier wurden zu gleicher Zeit in die hypertone Lösung gebracht, wie im vorigen Versuch, und zu gleicher Zeit herausgenommen, und zu gleicher Zeit und gleich lang derselben hyperalkalischen Lösung ausgesetzt.

Die folgende Tabelle 4 gibt das Resultat.

Tabelle 4.

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	zahlreiche Larven
170 " . . . .	zahlreiche Larven				

Wenn man Tabelle 4 mit Tabelle 3 vergleicht, so findet man, dass die etwas höhere Concentration der Hydroxylionen in dem hyper-

tonischen, isoalkalischen Seewasser von Tabelle 3 die Expositionsdauer in dem hyperalkalischen Seewasser um etwa 30—40 Minuten verkürzt.

Bevor wir weiter gehen, möchte ich vor einer irrigen Auffassung warnen, nämlich vor der Idee, dass in einer neutralen oder sauren Lösung die Hydroxylionen nicht wirken könnten. In jeder Lösung, auch in einer alkalischen, haben wir ein Gemisch von Wasserstoff- und Hydroxylionen. Wie es nun unlogisch wäre, zu behaupten, dass in einer neutralen oder alkalischen Lösung die HO-Ionen nicht wirken können, weil zugleich freie H-Ionen in der Lösung vorhanden sind, so wäre es auch unlogisch, zu behaupten, dass in einer sauren Lösung die hier vorhandenen HO-Ionen nicht wirken können wegen der Gegenwart der H-Ionen. Der Unterschied ist nur der, dass in einer alkalischen Lösung  $C_{HO} > 10^{-7}$  norm. in einer sauren  $< 10^{-7}$  norm. ist. In beiden Lösungen muss aber die Wirkung der HO-Ionen nach Maassgabe ihrer Concentration zur Geltung kommen.

Ich stellte nun vier Lösungen her, von denen jede 50 ccm Seewasser + 10 ccm  $2\frac{1}{2}$  norm. NaCl enthielt. In diesen Lösungen wurden bezüglich 0, 0,3, 0,6 und 0,8 ccm  $n/10$  HCl zugesetzt. In Folge der Anwesenheit der Carbonate im Seewasser wird ein Theil der zugesetzten Säure neutralisirt. Die Lösung, der 0,3 ccm  $n/10$  HCl zugesetzt wurde, glich anfänglich, in Bezug auf Farbe, bei Neutralrothzusatz der van't Hoff'schen Lösung. Die Eier eines Weibchens wurden in die obigen vier Lösungen vertheilt und  $2\frac{1}{2}$  Stunden in derselben gelassen. Temperatur  $13,5^{\circ}$  C. Ein Theil dieser Eier wurde alsdann zur Controlle direct aus dem hypertonen in normales Seewasser gebracht. Fast alle diese Controlleier blieben ungefurcht und diejenigen, welche sich furchten, gingen nur in das Zweizellenstadium. Die übrigen wurden aus dem hypertonen Seewasser erst in eine Mischung von 50 ccm Seewasser + 1,5 ccm  $n/10$  NaHO gebracht. Nach 115, 145, 205 und 245 Minuten wurde je eine Portion dieser Eier in normales Seewasser zurückgebracht und ihr weiteres Verhalten beobachtet. Die folgende Tabelle 5 gibt die Resultate der Versuche.

Unter Expositionsdauer ist Aufenthalt der Eier in der hyperalkalischen Lösung verstanden. Die Bezeichnung 0, 0,3, 0,6, 0,8  $n/10$  HCl gibt die vier hypertonen Lösungen mit dem entsprechenden Säurezusatz an. Wie in allen bisherigen Versuchen, ist nur die Bildung von Larven berücksichtigt.

Tabelle 5.

Expositionsdauer in der hyperalkalischen Lösung	Natur der hypertonen Lösung in Kubikcentimeter $n_{10}$ HCl			
	0	0,3	0,6	0,8
115 Minuten . . . . .	$\frac{1}{2}$ ‰	0	0	0
145     "     . . . . .	1 ‰	wenige Larven	0	0
205     "     . . . . .	zahlr. Larven	1 ‰	1 Larve	0
245     "     . . . . .	zahlr. Larven	zahlr. Larven	2 Larven	0

Die Schätzung des Prozentsatzes der zu Larven entwickelten Eier ist in der hypertonen Lösung mit 0 HCl unsicher, da viele Eier durch schwarze Cytolyse zerstört waren, was in den anderen Lösungen gar nicht oder nur wenig der Fall war. Die Tabelle aber zeigt deutlich, dass die in der hypertonen Lösung vorhandenen Hydroxylionen ihrer Concentration entsprechend (nach einem noch zu ermittelnden Gesetze) wirken. Setzt man mehr als 0,6 ccm  $n_{10}$  HCl zu 50 ccm des hypertonen Seewassers, so tritt anscheinend keine Larvenentwicklung mehr ein, auch bei Nachbehandlung der Eier mit hyperalkalischem Seewasser.

Es handelt sich also bei der ursprünglichen rein osmotischen Methode der Entwicklungserregung unbefruchteter Eier ebenfalls um die Combination von zwei Wirkungen, die sich zeitlich trennen lassen; erstens die Wirkung des hypertonen Seewassers (mit relativ niedriger Concentration der Hydroxylionen) und zweitens um die Wirkung der Hydroxylionen in höherer Concentration. Diese letztere Wirkung entspricht der Erregung der Membranbildung durch die Fettsäurebehandlung, obgleich hier, wie wir sehen werden, doch gewisse Unterschiede vorhanden sind.

In den hier geschilderten Versuchen ging die Behandlung der Eier mit hypertonischem Seewasser derjenigen mit hyperalkalischem Seewasser voraus. Bei Versuchen mit beiden Agentien in der umgekehrten Reihenfolge habe ich bisher nur geringen Erfolg gehabt. Ich halte dieses Resultat jedoch nicht für definitiv.

#### V. Für die Entwicklungserregung von Eiern mit Membran ist schon eine relativ niedrige Concentration der Hydroxylionen in der hypertonen Lösung ausreichend.

Um nun zu erfahren, wie weit die Parallele, die wir zwischen der ursprünglichen und der neuen Methode der Entwicklungserregung

gezogen haben, zutrifft, stellte ich Versuche über diejenige Concentration der Hydroxylionen in der hypertonischen Lösung an, die nöthig ist, um Eier mit Membran zur Entwicklung zu veranlassen. Es stellte sich heraus, dass dieselbe relativ sehr gering ist, was ja schon nach den vor 2 Jahren mitgetheilten Versuchen zu erwarten war. Ich war damals auf die Bedeutung der künstlichen Membranbildung für die Entwicklungserregung aufmerksam geworden, weil ich mit dem hypertonischen Seewasser in Pacific Grove meine ursprünglichen Versuche an *Arbacia* nicht in zufriedenstellender Weise wiederholen konnte. Wenn Eier hypertonischem Seewasser aus dem Stillen Ozean ausgesetzt wurden, so entwickelten sich dieselben nach der Uebertragung in normales Seewasser sehr häufig nicht; wohl aber, wenn man hinterher diese Eier zur künstlichen Membranbildung veranlasste. Das Gleiche war noch in viel höherem Grade der Fall, wenn man erst die Membranbildung in den Eiern hervorrief und dann dieselben hinterher dem hypertonischen Seewasser aussetzte. In diesem Falle war die nöthige Expositionsdauer nur  $\frac{1}{2}$ —1 Stunde. Eine so kurze Behandlung von Eiern ohne Membran mit hypertonischem Seewasser blieb völlig wirkungslos. Es war nun von Interesse, den Einfluss der Concentration der Hydroxylionen in diesen Versuchen näher zu verfolgen. In je 50 ccm einer Mischung von 210 ccm Seewasser + 40 ccm  $2\frac{1}{2}$  norm. NaCl wurden 0, 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 ccm  $\frac{n}{10}$  NaHO zugesetzt. Die Hälfte der Eier eines Weibchens wurde dem Process der künstlichen Membranbildung durch Buttersäure unterworfen und dann in diese Lösungen vertheilt. Die andere Hälfte der Eier wurde direct, ohne erst dem Membranbildungsprocess unterworfen zu werden, in identische Lösungen gebracht. Tabelle 6 und 7 gibt die Zahl der gebildeten Larven.

Tabelle 6.

Expositionsdauer im hyperton. Seewasser	Eier mit Membran in Kubikcentimeter $\frac{n}{10}$ 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		



Tabelle 7.

Expositionsdauer im hyperton. Seewasser	Eier ohne Membran in Kubikcentimeter $n_{10}$ NaHO				
	0	0,5	1,0	1,5	2,0
60 Minuten . . . .	0	0	0	0	zahlr. Larven
90   "   . . . .	0	0	0	2 Larven	zahlr. Larven
120   "   . . . .	0	0	0	0	0
150   "   . . . .	0	0	0	0	0
240   "   . . . .	0	0	0	0	0

Während demnach bei den Eiern ohne Membran nur die maximal alkalische Lösung wirksam war, war bei den Eiern mit Membran die isoalkalische hypertonische Lösung äusserst wirksam. Die Erhöhung der Concentration der Hydroxylionen hatte nur eine Beschleunigung der Wirkung zur Folge.

In einer anderen Versuchsreihe wurden die unbefruchteten Eier eines Weibchens erst mit Buttersäure behandelt, um die Membranbildung hervorzurufen. Alle bildeten Membranen, ein Resultat, das ich fast in jedem Falle mit dieser Methode erhalte. Dann wurden die Eier in eine Reihe von Schalen mit je 50 ccm van't Hoffscher Lösung + 8 ccm  $2\frac{1}{2}$  norm. NaCl gebracht, denen bezüglich 0, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 und 1,6 ccm  $n_{50}$  NaHO zugesetzt war. Die Tabelle 8 gibt den Procentsatz der gebildeten Larven.

Tabelle 8.

Expositionsdauer in der hyper- tonischen Lösung	Alkalizusatz zu der hypertonischen Lösung in Kubikcentimeter $n_{50}$ NaHO					
	0	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6
30 Minuten . .	0	{ einige Larven }	5 %	5 %	{ wenige Larven }	wenige Larven
40   "   . .	5 %	10 %	20 %	20 %	50 %	20 %
50   "   . .	20 %	80 %	50 %	80 %	80 %	100 %
60   "   . .	25 %	90 %	90 %	90 %	90 %	90 %
70   "   . .	80 %	90 %	90 %	90 %	90 %	90 %

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

Die hier mitgetheilten Tabellen zeigen, dass diese Methode quantitativ verwertbare Resultate gibt.

## VI. Ueber rudimentäre Membranbildung bei der rein osmotischen Entwicklungserregung.

Ich glaube, dass die bisher mitgetheilten Thatsachen keinen Zweifel darüber lassen, dass bei der rein osmotischen Methode der Entwicklungserregung zwei Einflüsse zusammenwirken, die sich auch zeitlich trennen lassen, und dass demnach eine Parallele besteht zwischen diesen Versuchen und den Versuchen an Eiern mit künstlicher Membranbildung. Ich will nun zeigen, dass diese Parallele weiter geht und dass in der That bei der rein osmotischen Entwicklungserregung eine Membranbildung stattfindet, die nur aus gewissen, mit der Versuchsmethode verknüpften Gründen weniger deutlich und oft nicht wahrnehmbar ist. Um diese Thatsachen besser zu verstehen, müssen wir auf einige morphologische Beobachtungen eingehen.

Wenn man unbefruchtete Seeigeleier ohne Membran — nur von solchen ist zunächst hier die Rede — hypertonischem Seewasser oder einer das letztere ersetzenden Lösung aussetzt, so beobachtet man drei Arten von Wirkungen an den Eiern, nachdem sie in normales Seewasser übertragen sind. Diese drei Wirkungen lassen sich durch passende Wahl der Concentration der Hydroxylionen, der Expositionsdauer und der Erhöhung des osmotischen Druckes ziemlich sauber trennen.

Zunächst findet man, dass Behandlung mit hypertonischem Seewasser der van't Hoff'schen Lösung viele Eier veranlasst, sich in zwei oder vier oder acht Zellen zu theilen. Diese Wirkung erhält man gewöhnlich, wenn man die unbefruchteten Eier von *Strongylocentrotus* 2—3 Stunden in hypo- oder auch isoalkalische, hypertonische Lösungen bringt und sie dann in normales Seewasser überträgt. Diese Furchung ist völlig regelmässig, wie beim befruchteten Ei. Sie unterscheidet sich von der Furchung des befruchteten Eies dadurch, dass sie nicht über die frühen Furchungsstadien hinausgeht und im Allgemeinen nicht zu einer Larvenentwicklung führt. Diese Thatsache zeigt, dass es ungenügend ist, wenn man mit Boveri das Wesen des Befruchtungsvorgangs in der Astrosphärenbildung sieht. Die Eier, von denen hier die Rede ist, haben bei jeder Zelltheilung die normale Zahl von Astrosphären, die normal functioniren. Es fehlt ihnen aber etwas Anderes, das zur Entwicklung in Larven nöthig ist und das die nächste Gruppe von Eiern, die wir nunmehr besprechen wollen, besitzt.

Zweitens findet man Eier, die nach Behandlung mit hypertonischem Seewasser sich zu Larven entwickeln. Dieses Resultat erhält man, wie aus meinen früheren und dieser Arbeit hervorgeht, wenn die hypertonische Lösung hyperalkalisch, gelegentlich auch, wenn sie isoalkalisch ist. Die Eier, die sich zu Larven entwickeln, haben häufig eine Membran, die oft dann am besten zu beobachten ist, wenn die Larve eben bereit ist, ihre Schwimmbewegungen zu beginnen. Diese Membran unterscheidet sich von der Buttersäuremembran dadurch, dass sie dem Ei meist enger anliegt. Wir kommen auf diesen Umstand später zurück. Ein zweiter merkwürdiger Umstand ist der, dass diese Eier sich zu Larven entwickeln, ohne dass sie die frühen Zelltheilungsvorgänge durchmachen. Solche Eier unterscheiden sich von normalen ungefurchten Eiern nur sehr wenig; sie sind oft ein wenig heller und vielleicht leicht amöboid in ihrer Form. Sie überraschen den Beobachter dadurch, dass sie plötzlich an der Peripherie in regelmässigen Abständen Kerne erkennen lassen, und dass sie bald darauf anfangen, zu schwimmen. Solche Eier können sich zu völlig normalen, oben schwimmenden Blastulen, völlig normalen Gastrulen und Pluteen entwickeln. Ich habe die Beobachtung solcher Entwicklung von Larven ohne initiale Zelltheilung zuerst bei meinen Versuchen über die künstliche Parthenogenese von *Chaetopterus* gemacht <sup>1)</sup>; aber in jenem Falle handelte es sich um Larven, die bald zu Grunde gingen, während es sich hier um Larven handelt, die offenbar lange zu leben im Stande sind, vielleicht eben so lange, wie die aus befruchteten und sich normal furchenden Eiern hervorgehenden.

Ehe wir nun weiter gehen, möchte ich besonders betonen, dass es sich hier um die rein osmotische Methode der Entwicklungserregung handelt. Bei Seeigeleiern, die erst dem künstlichen Membranbildungsprocess und dann dem hypertonischen Seewasser ausgesetzt werden, tritt, wie bei den mit Samen befruchteten Eiern, eine regelmässige Furchung ein.

Als dritte Wirkung der hypertonischen Lösungen beobachtet man den Zerfall der Eier unter schwarzer Cytolyse. Da ich aber

---

1) Loeb, Untersuchungen über künstliche Parthenogenese S. 206. — Driesch befindet sich im Irrthum, wenn er diese Entdeckung F. Lillie zuschreibt. Lillie bat mich, nach meiner Publication, um die Erlaubniss, diese Entdeckung weiter zu verfolgen, was ich ihm natürlich gestattete, obwohl ich beabsichtigt hatte, das selbst zu thun.

diesen Fall in früheren Arbeiten <sup>1)</sup> besprochen habe, so will ich hier darauf nicht eingehen.

Wenn man unbefruchtete Eier, die nicht zur Membranbildung veranlasst worden sind, in eine hyperalkalische, hypertonsche Lösung bringt, so kann man, wenn die Eier wieder in Seewasser gebracht sind, beide Classen von Wirkungen beobachten, nämlich Eier, die zur Furchung veranlasst werden, und Eier, die anfänglich ohne sichtbare äussere Furchung in Blastulae übergehen. Diese letzteren sind die Eier, welche oft, möglicher Weise immer, eine Membran besitzen. Als ich mich nun vergewisserte, dass diese Larven nicht aus den Eiern entstehen, die sich furchen, bemerkte ich eine auffallende Thatsache, nämlich dass gelegentlich eine einzelne Blastomere eines solchen Eies, das im Vier- oder Achtzellstadium stehen geblieben war, etwas heller wird, sich mit einer Membran umgibt und nun, anscheinend ohne dass eine weitere Furchung erfolgt, nach etwa 20 Stunden anfängt zu schwimmen. Man erhält so Halb-, Viertel- und Achtcellarven. Gelegentlich entwickelt sich auch eine Ganzlarve aus einem Ei, das angefangen hatte, sich zu furchen. In dem Falle findet man gewöhnlich, dass alle Blastomeren heller werden und sich mit einer feinen Membran umgeben. Diese Fälle sind aber Ausnahmen, in der Mehrzahl der Fälle bleiben die Eier, welche sich bei der Behandlung mit der rein osmotischen Methode zu furchen anfangen, auf einer frühen Furchungsstufe stehen, oder sie zerfallen. Es kommt nur dann zur Larvenbildung, wenn eine weitere, innere Veränderung im Ei stattfindet, die sich äusserlich in einer Aufhellung des Protoplasmas und häufig in der Bildung einer feinen, sichtbaren Membran bemerkbar macht.

Wir sehen also, dass auch bei der rein osmotischen Entwicklungs-  
erregung häufig, wenn nicht immer, eine Membranbildung stattfindet. Es fragt sich, ob vielleicht nicht die äusseren Versuchsbedingungen dafür verantwortlich sind, dass die Membran in diesen Fällen dem Ei so fest anliegt. Das ist sicher zum Theil, wenn nicht vollständig, der Fall. Vor drei Jahren stellte ich Versuche über die Superposition von zwei verschiedenen Befruchtungsmethoden an demselben Ei an, zu deren Veröffentlichung es mir bisher an Zeit gefehlt hat. Ein Versuch bestand darin, dass ich unbefruchtete Eier durch Behandlung mit hypertonischem Seewasser zur Furchung veranlasste.

---

1) Pflüger's Arch. Bd. 113 S. 487. 1906.

Es handelte sich um Eier, die im frühen Furchungsstadium stehen blieben. Wenn man zu solchen Culturen Samen zufügte, so konnte man beobachten, dass die einzelnen Blastomeren als Zwei-, Vier-, Acht-, ja Sechzehnzellstadium sich mit einer Membran umgaben und weiter furchten. Diese Membran lag aber der Blastomere immer dicht an.

Auch die Eier, die sich nach der Behandlung mit hypo- oder isoalkalischen, hypertonen Lösungen nicht furchten, bildeten oft solche dicht anliegende Membranen, wenn sie hinterher durch Samen befruchtet wurden. Auch die Concentration der Hydroxylionen ist für den Membranbildungsprocess von Bedeutung, wie folgende Beobachtung zeigt. Die Behandlung der Eier mit einer einbasischen Fettsäure führt bekanntlich erst dann zur Membranbildung, nachdem die Eier wieder in normales Seewasser übertragen worden sind. In saurem Seewasser findet keine Membranbildung statt. Ich brachte nun die Eier aus dem buttersäurehaltigen Seewasser in van't Hoff'sche, also eine hypoalkalische Lösung. Alle Eier bildeten Membranen, die aber viel weiter als gewöhnlich von dem Ei abstanden. Es fand also in der hypoalkalischen Lösung eine Hypersekretion von Flüssigkeit bei der Membranbildung statt. Ich brachte Eier desselben Weibchens aus demselben buttersäurehaltigen Seewasser in 50 ccm van't Hoff'sche Lösung + 1 ccm  $\frac{n}{10}$  NaHO, also eine hyperalkalische Lösung. In diesem Falle bildeten sich auch Membranen, aber sie lagen dem Ei so dicht an, dass es mir erst nach einiger Zeit, als die Membran sich etwas vom Ei entfernte, gelang, ihre Existenz mit Sicherheit festzustellen. Wenn die Eier aber nach der Buttersäurebehandlung in normales Seewasser übertragen wurden, so bildeten sich normale Membranen, die zwischen beiden Extremen lagen.

Zum Schlusse möchte ich darauf hinweisen, dass für die Erzielung normaler Larven die Combination künstlicher Membranbildung und hypertones Seewasser der rein osmotischen Methode der künstlichen Parthenogenese vorzuziehen ist. Nur die erstere Methode ist eine adäquate Nachahmung des normalen Befruchtungsvorgangs.

## VII. Ueber die Nothwendigkeit von freiem Sauerstoff bei der osmotischen Entwicklungserregung.

Die morphologischen Erscheinungen, wie die Astrosphärenbildung, die Membranbildung und andere, sind werthvoll als Indicatoren für das Verständniss des Befruchtungsvorgangs, aber wir gerathen bald

in Widerspruch mit den Thatsachen, wenn wir sie als Ursachen behandeln. Auch die übliche physiologische Bildersprache, wie beispielsweise, dass das Ei sich in Folge eines „Reizes“ entwickle, führt nur zu leeren Phrasen. Wenn wir weiter kommen wollen, so müssen wir das Ziel einer chemischen Analyse des Befruchtungsvorgangs im Auge behalten. Ich bin nun in früheren Arbeiten bereits zu dem Schluss gekommen, dass eine Anregung und Beschleunigung von Oxydationsprocessen als der wesentliche Schritt bei der Befruchtung anzusehen ist, und dass diese Oxydationsvorgänge der Nucleinsynthese aus Protoplasmabestandtheilen direct oder indirect zu Grunde liegen.

Es schien mir wichtig, noch einmal die Thatsache zu prüfen, dass ohne die Möglichkeit von Oxydationsvorgängen die hypertonische Lösung wirkungslos auf das Ei bleibt, auch wenn sie hyperalkalisch ist. In je 50 ccm van't Hoff'scher Lösung + 8 ccm  $2\frac{1}{2}$  norm. KCl + 0,1 ccm  $n_{10}$  NaHO wurden 0, 0,7, 1,5 und 2 ccm  $\frac{1}{10}$  % KCN zugesetzt, und die Cyankaliumlösung wurde gründlich mit den hypertonischen Lösungen gemischt, ehe die Eier hineingebracht wurden. Die Eier eines Weibchens blieben in diesen Lösungen 130, 215, 305 und 380 Minuten. Dann wurden sie alle in frisches normales Seewasser übertragen und für eine gute Durchlüftung desselben gesorgt. Die Eier, welche in dem hypertonischen Seewasser ohne Cyankalium gewesen waren, entwickelten sich in grosser Zahl zu schwimmenden Larven. Von den Eiern, welche in den cyankaliumhaltigen, hypertonischen Lösungen gewesen waren, entwickelte sich kein einziges, sie blieben völlig unverändert und fürchten sich nicht einmal. Sie sahen wie völlig intacte und unbefruchtete Eier aus, als wären sie nie mit hypertonischem Seewasser behandelt worden. Dass sie nicht nur intact aussahen, sondern auch wirklich intact waren, wurde dadurch bewiesen, dass ich am nächsten Tage Samen zu den Eiern zusetzte, und dass nunmehr alle sich normal fürchten und entwickelten. Die Befruchtungsmembran schloss sich eng an das Protoplasma, aber das erfolgt auch bei Eiern, welche längere Zeit, 24—48 Stunden, in normalem Seewasser gelegen haben.

Dass die Vertreibung von Sauerstoff aus der hypertonischen Lösung ebenso wirkt wie der Zusatz von Cyankalium, habe ich schon im vorigen Jahre bewiesen. Herr Wolfsohn wiederholte diese Versuche dieses Jahr mit hyperalkalischem, hypertonischen Seewasser mit dem gleichen Resultat. Ich stellte nun Versuche darüber an, ob der Zusatz von Cyankalium zum hypertonischen Seewasser die

Furchung und Entwicklung der Eier zu Larven auch dann hemmt, wenn dieselben hinterher hyperalkalischem, isotonischen Seewasser ausgesetzt werden. Das ist der Fall.

Wir dürfen aus all diesen und den früher schon über den Gegenstand mitgetheilten Versuchen den Schluss ziehen, dass die Wirkung der hypertonen Lösung mit der Bildung bestimmter Oxydationsproducte im Ei zusammenhängt, worüber schon in den früheren Arbeiten das Nöthige gesagt wurde.

### VIII. Zusammenfassung der Resultate.

1. Die ursprüngliche rein osmotische Methode der Entwicklungserregung unbefruchteter Seeigeleier besteht in Wirklichkeit aus der Combination von zwei verschiedenen Agentien, von denen das eine die Erhöhung des osmotischen Druckes bei relativ niedriger Concentration der Hydroxylionen ist, das zweite die Hydroxylionen in höherer Concentration.

2. Die Richtigkeit dieser Behauptung wird durch folgende That-sachen bewiesen:

a) Bei relativ niedriger Concentration der Hydroxylionen, nämlich  $C_{HO} < 10^{-6}$  norm., vermag auch die stärkste Erhöhung des osmotischen Druckes keine Larvenbildung bei den unbefruchteten Eiern hervorzurufen.

b) Bei genügend hoher Concentration der Hydroxylionen z. B.  $C_{HO} = 4,10^{-3}$  norm. vermag schon eine relativ geringe Erhöhung des osmotischen Druckes Larvenbildung zu bewirken.

c) Die Wirkungen der beiden Agentien, nämlich der hypertonen und hyperalkalischen Lösung, lassen sich zeitlich trennen, indem man erst die unbefruchteten Eier  $1\frac{1}{2}$ —2 Stunden hypertonischem Seewasser mit niedriger Concentration der Hydroxylionen aussetzt und dieselben darauf etwa 2 Stunden in Seewasser bringt, dem man eine genügende Menge Natronlauge zusetzt. Die mit dem hypertonen Seewasser allein behandelten Eier bilden keine Larven, während die hinterher mit dem hyperalkalischen Seewasser behandelten Eier zahlreiche und häufig normale Larven hervorbringen.

3. Die sich bei der rein osmotischen Behandlung zu Larven entwickelnden Eier bilden häufig (wenn nicht immer) eine Membran, die aber dem Protoplasma dichter anliegt, als das bei der Befruchtungsmembran oder der Fettsäuremembran gewöhnlich der Fall ist.

4. Durch diese Thatsachen ordnet sich auch der Vorgang der rein osmotischen Entwicklungserregung dem früher von mir geführten Nachweis unter, dass es sich bei der Befruchtung um zwei verschiedene Eingriffe handelt, von denen einer mit dem Membranbildungsprocess, der andere mit der Bildung bestimmter Producte durch die hypertonische Lösung zusammenhängt. (Siehe Einleitung.)

5. Die früheren Versuche über die Nothwendigkeit von freiem Sauerstoff und von Oxydationsprocessen im Ei für die Wirksamkeit der hypertonischen Lösung bei der Entwicklungserregung werden bestätigt. Das Wesen des Befruchtungsvorganges scheint danach wesentlich in einer Anregung oder Beschleunigung von Oxydationsprocessen zu liegen, welche die Voraussetzung für die Nucleinsynthese bilden, wie das bereits vor einem Jahre gezeigt wurde.

6. Mit diesen Versuchen sind als die wesentlichen Variablen für die osmotische Entwicklungserregung neben der Temperatur der Sauerstoffdruck, die Concentration der Hydroxylionen und der osmotische Druck hingestellt. Es gewinnt den Anschein, als ob damit die Möglichkeit einer quantitativen Behandlung des Gegenstandes im Sinne der theoretischen Chemie gegeben wäre.

---