

Sitzungsberichte
der
mathematisch-physikalischen Classe
der
k. b. Akademie der Wissenschaften
zu **München.**

Band XVII. Jahrgang 1887.



München.
Verlag der K. Akademie.
1888.

Commission bei G. Franz.

Ueber die Befruchtung des Neunaugeneies.

Von A. A. Böhm,
Assistenten am histiologischen Laboratorio zu München.

(Eingelaufen 8. Februar.)

Calberla¹⁾ ist der einzige gewesen, der die Reifeerscheinungen und den Befruchtungsvorgang bei *Petromyzon Planeri* auf Schnitten untersucht hatte. Er hat sich über den ganzen Process etwa folgende Vorstellung gemacht: Es bilden sich im Ovarium die Richtungskörper auf Kosten des Keimbläschens, der Rest desselben constituirt sich zu einem Eikern. Dieser Eikern rückt nun allmählig in die Tiefe des Eies und zieht einen Protoplasmastrang nach; seine definitive Lage ist ungefähr das Centrum des Eies. Ein solches Ei ist reif, und wird es besamt, so hebt sich die Eihaut zunächst am animalen Pole ab, es bleiben aber protoplasmatische Fäden stehen, die zwischen der animalen dotterarmen Eioberfläche und der inneren Oberfläche der Eihaut ausgespannt sind. Einer dieser Fäden, der axiale, ist der stärkste und verbindet den Anfang des oben erwähnten Protoplasmastranges (innere Mikropyle, Calberla) mit der eigentlichen Mikropyle der Eihaut (äussere Mikropyle, Calberla); derselbe ist das „Leitband des Spermas“, und jene Protoplasma-

1) „Der Befruchtungsvorgang beim Ei von *Petromyzon Planeri*. Ein Beitrag zur Kenntniss des Baues und der ersten Entwicklung des befruchteten Wirbelthiereies. 1877.“

strasse, die die Eioberfläche (innere Mikropyle) mit dem Eikerne verbindet, ist der Spermagang. Leitband des Spermas und der Spermagang bilden einen continuirlichen protoplasmatischen Weg, der den Eikern mit der äusseren Mikropyle verbindet. Dieser Weg wird von einem einzigen Spermatozoon benutzt; der Schwanz desselben wird abgeworfen und verstopft die äussere Mikropyle; der Kopf, zu einem Sperma-kerne geworden, vereinigt sich mit dem Eikerne, der an der nämlichen Stelle immer noch zu finden ist, zu einem Furchungskerne.

Der Befruchtungsvorgang wurde eingehend von Prof. C. Kupffer und B. Benecke in einer Abhandlung: „der Befruchtungsvorgang beim Ei von *Petromyzon Planeri*. Ein Beitrag zur Kenntniss des Baues und der ersten Entwicklung des befruchteten Wirbelthiereies“ geschildert, und sind in derselben unter vielen anderen folgende Punkte festgestellt worden, die für meinen, hier speziell zu verfolgenden Zweck von besonderer Wichtigkeit sind.

a) An einem fast reifen Ovarialei von *Petromyzon fluviatilis* ist an Schnitten an der Oberfläche desselben ein Keimbläschen zu sehen.

b) Am animalen Pole des Eies ist eine dünne Lage durchscheinenden Protoplasma's (Polplasma) gelegen, das bei der Befruchtung eine aktive Rolle spielt, indem es sehr auffallende Contractionerscheinungen zeigt.

c) Es dringt in das Polplasma nicht immer durch die Mikropyle und nicht durch den nicht constanten Axenstrang (Leitband des Sperma, Calberla) ein einziges bevorzugtes Spermatozoon mit Kopf und Schwanz ein.

d) Durch die Eihülle, im Bereiche des Polplasma, bohren sich aber noch zahlreiche andere Spermatozoen ein; ein Theil derselben bohrt sich ganz durch und quellen die Köpfe derselben, ganz oder zum Theil, zu hyalinen Tropfen, die an

der inneren Seite der Eihaut, im Bereiche des Polplasma zu finden sind.

e) Kurz nach dem Verschwinden des Axenstranges in den Dotter, erscheint ein zapfenförmiger, hyaliner Fortsatz an derselben Stelle wieder; er tritt in Contact mit der inneren Fläche der Eihaut, gleitet derselben entlang, dabei bleiben die eben erwähnten hyalinen Spermatropfen an dem Zapfen haften, um sich in demselben aufzulösen. Dieser Akt ist die Nachbefruchtung. Der Zapfen zieht sich zurück.

f) Vor der Befruchtung ist ein Richtungskörperchen bereits da; nach der Befruchtung wird ein zweites gebildet.

Aus diesen Daten hat Prof. Kupffer Schlüsse gezogen, die durch die vorliegende Untersuchung vollkommen bestätigt werden. α) Die Prämisse Calberlas, dass der Eikern bereits im Ovarium sich bilde, und dort eine Lage im Centrum des Eies einnehme, kann keine richtige sein, denn es bildet sich ein Richtungskörperchen nach der Befruchtung, also constituirt sich der Eikern erst nach der Befruchtung und nicht im Ovarium. β) Der Spermagang, das Leitband des Sperma etc. können nicht die ihnen von Calberla vindicirte Bedeutung haben.

Es ist eine abermalige Untersuchung an Schnitten eine wünschenswerthe geworden. Auf Anrathen meines Lehrers und Chefs Prof. C. Kupffer, unter seiner Aufsicht, unternahm ich diese.

Ich begann meine Untersuchungen an dem Ovarialeie von *Petromyzon Planeri*. Die jüngsten Ovarien, die mir zu Gebote standen, sind einem *Ammocoetes* von 5 cm Länge entnommen; das Kopfende dieses in der medianen Ebene liegenden unpaaren Ovariums wird durch einen kegelförmigen, asymmetrisch gelegenen, etwa $\frac{1}{4}$ mm messenden Fortsatz gebildet. In diesem Fortsatz entstehen die Eier: man trifft in ihm alle möglichen Entwicklungsstadien derselben. Das übrige grössere Stück des Ovariums enthält die ältesten Eier

die alle auf derselben Entwicklungsstufe stehen. Die grössten Eier dieses Ovariums sind $\frac{1}{12}$ mm gross und enthalten ein central gelegenes Keimbläschen; dieses besteht aus einer Membran, einem klaren granulirten Inhalt, einem chromatischen Netze und einem Keimfleck.

Während die Eier an Volumen zunehmen, wird das Keimbläschen grösser, dabei verändert es die centrale Lage, um sich allmählig der Oberfläche des Eies zu nähern; die chromatischen Netze verschwinden, und scheint der Keimfleck auf Kosten derselben sich zu vergrössern. Eier, die 0,5 mm gross sind, zeigen ein Keimbläschen, welches keine Chromatinnetze mehr enthält; es liegt nahe an der Oberfläche des Eies, ist aber von derselben durch eine dotterarme Schicht getrennt, die Calberla irrthümlich für die Anlage seines Spermaanges ansieht.

Die Eier der fast geschlechtsreifen Thiere (etwa $\frac{4}{5}$ mm im Durchmesser) enthalten ein ca. 0,1 mm messendes Keimbläschen mit einem sehr grossen Keimfleck; der letztere zeigt ein bemerkenswerthes Verhalten gegen Farbstoffe: er nimmt keine Chromatintinctionen mehr an.

Geschlechtsreife Thiere, die zum Theil Ovarialeier, zum Theil auch Eier in der Bauchhöhle enthielten, liessen verschiedene Stadien der flächenhaften Ausbreitung des Keimbläschens am animalen Pole des Eies erkennen. Die Keimbläschenmembran war nicht mehr zu sehen, und konnte man nur in seltenen Fällen auf Schnitten den Keimfleck als ein sehr blasses, kaum von der Umgebung zu unterscheidendes Gebilde, mit Mühe erkennen.

In noch weiter entwickelten abgelegten, nicht besaamten Eiern, hat sich das Keimbläschen noch weiter ausgebreitet und stellt nun eine hyaline dünne Scheibe am animalen Pole des Eies dar — das Polplasma —, die im Durchmesser etwa $\frac{1}{3}$ mm messen mag. (Der Diameter des entsprechenden Eies beträgt ca. 1 mm.) Trotz aller angewandten Mühe

gelang es mir nicht, in diesem Stadium den Keimfleck, resp. Reste desselben noch zu finden — vielleicht weil er zu blass geworden ist; das Schwinden desselben ist nicht direkt ausgeschlossen.

Das weitere Material stammt aus Neapel her, ist den künstlich besaamten Eiern von *Petromyzon Planeri* entnommen, die 0, 5, 10, 15, 30, 45 Minuten, dann 1, 1,5, 2, 3, 4 8 Stunden nach der Besaamung in getrennten Portionen und zwar in der Flemming'schen Flüssigkeit mit etwas grösserem Ueberosmiumsäure-Gehalt fixirt waren.

Nach einer halben Stunde wurden die mit destilliertem Wasser gewaschenen Eier successive in 30, 70 procentigem Spiritus auf je drei Stunden übertragen, um in 90% Spiritus conservirt zu werden. Die Eier wurden einzeln in Paraffin eingebettet, mit einem Jung'schen Microtom geschnitten; die auf dem Objektträger mit Eiweiss befestigten Schnitte färbte ich entweder mit Saffranin oder, mit dem besten Erfolg, mit violette de fuchsine (1 gr Farbstoff auf 100 ccm 30% Spiritus; Auswaschen in abs. alc.). Nicht ganz so günstige Präparate lieferten die vor dem Schneiden in toto mit Borax-Carmin gefärbten Eier. Die fixirten Schnitte wurden definitiv in Xylol-Canadabalsam eingeschlossen; in schwierigen Fällen wurde jedoch das Untersuchen der Präparate in anderen Medien — Wasser, Glycerin — nicht unterlassen.

Die mit 0 Minuten (unmittelbar nach der Besaamung) bezeichnete Portion enthält Eier im Stadium des sich zurückziehenden Axenstranges. Ausser dem bereits am frischen Ei sichtbaren Stücke ist ein Theil des Polplasma unter dem Niveau der Eioberfläche enthalten. Die Dottermembran (membrane de fécondation, Fol) ist bereits um das ganze Ei gebildet; am Axenstrang selbst ist sie jedoch nicht nachzuweisen; ausser dieser sieht man eine zweite gefaltete Membran, die das Polplasma gegen den übrigen Dotter abschliesst.

Im Polplasma findet man, inconstant gelegen, ein kernartiges Gebilde, den Eikern, vor dem Austreten des zweiten Richtungskörperchens; dieser provisorische Eikern ist etwa halb so gross, wie der zuletzt beobachtete Keimfleck, hat ein homogenes Aussehen und nimmt nur schlecht Kernfunctionen an.

Neben ihm, im Polplasma, findet man einen stabförmigen Körper, der nichts anderes sein kann, als der Spermakopf; von einem Mittelstück oder Schwanz habe ich nichts mit Sicherheit wahrnehmen können.

Einige Minuten später (5 Minuten nach der Besaamung) treffen wir das Stadium des sich zurückziehenden Zapfens an. Dieser pflegt sich stärker zu färben, welcher Umstand von den darin gelösten Spermatheilen abhängt. Die Hauptmasse des Polplasma bildet annähernd eine Kugel, die unmittelbar unter der Oberfläche des Eies liegt und mit derselben eine gemeinsame Fläche besitzt, von ca. 0,1 mm Durchmesser. In ihr ist der provisorische Eikern von der Beschaffenheit, wie im vorhergehenden Stadium und ein Spermakopf zu sehen. Dieser letztere hat eine Rosenkranzform angenommen; die Anzahl der Anschwellungen lässt sich jedoch noch nicht feststellen. Das Polplasma ist durch die dicker gewordene, gefaltete Membran von dem übrigen Dotter getrennt.

Zehn Minuten nach dem Besaamen etwa bildet sich das zweite Richtungskörperchen. Die Bildung desselben muss sehr rasch vor sich gehen, denn in derselben (10 Minuten nach dem Besaamen gehärteten) Portion habe ich die verschiedensten Stadien der sich bildenden, neben bereits gebildeten Richtungskörperchen angetroffen.

Es kommt auch in unserem Falle zur Bildung einer Spindel, die aber in Folge der Behandlung mit einer überosmiumsäurehaltigen Flüssigkeit (Flemming'sche Lösung) nicht leicht auf Schnitten darzustellen ist: es ist nämlich bekannt, dass die oberflächlichen Stellen der so gehärteten Stücke an

schwärzesten sind und sich schlecht färben lassen. Die Hälfte der Spindel wandelt sich in einen definitiven Eikern um, der dicht unter der Abschnürungsstelle des Richtungkörpers im Polplasma zu liegen kommt. Das zweite Richtungkörperchen besteht aus derselben Substanz wie das Polplasma, enthält einen Kern (die umgewandelte halbe Spindel) und besitzt eine Membran, die abgeschnürte Dotter-Befruchtungs-Membran. Das erste, vor der Imprägnation ausgetretene Richtungkörperchen, wird wahrscheinlich keine Membran aufweisen. Spermakopf und gefaltete Membran sind unverändert geblieben.

Der eben gebildete Eikern ist klein, homogen und chromatinarm. Er rückt von der Peripherie des Eies im Polplasma langsam ab und verbleibt dabei ziemlich in der Axe des Eies. In fast derselben Entfernung von der Eioberfläche, in der Nähe der gefalteten Membran aber, trifft man den Spermatozoonkopf an. Dieser zerfällt in den nächsten $\frac{3}{4}$ Stunden in 4 bis 5 kuglige sich anfänglich stark färbende Stücke — Spermatomeriten — und umgibt sich mit einer Strahlenfigur. Das Polplasma, in dem sich die Vorgänge abspielen, ist während dessen etwas tiefer in das Ei hineingerückt, es berührt nur noch in geringer Ausdehnung die Eioberfläche am Pol, rundet sich in seiner Begrenzung ab, während die gefaltete Membran dieser Gestaltänderung folgt.

Eine Stunde nach dem Besaamen fixirte Eier weisen das Polplasma auf als eine Kugel von der Grösse des Keimbläschens an reifen Ovarialeiern, d. h. von ca. 0,1 mm Durchmesser, die mit der Eioberfläche durch einen sehr kurzen Strang des Plasma verbunden ist. Annähernd im Centrum derselben, in der Nähe der Axe, treffen wir den nun mit allen Attributen eines Kernes versehenen Eikern und die Spermatomeritenreihe an. Die Axe des etwas länglichen Eikernes und die Spermatomeritenreihe liegen in einer Geraden, die senkrecht auf der Axe des Eies steht. Die dem Eikerne näher gelegenen Spermatomeriten sind grösser und

chromatinärmer geworden; das am weitesten liegende ist noch klein und chromatinreich (unverändert). Um die Spermatomeriten ist eine Strahlung vorhanden, die auf der Seite des Eikernes fehlt.

Eine halbe Stunde später bemerkt man in noch tiefer gerücktem Polplasma (der Verbindungsstrang mit der Eioberfläche ist länger und dünn geworden) nahezu in der Eiaxe gelegen ein Gebilde, welches aus zwei dicht aneinanderliegenden Abtheilungen zusammengesetzt ist. Die eine, mit einer Strahlung umgebene, besteht aus 4 bis 5 Kugeln, die wir sofort als etwas grösser gewordene Spermatomeriten wieder erkennen; die andere besteht aus kleineren, stärker tingirten, zahlreicheren kugeligen Stücken, die wir Karyomeriten nennen wollen, da sie unzweifelhaft aus dem Eikern hervorgegangen sind. Die gefaltete Membran ist etwas dünner geworden, ihre Conturen sind nicht mehr scharf; eine Stunde später ist sie nicht mehr nachzuweisen.

Von da ab lässt sich der Vorgang summarisch behandeln. Das Polplasma rückt immer tiefer ein, nimmt an Volumen nicht zu und wird in der Richtung der Eiaxe etwas abgeplattet. Eine schmale Verbindung mit der Eioberfläche persistirt. In dem Polplasma, in der Axe des Eies, trifft man zuerst ein eigenthümliches Gebilde an — den provisorischen Furchungskern. Es ist länglich, seine Axe steht senkrecht auf der des Eies, besteht aus zwei leicht zu unterscheidenden Gruppen: einer chromatinärmeren (Spermatomeriten) mit einer Strahlung umgebenen und einer chromatinreicheren (Karyomeriten).

Die Anzahl der Meriten wird immer grösser. Die Meriten vermehren sich wahrscheinlich durch Theilung. Es bleiben jedoch die Spermatomeriten immer grösser wie die Karyomeriten desselben provisorischen Furchungskernes. Die Anzahl der ersteren ist stets eine kleinere, wie die der Karyomeriten; so zähle ich 1,5 Stunden, nach der Besamung

5 Spermatomeriten und etwa 20 Karyomeriten; 2 Stunden nach der Besaamung schätze ich die Anzahl der Spermatomeriten auf 12, die der Karyomeriten auf 60; 1 Stunde später kommen auf ca. 50 Spermatomeriten ein paar hundert Karyomeriten.

Ein Merit besteht aus einer wenig chromatinhaltigen Kugel, dem Körper, welche ein Chromatinkorn, Mikrosoma, enthält. Die Spermatomeriten enthalten im Allgemeinen weniger Chromatin, wie die Karyomeriten. Die Körner (Mikrosomen) verhalten sich aber gleich.

4 Stunden nach der Besaamung finden wir den definitiven Furchungskern von einer ellipsoidischen Gestalt, membranlos, wenig gefärbt und in ihm stark gefärbte Chromatinkörner: die Mikrosomen. Der definitive Furchungskern bildet sich dadurch, dass die Körper der Spermato- und Karyomeriten des provisorischen Furchungskernes miteinander verschmelzen und die Mikrosomen dabei frei werden. Aus diesen letzteren baut sich nun der chromatische Antheil der karyokinetischen Figur auf, deren Bildung dem Einschneiden der ersten meridionalen Furche vorangeht.

Die Befunde, die vorläufig als spezifische für das Petromyzonei angesehen werden dürfen, lauten wie folgt:

1. Die Substanz des Keimbläschens verbreitet sich an der Oberfläche des Eies, am animalen Pol desselben, um das Polplasma zu bilden.

2. Während der Imprägnation, Hand in Hand mit der Bildung der Dottermembran, umgiebt sich das Polplasma mit einer neuen, dicken gefalteten Membran; sie scheint eine wesentliche Rolle zu spielen, indem sie den Copulationsact auf einen geringen Raum concentrirt. Sie schwindet nach der geschehenen Copulation.

3. Das Polplasma mit den die Befruchtung bewerkstellenden Elementen, rückt in die Tiefe des Eies, wobei ein dünner protoplasmatischer Strang die Hauptmasse des

Polplasma mit der Oberfläche des Eies verbindet. Dieser Verbindungsstrang liegt in der Axe des Eies und kommt in die Ebene der später einschneidenden, ersten Meridionalfurche zu liegen.

4. Die Befruchtung wird dadurch eingeleitet, dass zuerst der männliche und dann der weibliche Vorkern in Stücke zerfallen, die man mit den Namen *Spermato-* resp. *Karyomeriten* belegen kann.

5. Eine Zeit lang kann man die *Spermato-* resp. *Karyomeriten* mikrochemisch bequem voneinander unterscheiden.

6. Die *Meriten* mengen sich zunächst nicht miteinander, sondern bilden zwei eng anliegende Gruppen (*provisorischer Furchungskern*). Die Trennungsebene der genannten Gruppen fällt mit einer meridionalen Ebene des Eies zusammen.

7. Ein *Merit* besteht aus einem chromatinarmen Körper und einem chromatinreichen Korn, dem *Mikrosom*.

8. Der definitive Furchungskern entsteht dadurch, dass die Körper der *Karyo-* und *Spermatomeriten* zu einer gleichartigen Masse verschmelzen, in welcher die *Mikrosomen*, die man nun nicht mehr ihrer Abkunft nach auseinander halten kann, zu liegen kommen.

9. Aus diesen *Mikrosomen* baut sich der chromatische Antheil der karyokinetischen Figur auf.
