

Sitzungsberichte

der

mathematisch - physikalischen Classe

der

k. b. Akademie der Wissenschaften

zu München.

1882. Heft IV.

München.

Akademische Buchdruckerei von F. Straub.

1882.

In Commission bei G. Franz.

Herr C. Kupffer spricht:

„Ueber aktive Betheiligung des Dotters
am Befruchtungsakte bei *Bufo variabilis* und *vulgaris*.“

An dem Ei der Neunaugen beobachtete zuerst August Müller¹⁾ die Erscheinung, dass, nach dem Contact mit dem Sperma und nach eingeleiteter Zurückziehung des Dotters von dem stärker gewölbten Segmente der Eihaut am aktiven Pole, sich eine klare Masse „wie der am Horizonte aufgehende Mond“ aus dem Dotter erhebe, kugelig aufstrebe und dann sich wieder senke, um entweder ganz im Dotter zu verschwinden, oder eine Zeit lang noch in Zapfenform äusserlich sichtbar zu bleiben. Das Erscheinen dieser Kugel erfolge, sagt A. Müller, etwa 5 Minuten nach der Berührung von Sperma und Ei und erreiche in einigen Minuten die grösste Höhe. Die Stelle, an der dieses Auf- und Niedergehn sich zutrage, bleibe noch eine Zeit lang als dunkler Punkt durch die Loupe bemerkbar. A. Müller hat diese Erscheinung nicht näher geprüft, insbesondere nicht ihre Beziehungen zum Sperma erkannt. Er war auch der Ueberzeugung, dass gar keine Zoospermien die Eihaut durchbohrten.

1) Beobachtungen über die Befruchtungserscheinungen im Ei der Neunaugen. Königsberg 1864.

Ernst Calberla²⁾, der später gleichfalls die Befruchtung des Neunaugeneies studierte, und Müllers Mittheilungen dahin ergänzte, dass der Kopf eines Zoosperms in den Dotter gelange, bringt nichts hinzu, was zur Beurtheilung des Vordringens jener hellen Masse dienen könnte. Er leitet das Hervortreten derselben, die er Dottertropfen nennt, von momentanen Contractionen im Innern des Eies her. Diese Contractionen fänden statt, nachdem der vom Schwanz getrennte Kopf eines Zoosperms in den Dotter gelangt sei und liessen nach, sobald die — zwar nicht beobachtete, aber nach Oscar Hertwigs Entdeckung auch hier vorauszusetzende — Conjugation des Eikerns mit dem Kopfe des Zoosperms (Spermakern) sich vollzogen hätte. Das Hervortreten des „Dottertropfens“ wäre darnach ein passives, die Masse würde hervorgepresst werden.

Dabei will aber Calberla äusserlich an dem Ei gar keine Contractionerscheinungen wahrgenommen haben, die doch in auffälliger Weise stattfinden.

Benecke und ich wiederholten diese Beobachtungen an Eiern sowohl des grossen, wie des kleinen Flussneunauges bei künstlicher Befruchtung und gaben auf Grund eines sehr reichhaltigen Materials folgende Darstellung des Befruchtungsvorganges in seinen einzelnen Phasen:³⁾

Die Zoospermien nähern sich dem Ei nur am spitzeren Pole, der ein stärker gewölbtes, uhrglasförmiges Segment der Eihaut zeigt. Sobald die Zoospermien in den Bereich einer aus hyaliner Substanz bestehenden Kuppel gelangt sind, die dem uhrglasförmigen Segmente äusserlich aufsitzt, stellen sie sich radiär zur Eihaut. Eines derselben dringt durch die Eihaut hindurch, die übrigen bohren lebhaft gegen die

2) Der Befruchtungsvorgang beim Ei von *Petromyzon Planeri*. Leipzig 1877.

3) Der Vorgang der Befruchtung am Ei der Neunaugen. Königsberg 1878.

Oberfläche, gelangen aber nicht in das Innere. Schon während der Annäherung der Zoospermien beginnt der Dotter, der durchweg der Eihaut enge anliegt, sich im Bereiche des Uhrglases von letzterer zurückzuziehen, also bevor noch das penetrirende Zoosperm mit dem Dotter in Contact gekommen ist. In dieser Region des Eies enthält der im Uebrigen undurchsichtige Dotter eine oberflächliche dünne Schicht durchsichtigen Protoplasma's, das bei der Retraction in Fäden ausgezogen wird, die mit ihren äussern Enden an der Eihaut haften und im weiteren Fortgange der Retraction durchreissen. In der Regel dehnt sich ein besonders dicker Strang in der Axe des Eies, auf den bereits Müller und Calberla aufmerksam gemacht hatten. Der letztere schrieb diesem Strange die Bedeutung zu, den angeblich vom Schwanze sich trennenden Kopf des penetrirenden Zoosperms in den Dotter hinein zu befördern und nannte den Strang „Leitband des Sperma.“ — Wir fanden, dass das penetrirende Zoosperm an jeder Stelle des stärker gewölbten Segmentes der Eihaut seinen Weg nehmen könne und daher nur bisweilen auf jenen sich retrahirenden Axenstrang des hellen Protoplasma's trifft, dem also die ihm von Calberla vindicirte Bedeutung nicht zukommt. Dieses penetrirende Zoosperm stellt die Bewegungen ein, sobald der Kopf in die Eihaut eingedrungen ist; steif gestreckt wird es angezogen und dabei wird der Kopf etwa um ein Drittel seiner bisherigen Länge gedehnt. Es verschwindet im sich retrahirenden Dotter mit Kopf und Schwanz, nie bleibt äusserlich in dem bei der Retraction des Dotters am aktiven Pole entstandenen freien Raume etwas von dem Zoosperm sichtbar.

Nachdem das penetrirende Zoosperm im Dotter verschwunden ist, die Dehnungsfäden des hellen Protoplasma durchrissen worden sind und mit Ausnahme schwacher Reste, die an der Innenfläche der Eihaut haften blieben, gleichfalls in das Innere sich zurückgezogen haben, beginnt ein neuer

Akt. Derselbe leitet sich am Ende der zweiten oder Anfange der dritten Minute nach dem Contacte der Geschlechtsprodukte ein: Aus dem Centrum der ebenen Endfläche des retrahirten Dotters, da, wo eben die Substanz des dicksten Dehnungsfadens, des Axenstranges, verschwunden war, hebt sich eine Masse klaren Protoplasma's aus dem dunklen Dotter hervor. Zuerst halbkugelig auftauchend, streckt sich die Masse in Form eines cylindrischen Zapfens durch den freien Raum und erreicht allmählig aufstrebend die Eihaut. Bei diesen Strecken verdünnt sich die Basis stielartig und das freie Ende schwillt an. Das Aufstreben des Zapfens dauert 2—3 Minuten, die Berührung desselben mit der Eihaut fällt also in die 5. bis 6. Minute von dem Momente der Vereinigung vom Sperma und Eiern an gerechnet. An der Innenfläche der Eihaut befinden sich wasserklare Bläschen, von denen jedes ein kleines glänzendes Körnchen an seiner Peripherie enthält. Diese Bläschen stammen jedenfalls zum Theil von Zoospermien her, die nicht vollständig eindringen. Bei keinem Ei fehlen solche. Unter lebhafter Thätigkeit der Geissel bohren sich die Köpfe eine Strecke weit in die Eihaut hinein; dabei sieht man an den Köpfen amöboide Bewegungen auftreten. Wellen erheben sich am hinteren Ende des Kopfes, laufen bis an die Spitze, ballen sich kugelig zusammen, weichen zurück, um in erneutem Anlaufe abermals vorzudringen. Ist der Kopf bis in die Nähe der inneren Oberfläche der Eihaut gelangt, so sendet derselbe einen feinen Faden pseudopodienartig vor, der den Rest der Strecke durchsetzt. Das in den Eiraum gelangende Ende verdickt sich knopfförmig und löst sich als helles Bläschen ab. So kann ein Theil der Substanz des Kopfes in das Innere gelangen, während die Hauptportion stecken bleibt. Mit solchen Bläschen verbindet sich der Zapfen hellen Protoplasma's. Derselbe leckt gleichsam die Innenfläche der Eihaut ab. Kommt derselbe

in die Nähe eines solchen Bläschens, so fliesst dasselbe im Momente der Berührung mit der Substanz des Zapfens zusammen oder der Zapfen nimmt es amöbeartig durch Umfliessen in sich auf, man sieht es dann noch eine Zeit lang darin, dann verschwindet es plötzlich. Darauf zieht sich der Zapfen zurück. Der Rückzug dauert länger, als das Hervortreten, 3—5 Minuten lang. In 10—12 Minuten ist die ganze Reihe von Vorgängen abgelaufen, aber der reguläre Gang zeigt sich nur dann, wenn man die Beobachtung nicht bei höherer Temperatur vornimmt, als derjenigen, bei welcher die Thiere unter natürlichen Verhältnissen laichen. Bei irgend höherer Temperatur treten sofort Unregelmässigkeiten ein.

Zwei Mal beobachteten wir, dass der Zapfen Zoospermien mitnahm, die ausser dem penetrirenden Zoosperm bis in den Eiraum gelangt waren. Das eine Mal wurden zwei Zoospermien erfasst; ein Zoosperm war mit dem Kopfe durch die Eihaut gedrungen, der Schwanz stack fest in derselben, der Zapfen erreichte den Kopf, trennte denselben von dem Schwanze, und führte den Kopf mit sich. Darauf änderte sich die Richtung des Zapfens etwas, derselbe näherte sich einem zweiten Zoosperm, das vollständig in den Eiraum gelangt war, dort aber regungslos lag, berührte dasselbe und nahm es ebenfalls mit sich.

Den Eindruck, den wir von diesem Phänomen erhielten, war der, dass dem Zapfen eine aktive ergänzende Rolle bei der Befruchtung zukomme.

Ich habe diese am Neunaugen-Ei bei der Befruchtung sich abspielenden Vorgänge hier nochmals berührt, weil ich der Ansicht bin, dass die gleich zu beschreibenden Erscheinungen, die die Eier von Kröten zeigen, mit jenen in Parallele zu stellen sind.

Die erste hieher gehörige Beobachtung wurde in Königsberg gemacht. Ein Pärchen von *Bufo variabilis* Pallas

wurde am 7. Mai in Copulation angetroffen. Es gelang Herrn Prof. Benecke, den Moment zu erfassen, wo das Laichen begann. Als etwa 8—10 Eier in einzeliger Schnur hervorgetreten waren, wurde der Strang hart an der Kloake mit der Scheere abgeschnitten, rasch in drei Portionen getheilt, die, in bereit gehaltene muldenförmig ausgeschliffene Objectträger mit etwas Wasser gebracht, mit Deckgläschen gedeckt, gleichzeitig unter drei Mikroskope gelangten. Die Beobachter waren Prof. Benecke, mein Assistent Herr Böhm und ich. Es mochte etwa eine halbe Minute zwischen der Entleerung des Sperma von Seiten des Männchens und dem Beginne der Beobachtung verflossen sein. Das Eiweiss war im Aufquellen begriffen, concentrisch geschichtet, die äussere Schicht bereits klar und gequollen, die inneren Schichten quollen erst während der Beobachtung langsam auf. Zoospermien fanden sich theils im Wasser, theils in der äusseren aufgequollenen Schicht. Im Wasser schlängelten sie sich lebhaft, durch die Eiweisschicht aber glitten sie ruhig hin, oft ohne sichtbare Bewegung des Schwanzes, indem sie sich langsam um ihre Axe drehten. Die Mehrzahl hielt die radiäre Richtung gegen den Dotter ein, einige beschrieben aber eine elliptische Bahn durch die äusseren Eiweisschichten und gelangten wieder ins Wasser, wo sie lebhaft weiter schwammen. Das anfänglich noch rasche Vordringen der Zoospermien verlangsamte sich in den inneren noch nicht gequollenen Eiweisschichten ausserordentlich, aber eine beträchtliche Anzahl derselben gelangte an die den Dotter umgebende Eihaut (Dotterhaut) in der Ebene des eben vorliegenden grössten Kreises der Kugel. Darauf lässt sich ein verschiedenes Verhalten beobachten: ein Theil der Zoospermien dringt unaufhaltsam, wenn auch langsam, mit Kopf und Schwanz durch die Membran und verschwindet vollständig im Dotter. Indem die Spitze des Kopfes an der Innenfläche der Membran sichtbar wird, tritt der Dotter

an ganz begrenzter Stelle ein wenig zurück, aber das gleicht sich bald aus und die Perforationsstelle ist später nicht mehr kenntlich. Von dem Momente, wo die Spitze des Kopfes den Dotter berührt, bis zum vollständigen Verschwinden des Schwanzes vergehen $1-1\frac{1}{2}$ Minuten. Einem anderen Theile gelingt das Eindringen erst nach langer Arbeit von 3—4 Minuten; dabei steht der Kopf unbewegt, während über den Schwanz fortwährend niedrige stehende Wellen hinlaufen, die gewöhnlich nicht bis zur äussersten Spitze des Schwanzes reichen. Einer dritten Portion endlich gelingt das Perforiren der Membran durchaus nicht, sie bleiben mit verbogenem Kopfe daran stehen oder legen sich tangential zur Membran, oder aber sie setzen die Bohrarbeit ohne sichtbaren Effekt fort, bis ein Phänomen am Dotter sich zeigt, von dem gleich die Rede sein soll. — Wie viele überhaupt vollständig eindringen, ist nicht zu bestimmen. An ein und demselben Kreissegment, das bei der Combination von Obj. IV Ocul. 4 Hartnack im Gesichtsfelde zu übersehen war, konnten 4—5 Zoospermien gezählt werden, die sicherlich vollständig in den Dotter gelangten; dabei schien keine Stelle des Eies bevorzugt zu sein, denn bewegte man den Objectträger, nachdem das Perforiren begonnen hatte, so konnte man das Eindringen an verschiedenen Punkten der gesammten Peripherie wahrnehmen. —

Etwa 15 Minuten nach dem Herrichten der Objecte und nachdem das Eindringen der Zoospermien bereits seit mehreren Minuten aufgehört hatte, sah man an der im Gesichtsfelde vorliegenden Peripherie des Dotters kleine Hügel sich erheben, die die Eihaut knopfförmig vortrieben. Diese Hügel bestanden an ihrer Basis aus völlig undurchsichtigem Dotter, hatten aber am Scheitel eine Schicht hellen Protoplasmas, das keine Dotterkörnchen enthielt. Ueberall nun, wo solch ein Knopf auftrat, erblickte man 1—2 Zoospermien mit dem Kopfe gegen die

ihaut gerichtet. (Siehe die Figur.) Die Köpfe erhoben sich allmählig, bis die Eihaut, die sie vor sich her



schoben, an dieser Stelle so gespannt war, dass man dieselbe an dem Scheitel des Knopfes nicht mehr unterscheiden konnte; es hatte den Anschein, als wenn dieselbe sehr verdünnt worden wäre. Nachdem diese Prominenzen 1—2 Minuten lang auf gleicher Höhe verharrt hatten, sanken sie eben so langsam wieder zurück. Sobald dieser Rückgang sich einleitete, fielen die betreffenden Zoospermien von der Eihaut ab und blieben nun regungslos liegen.

Alle drei Beobachter sahen an mehreren Eiern dasselbe und es gelang wiederholt die ganze Reihe der Erscheinungen, von dem Eindringen der ersten Zoospermien in die aufquellenden äusseren Eiweisslagen an, bis zum Zurücksinken der Dotter-Prominenzen zu verfolgen, da das Pärchen in dem Laichgeschäfte fortfuhr, die lange Eierschnur langsam hervortrat und noch 2 Mal soeben vom Sperma überströmte Abschnitte der Schnur hart an der Kloake gewonnen werden konnten.

Wir haben damals gezögert, diese Beobachtungen zu publiciren, in der Erwartung, auch an Frosch-

eiern das Gleiche anzutreffen, aber die Gelegenheit hierzu bot sich nicht dar. — In diesem Frühjahr erlangte ich hier in München mehrere kopulirende Paare der im März laichenden Kröte, *Bufo vulgaris Laurenti*. Der Beginn des Laichens erfolgte unter Umständen wie in Königsberg, man war in der Lage, gleich die ersten hervortretenden Eier abtrennen und ohne Verzug unter das bereit gehaltene Mikroskop bringen zu können. Die Phänomene waren dieselben, wie sie oben geschildert worden sind. Herr Böhm, der mich von Königsberg nach München begleitet hat, war, wie ich, in der Lage, die Uebereinstimmung der Erscheinungen konstatiren zu können. Zahlreiche Zoospermien drangen in den Dotter ein, andere erlahmten während des Durchdringens der Eiweisschichten, ein dritter Theil gelangte zwar bis zur Eihaut, fand aber an derselben einen unüberwindlichen Widerstand und diesen Zoospermien kamen die Prominenzen des Dotters entgegen. Das Vordringen und Abwärtssinken der letzteren fand ebenso, wie an den Eiern der ersten Krötenart statt. An diesen Eiern von *Bufo vulgaris* erschien die erste Furche $1\frac{1}{2}$ —2 Stunden nach dem Contacte mit dem Sperma, an den in Königsberg beobachteten Eiern von *Bufo variabilis* viel später, in der fünften Stunde nach jenem Zeitpunkte.

Die Analogie der Erscheinungen bei den Eiern der Kröten und Neunaugen ist, meiner Ansicht nach, unverkennbar. In beiden Fällen zeigt sich die gleiche Aufeinanderfolge: zuerst die Imprägnation des Dotters durch Sperma, beim Ei der Kröte sind es mehrere Zoospermien, beim Neunaugenei ein einziges, die vollständig eindringen. Dann wird der Dotter aktiv und strebt den Zoospermien entgegen, die die Eihaut nicht zu perforiren vermochten, aber noch lebhaftere Aktion zeigen. Da an dem Neunaugenei nur der aktive Pol von Zoospermien erreicht wird, so sendet der Dotter nur einen Zapfen aus, der in Wechselbeziehung mit den Zoospermien tritt. An

das Ei der Kröte gelangen Zoospermien allseitig und sekundäre Prominenzen des Dotters zeigen sich an der ganzen Oberfläche. Am Ei der Neunaugen ist der ganze Zapfen von hyalinem Protoplasma gebildet, am Ei der Kröte ist mindestens die Kuppe der hervortretenden Knöpfe klar und frei von Dotterkörnchen. In beiden Fällen findet ein sekundärer Befruchtungsakt statt, nachdem ein Zoosperm, resp. mehrere in den Dotter gelangt sind und dieser sekundäre Akt beruht auf einer entgegenkommenden Thätigkeit des Dotters.

Nachdem meine diesjährigen Beobachtungen diese auffallenden Thatsachen zweifellos sicher gestellt hatten, zögere ich nicht länger, dieselben mitzutheilen, um die Aufmerksamkeit darauf zu lenken.

Welcher Art die Wechselwirkung war, die an den Eiern der Kröte zwischen den Prominenzen des Dotters und den noch aktiven, aber erfolglos arbeitenden Zoospermien sich vollzog, konnte nicht ermittelt werden, das grosse Objekt liess die Anwendung starker Systeme nicht zu, es konnte also nicht festgestellt werden, ob Substanzpartikel der Zoospermien von den Hervorragungen aufgenommen wurden, nur das Eine liess sich bestimmen, dass die, bei erhaltener Eihaut, grösstmögliche Annäherung zwischen Dotter und Zoospermien erfolgte, indem die circa 2 μ dicke Eihaut am Scheitel der Knöpfe derart verdünnt wurde, dass man sie nicht mehr sah, das Hinderniss also, das sich hier dem Contacte von Sperma und Dotter entgegenstellte, beträchtlich verringert wurde und zwar durch die Thätigkeit des anderen Faktors, des Dotters.

Immerhin kann dem Phänomene keine andere Bedeutung zukommen, als die, nachträglich Spermasubstanz dem Dotter einzuverleiben.

Die Eierschnüre, denen die zur Beobachtung dienenden

Portionen entnommen waren, entwickelten sich in normaler Weise.

Ob das Eindringen derjenigen Zoospermien, die total in den Dotter gelangten, sich nur auf die aktive Hälfte des Eies beschränkte, liess sich bei der gleichmässigen Pigmentirung der gesammten Oberfläche des Dotters nicht feststellen. Wäre es der Fall, so würde sich diese Region jedenfalls bis zum Aequator des Eies erstrecken, da das Eindringen mehrmals an der gesammten Peripherie eines grössten Kreises gesehen wurde.

Erklärung der Abbildung.

Die Abbildung stellt ein Kreissegment des Eies von *Bufo vulgaris* Laurenti bei etwa 100facher Vergrösserung dar. Drei Prominenzen des Dotters erheben die Eihaut an Stellen, wo äusserlich derselben Zoospermien anhaften.
