

ISSN 0073-8417

PUBLIKATIONEN ZU WISSENSCHAFTLICHEN FILMEN

SEKTION
BIOLOGIE

SERIE 12 · NUMMER 23 · 1979

FILM C 1187

**Entwicklung beim Seeigel
(*Psammechinus miliaris*)
I. Befruchtung und Furchung**



INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM · GÖTTINGEN

Angaben zum Film:

Tonfilm (Komm., deutsch od. engl.), 16 mm, farbig, 114 m, 10¹/₂ min (24 B/s). Hergestellt 1973–75, veröffentlicht 1976.

Der Film ist für die Verwendung im Hochschulunterricht bestimmt.

Veröffentlichung aus der Biologischen Anstalt Helgoland, Dr. G. UHLIG, und dem Institut für den Wissenschaftlichen Film, Göttingen, Dr. H.-K. GALLE; Kamera: H.-H. HEUNERT; Schnitt: H.-H. HEUNERT und B. MILTHALER; Trickherstellung: H. G. GRASKE.

Zitierform:

UHLIG, G., und INST. WISS. FILM: Entwicklung beim Seeigel (*Psammechinus miliaris*) – I. Befruchtung und Furchung. Film C 1187 des IWF, Göttingen 1976. Publikation von G. UHLIG, Publ. Wiss. Film., Sekt. Biol., Ser. 12, Nr. 23/C 1187 (1979), 19S.

Anschrift des Verfassers der Publikation:

Dr. G. UHLIG, Biologische Anstalt Helgoland, Meeresstation, D-2192 Helgoland.

PUBLIKATIONEN ZU WISSENSCHAFTLICHEN FILMEN

Sektion BIOLOGIE

Sektion PSYCHOLOGIE · PÄDAGOGIK

Sektion ETHNOLOGIE

Sektion TECHNISCHE WISSENSCHAFTEN

Sektion MEDIZIN

NATURWISSENSCHAFTEN

Sektion GESCHICHTE · PUBLIZISTIK

Herausgeber: H.-K. GALLE · Schriftleitung: E. BETZ, I. SIMON

PUBLIKATIONEN ZU WISSENSCHAFTLICHEN FILMEN sind die schriftlichen Ergänzungen zu den Filmen des Instituts für den Wissenschaftlichen Film und der Encyclopaedia Cinematographica. Sie enthalten jeweils eine Einführung in das im Film behandelte Thema und die Begleitumstände des Films sowie eine genaue Beschreibung des Filminhalts. Film und Publikation zusammen stellen die wissenschaftliche Veröffentlichung dar.

PUBLIKATIONEN ZU WISSENSCHAFTLICHEN FILMEN werden in deutscher, englischer oder französischer Sprache herausgegeben. Sie erscheinen als Einzelhefte, die in den fachlichen Sektionen zu Serien zusammengefaßt und im Abonnement bezogen werden können. Jede Serie besteht aus mehreren Lieferungen.

Bestellungen und Anfragen an: Institut für den Wissenschaftlichen Film
Nonnenstieg 72 · D-3400 Göttingen
Tel. (05 51) 2 10 34

FILME FÜR FORSCHUNG UND HOCHSCHULUNTERRICHT

GOTRAM UHLIG, Biologische Anstalt Helgoland, und
INSTITUT FÜR DEN WISSENSCHAFTLICHEN FILM, Göttingen:

Film C 1187

**Entwicklung beim Seeigel (*Psammechinus miliaris* – I. Befruchtung
und Furchung**

Verfasser der Publikation: GOTRAM UHLIG

Mit 7 Abbildungen

Inhalt des Films:

Entwicklung beim Seeigel (*Psammechinus miliaris*) – I. Befruchtung und Furchung. Als Einleitung werden die Geschlechtsprodukte vom Strandseeigel *Psammechinus miliaris* dargestellt und morphologisch erläutert. Im Interferenzkontrastverfahren ist das Eindringen eines Spermiums in das reife Ei zu erkennen, das unmittelbar darauf mit der Abhebung der Befruchtungsmembran reagiert. Erstmals konnte mit diesem Verfahren auch die Wanderung der Pronuclei und deren Verschmelzung demonstriert werden. Der für die Echinodermen typische Verlauf der ersten Furchungsteilungen bis zur Morula wird in verschiedenen Einstellungen sowohl am lebenden Objekt, als auch in Phasentrickdarstellung eingehend erläutert. Die letztlich bewimperte Blastula rotiert innerhalb der Befruchtungsmembran und geht nach deren Sprengung zur planktischen Lebensweise über.

Summary of the Film:

Development in the Sea Urchin (*Psammechinus miliaris*) – I. Fertilization and Cleavage. As an introduction, the sex products of the sea urchin *Psammechinus miliaris* are shown and morphologically explained. Using the differential interference-contrast technique, one is able to distinguish the penetration of a sperm into an unfertilized egg that immediately reacts with the raising of the fertilization membrane. With this technique one also succeeded for the first time in demonstrating the migration of both pronuclei towards each other and their following fusion. The developmental sequence from the first cleavage division to the morula, which is typical for the echinoderms, is explained in detail in different takes of the living object as well as with the help of animation (trick shots). The ciliated blastula rotates within the fertilization membrane and rupturing it, proceeds on to a planktonic life phase.

Résumé du Film:

Développement chez l'oursin (*Psammechinus miliaris*) – I. Fécondation et segmentation. En introduction, les produits génitaux de l'oursin de rivage *Psammechinus miliaris* sont

représentés et expliqués sur le plan morphologique. Grâce à la méthode du contraste d'interférence, on peut distinguer la pénétration d'un sperme dans un œuf arrivé à maturité, qui réagit immédiatement en se détachant de la membrane de fécondation. Cette méthode a permis de démontrer pour la première fois le déplacement des pronucléoles et leur fusion. Le déroulement, typique des échinodermes, des premières divisions par segmentation, jusqu'à la morula, est expliqué en détail dans plusieurs plans, à la fois sur l'objet vivant et par des dessins animés représentant les phases. La blastula, dotée à la fin de cils, pivote à l'intérieur de la membrane de fécondation et accède, après éclatement de celle-ci, au mode de vie planctonique.

Allgemeine Vorbemerkungen

Mit der Entdeckung der Grundzüge der Befruchtung am Seeigeli (Besamung und Verschmelzung der Vorkerne bei *Paracentrotus lividus*) leitete OSKAR HERTWIG [6] vor nunmehr 100 Jahren ein neues Kapitel der Entwicklungsbiologie ein. Eine Vielzahl fundamentaler Arbeiten auf den Gebieten der Entwicklungsphysiologie und experimentellen Embryologie unterstreicht die Bedeutung des Seeigelkeimes als gleichermaßen klassisches und modernes Objekt zur Analyse von morphogenetischen, ultrastrukturellen, biochemischen und molekular-biologischen Entwicklungsprozessen (siehe BOOLOOTIAN [1], CZIHAK [3], GUIDICE [5], HÖRSTADIUS [7], [8], ROTHSCHILD [12]).

Die Vorteile des Seeigels als Versuchsobjekt in Lehre und Forschung gründen sich auf eine Reihe methodologischer Eigenschaften, deren wesentlichste sich aus folgender Zusammenstellung ergeben:

- 1) Verschiedene Seeigel-Spezies sind im Küstenbereich vielfach in großen Mengen verfügbar.
- 2) Die Laichzeit einzelner Arten variiert, so daß an unterschiedlichen Orten zu verschiedenen Zeiten befruchtungsfähiges Material verfügbar ist.
- 3) Seeigel sind relativ einfach zu halten; innerhalb gewisser Grenzen läßt sich die Reifezeit durch Temperaturerhöhung oder -erniedrigung beschleunigen oder verkürzen.
- 4) Eine hohe Ei- und Samen-Produktion liefert große Mengen Versuchsmaterial und gewährleistet eine statistische Absicherung von Experimentalserien.
- 5) Nach Abgabe der Geschlechtsprodukte erfolgt die Befruchtung im freien Medium. Entsprechend lassen sich die Eier *in vitro* befruchten oder auch parthenogenetisch aktivieren.
- 6) Die Transparenz der oligolezithalen Eier begünstigen die mikroskopische Beobachtung der Entwicklungsabläufe.
- 7) Konsistenz und Struktur des Seeigelkeims begünstigen mannigfache manipulative Eingriffe.
- 8) Die Entwicklung der Keime verläuft relativ synchron und schnell. Schon nach 1–2 Tagen haben sich junge Larven differenziert.

Zur Entstehung des Films

Der Seeigelkeim spielt in Forschung und Lehre als Modellobjekt nach wie vor eine sehr bedeutsame Rolle. W. KUHL [9], [13] hat die Entwicklung des Seeigel-Eies von *Psammechinus miliaris* erstmals kinematographisch dokumentiert und analysiert. Die Herstellung des vorliegenden Lehrfilms entsprach einem allgemeinen Wunsch, die Seeigel-Entwicklung in einer neuen, dem gegenwärtigen Stand der Technik entsprechenden Form zu präsentieren. Eine verbesserte Aufnahme- und Mikroskopier-Technik – insbesondere die Einführung der nunmehr ausgereiften Differential-Interferenzkontrast-Methode nach NOMARSKI (DIK) – lieferten hierfür gute Voraussetzungen. Dabei wurde angestrebt, den Ablauf bestimmter, bisher noch nicht erfaßter Entwicklungsprozesse in ihrer Dynamik sichtbar zu machen.

Geschlechtsreife Strandseeigel

In den Küstengewässern der Nordsee, speziell der Deutschen Bucht hat sich der Strandseeigel *Psammechinus miliaris* Gmelin seit Jahren als günstigstes Versuchsobjekt bewährt. Bedauerlicherweise deuten Erfahrungen der letzten Jahre auf eine rückläufige Verbreitungstendenz hin. In Abhängigkeit von den jeweils herrschenden Wassertemperaturen im Frühjahr reicht die Laichzeit des Strandseeigels von Ende Mai bis Anfang August. Die meisten Echinoidea sind zwar getrenntgeschlechtlich, doch nur wenige Arten – so auch *P. miliaris* – weisen eindeutig erkennbare, sekundäre Geschlechtsmerkmale auf (MARX [10]). Männliche und weibliche Strandseeigel sind unter dem Stereomikroskop an einer in Form und Farbe unterschiedlichen Differenzierung der apikal, im Analfeld gelegenen fünf Genitalporen zu erkennen (Abb. 1 a, b).

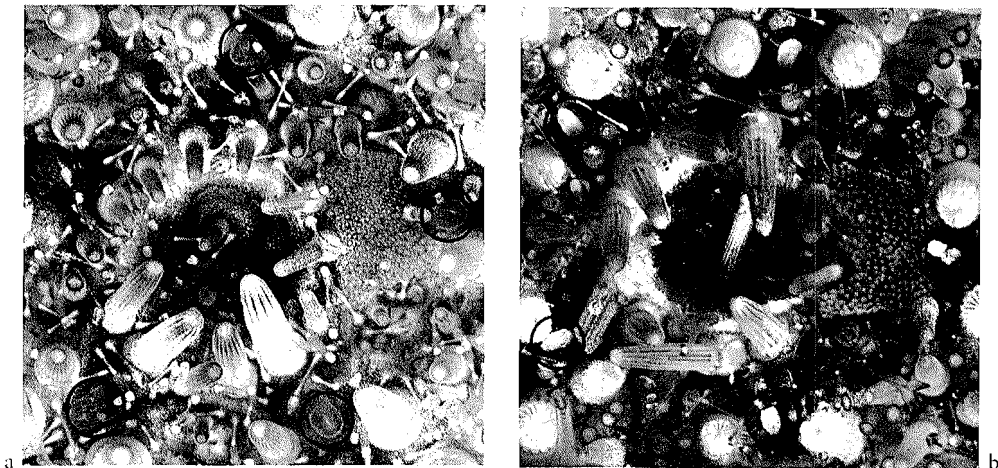


Abb. 1. Sekundäre Geschlechtsmerkmale auf der Oberseite von *Psammechinus miliaris*. Aufsicht auf Analfeld mit den fünf Genitalporen a) Männchen mit bräunlich-rot gefärbten, rundlichen Papillen, b) Weibchen mit bläulich-weißen, länglichen Vertiefungen

Eier- und Spermengewinnung

Die Ei- und Spermienabgabe läßt sich im Labor an geschlechtsreifen Tieren relativ leicht induzieren. Man legt, jeweils getrennt, die männlichen und weiblichen Individuen mit der Oberseite nach unten auf ein mit Meerwasser randvoll gefülltes, enghalsiges Gefäß (Erlenmeyer oder dergl.). Die Genitalporen tauchen damit ins Wasser ein. Die Abgabe der Geschlechtsprodukte kann über verschiedene Verfahren ausgelöst werden:

- 1) Herausschneiden des Kauapparates („Laterne des Aristoteles“) mit Darm und Auswaschen des Schalenskeletts mit Meerwasser (veraltete Methode).
- 2) Injektion einer isotonischen 0,5 mol KCl-Lösung (ca. 1 ml) in das Cölom.
- 3) Elektro-Stimulation über zwei apikal und basal angelegte Blei- oder Silber-Elektroden.

Sehr einfach und schonend ist die Injektion einer KCl-Lösung, indem man die Spritze seitlich neben dem Kauapparat einführt. Die Tiere geben alsbald, strangartig fließend, ihre Gameten aus den fünf Genitalporen in das Meerwasser ab; die Spermien und Eier konzentrieren sich auf dem Gefäßboden. Die Eier haben einen Durchmesser von ca. 100 μm , sind durch Karotinoide schwach gelb-rötlich gefärbt und lassen sich im Kühlschrank über mehrere Stunden lagern. Das unverdünnte, milchigweiße Spermienkonzentrat ist über mehrere Wochen haltbar.

In der Regel werden vom Muttertier, nach erfolgter Reifeteilung im Ovar, nur reife, d. h. haploide Eier mit kleinem, kaum sichtbarem Nucleus in das Medium abgegeben. Bei induzierter Eiabgabe finden sich vereinzelt auch unreife, also diploide Eier mit sehr großem Kern (ca. 50 μm) und darin eingebetteten kleinen Nucleolus (Abb. 2).

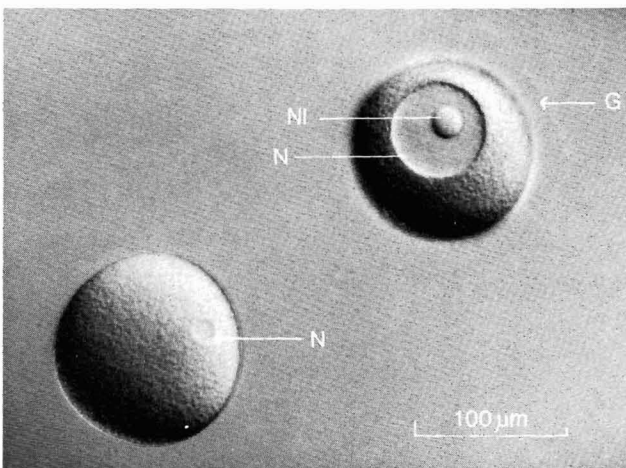


Abb. 2. Unreifes, diploides Ei (links) mit großem Nucleus (N) und darin eingebettetem Nucleolus (NI), schwach sichtbar auch die das Ei umgebende Gallerhülle (G). Rechts im Bild ein reifes, haploides Ei mit schwach sichtbarem Nucleus (N)

Unreife wie reife Eier sind von einer, im Hellfeld unsichtbaren, gelatinösen Hülle umgeben (Brechungsindex = Meerwasser). Sie ist nach Färbung (Janusgrün oder Tusche) oder im DIK-Verfahren nachweisbar. Die gelatinöse Hülle enthält eine, die

Spermien aktivierende Substanz („Fertilisin“). Unter ihrem Einfluß zeigen Spermien eine Agglutinations-Reaktion (s. ROTHSCHILD [12]).

Die winzigen Spermien (ohne Schwanzgeißel ca. 5 µm) zeigen eine deutliche Dreigliederung in Kopfstück, Mittelstück und Flagellum (Abb. 3). Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen (vergl. GUIDICE [5]) liegt in der Spermien Spitze das Akrosom und der Nucleus. Das Mittelstück besteht aus zwei Centriolen und einem großen Mitochondrium. Der Schwanzfaden weist die typische 9 + 2 Mikrotubuli-Struktur auf.

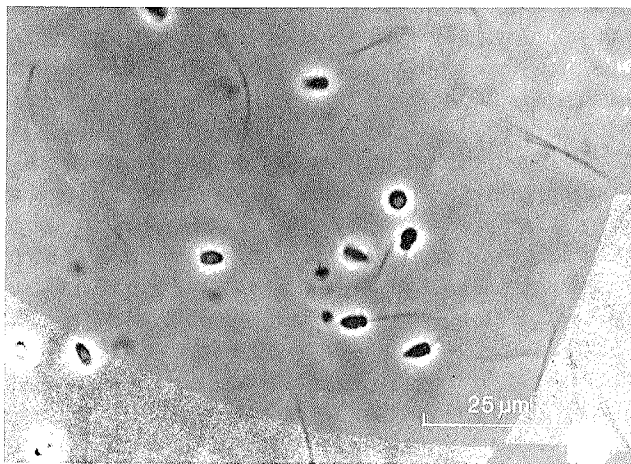


Abb. 3. Spermien von *Psammechinus miliaris*

Künstliche Besamung und Befruchtung

Als Befruchtung bezeichnet man die Vereinigung der Eizelle mit einer Samenzelle und die Verschmelzung des männlichen mit dem weiblichen Vorkern, wobei mütterliches und väterliches Erbmateriale kombiniert wird. Nach ROTHSCHILD [12] läßt sich der Befruchtungsablauf in zwei Phasen gliedern: 1) Aktivierung des reifen Eies durch Anheftung eines Spermiums, 2) Inkorporation des Spermiums und Verschmelzung der Pronuclei zum Synkarion. Beide, in weniger als einer Stunde ablaufenden Phasen lassen sich in kinematographischer Raffung sichtbar machen.

Filmisch nicht darstellbar sind eine Vielzahl wechselseitiger Reaktionsweisen, die mit der Besamung ausgelöst werden und deren experimentelle Analyse noch keineswegs abgeschlossen ist. Chronologisch läßt sich der Befruchtungsablauf bei *Psammechinus miliaris* in folgende Teilprozesse gliedern: Auffinden der Eizelle – Durchdringen der Gallerhülle – Haftung an der Eimembran (Fertilisin-Akrosom-Reaktion) – Bildung der Befruchtungsmembran (Cortex-Reaktion) – Inkorporation von Spermien-Kopf und Mittelstück – Drehung des Spermienkopfes (180°) – Spermasterbildung durch Centriolen des Mittelstücks – Wanderung des männlichen und weiblichen Vorkerns – Fusion der Pronuclei (siehe hierzu BOOLOOTIAN [1], CZIHAK [3], EPEL [4], GUIDICE [5], ROTHSCHILD [12]).

Die mikroskopische Beobachtung des Befruchtungsablaufes von *Psammechinus miliaris* erfolgt am besten mit Hilfe eines Deckglaspräparates. Das Deckglas muß schwach abgestützt werden (Silikonfett, Paraffin oder dergl.). Die auf einen Objektträger übertragenen, unbefruchteten Eier werden ohne Pressung vorsichtig mit dem Deckglas abgedeckt. Man bereitet sich eine mit Meerwasser stark verdünnte Spermiasuspension und fügt dem Präparat seitlich einen Tropfen zu. Die im Konzentrat unbeweglichen Spermien erlangen ihre volle Aktivität erst in Verbindung mit Meerwasser.

Bei Anwendung unnatürlich hoher Spermienkonzentrationen tritt Polyspermie auf mit nachfolgend anomalem Verlauf der Furchungsteilungen. Eine eindeutig chemotaktische, zum Ei gerichtete Spermienreaktion konnte bislang bei den Echinoidea nicht nachgewiesen werden. Bei marinen Organismen wurde Chemotaxis der Spermien vielfach angezweifelt, konnte allerdings inzwischen bei mehreren Hydrozoen, Muscheln und Tunicaten (MILLER [11]) nachgewiesen werden.

Wenn das befruchtende Spermium die gelatinöse Hülle passiert hat, wird über das in der Spermien Spitze gelegene Acrosom eine feste Verbindung mit der Eimembran hergestellt (Akrosom-Reaktion). Kopf- und Mittelstück durchdringen die Eimembran und werden vom Eiplasma inkorporiert. Das Ei reagiert mit einer von der Eindringungsstelle ausgehenden, über den ganzen Eiumfang fortschreitenden Abhebung der Befruchtungsmembran und verhindert so ein Eindringen weiterer Spermien (Abb. 4a-d). Nach 30-90 Sekunden ist die Ablösung der Befruchtungsmembran abgeschlossen; zwischen Eioberfläche und Membran hat sich ein mit klarer Flüssigkeit erfüllter „perivitelliner Raum“ ausgebildet (Abb. 5, 6a).

Im Eiplasma erfolgt eine Drehung des geißelfreien Spermiums, und das Centrosom bildet eine „Spermaster“-Strahlung aus (Abb. 5a). Der Spermienkern schwillt an und wird zum männlichen Vorkern. Beide Pronuclei wandern aufeinander zu und verschmelzen etwa 30-40 Minuten nach Eindringen des Spermiums zum Syngarion. Bei günstiger Lokalisation (in der Bildebene) kann die Wanderung und Fusion der Vorkerne im DIK-Verfahren beobachtet werden (Abb. 5b-d).

Furchungsverlauf

Nach der Karyogamie wird die Prophase der ersten Furchungsteilung durch eine Abflachung der Spermasterstrahlung eingeleitet. Das Spermaster-Zentrum verbreitert sich tellerartig, so daß sich in der Seitenansicht eine als „klarer Streifen“ bezeichnete Plasmafigur darstellt (Abb. 6b). Die Bedeutung dieser Figur ist unklar, doch wird durch die Lagebeziehung des klaren Streifens erstmals die Hauptsache des Eies indiziert: Die erste Teilungsfurche (Abb. 6c) verläuft stets senkrecht zur Ebene des „klaren Streifens“, der vor der Kernteilung wieder verschwindet.

Es ist ungeklärt, ob durch den Verlauf der ersten Teilungsfurche bereits die larvale Symmetrieebene festgelegt ist.

Etwa 40 Minuten nach der Befruchtung wird die erste Teilung eingeleitet. Die Furche verläuft meridional, d.h. vom animalen zum vegetativen Eipol und ergibt zwei gleichgroße Blastomeren (Abb. 6c, 7a). Die zweite, ebenfalls meridionale Furche teilt das Ei in vier Blastomeren (Abb. 6d, 7b). Die dritte Teilungsfurche ver-

läuft horizontal (äquatorial, latitudinal) und teilt das Ei in ein oberes, animales und ein unteres, vegetatives Blastomerenquartett (Abb. 6e, 7c). Bei der vierten Teilung werden die animalen Blastomeren durch Meridionalfurchung in acht gleichgroße, die vegetativen hingegen durch eine in Polnähe parallel zum Äquator verlaufende Furchung in acht ungleiche Blastomeren geteilt (Abb. 6f, 7d). Da sich das vegeta-

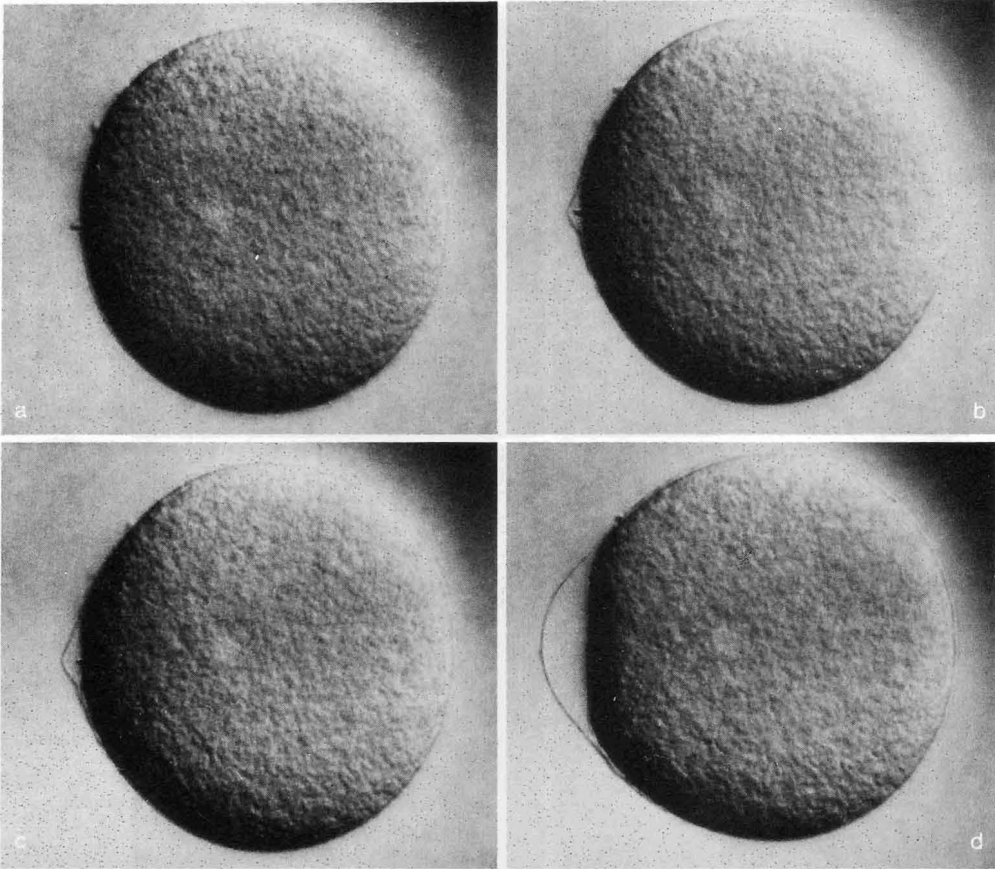


Abb. 4. Eindringen eines Spermiums in das Ei und fortschreitendes Abheben der Befruchtungsmembran

tive Quartett in der Regel etwas früher als das animale teilt, durchläuft der Keim kurzzeitig ein 12-Zellenstadium. Das 16-Zellenstadium besteht in der animalen Hemisphäre aus acht mittelgroßen Mesomeren, in der vegetativen Sphäre aus vier subäquatorialen Makromeren und vier Mikromeren am vegetativen Pol (Abb. 7d). Bei der fünften Teilung trennt eine latitudinale Furchung die animalen Mesomeren in zwei Ringe (nach HÖRSTADIUS [7] „an₁“ und „an₂“) aus je acht Zellen, die

Makro- und Mikromeren teilen sich hingegen meridional (Abb. 7 e). In chronologischer Folge teilen sich zunächst die vier Makromeren (\rightarrow 20 Zellen), dann die acht Mesomeren (\rightarrow 28 Zellen), schließlich die vier Mikromeren zum 32-Zellenstadium. Bei der sechsten Furchung wird an_1 und an_2 radial in vier achtzellige Schichten geteilt. Auch die Makromeren teilen sich radial in zwei Schichten: „veg₁“ und

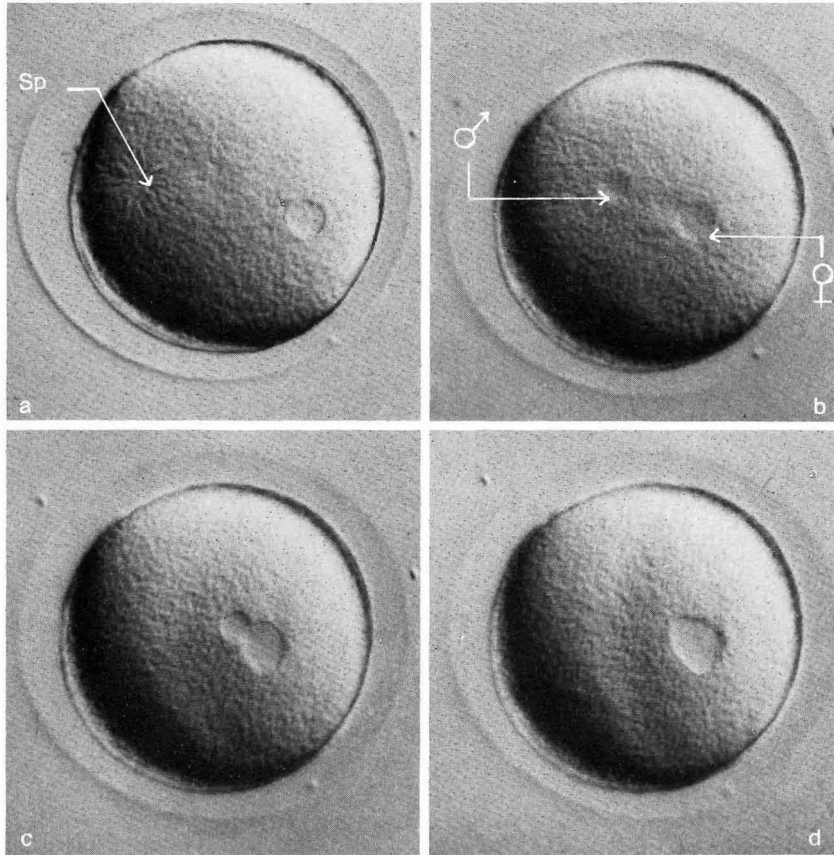


Abb. 5. Wanderung und Verschmelzung des männlichen und weiblichen Pronucleus. Zwischen Befruchtungsmembran und Ei der perivitelline Raum; sp: Spermaster

„veg₂“. Das 64-Zellenstadium existiert nur konzeptionell; durch asynchronen Furchungsverlauf und Teilungsverzögerung oder Unterdrückung wird nur ein 50-60-Zellenstadium erreicht. Zwischen dem 20- und 60-Zellenstadium wird der Embryo auch als Morula (Maulbeerstadium) bezeichnet (Abb. 6 g, h). Nach der siebten Teilung werden die Blastomeren kleiner; der Embryo erhält eine glatte, abgerundete Oberfläche und wird nun „Blastula“ genannt, deren zentraler Innenraum „Blasto-

coel“ (Abb. 6i). Etwa zum zehnten Teilungszyklus entwickeln die Blastomeren Cilien, und der Embryo beginnt innerhalb der Befruchtungsmembran zu rotieren. Die Membran reißt schließlich auf, und der Embryo schlüpft als Schwimm-Blastula aus (Abb. 6k).

Die einzelnen Teilungsschritte erfolgen bei *Psammechinus miliaris* in mehr oder weniger regelmäßigen Intervallen von etwa 30–40 Minuten bei Raumtemperatur. Etwa sieben Stunden nach der Befruchtung hat die Blastula die Membran gesprengt und schwimmt frei im Medium.

Erläuterungen zum Film

Wortlaut des gesprochenen Kommentars¹

Normale Geschwindigkeit, Zeitraffung 1:3 bis 1:720

1. Das Seeigelei weist eine homogene Verteilung des Dottermaterials auf und ist damit als Studienobjekt für die total-äquale Furchung besonders gut geeignet. Im Bild rechts das unreife, noch diploide Ei mit großem Kernbläschen und Nucleolus, links das ausgereifte haploide Ei mit unscharf abgegrenztem Nucleus.

Objektfeldbreite 400 µm; DIK; Aufn.-Freq. 24 B/s

2. Die Spermien lassen einen dreigliedrigen Aufbau erkennen: Das konisch zugespitzte Kopfstück mit Akrosom und Nucleus, das Mittelstück mit dem Centrosom und zahlreichen Mitochondrien und der Schwanzfaden als Flagellum.

Objektfeldbreite 100 µm; Ph; Aufn.-Freq. 24 B/s

3. Die Spermien schwimmen aktiv auf die Eizellen zu. Das erste Spermium, das die Eioberfläche erreicht, dringt unvermittelt in die Zelle ein. Im gleichen Moment ist die Zelle für weitere Spermien blockiert. Ausgehend von der Eindringungsstelle hebt sich ein als Befruchtungsmembran bezeichnetes Häutchen von der Zelle ab. Aus dem Eiplasma wandert Granula in den flüssigkeitserfüllten, perivitellinen Raum ein, der etwa nach Ablauf einer Minute die Eizelle umfaßt.

Objektfeldbreite 400 µm; DIK; Aufn.-Freq. 24 B/s

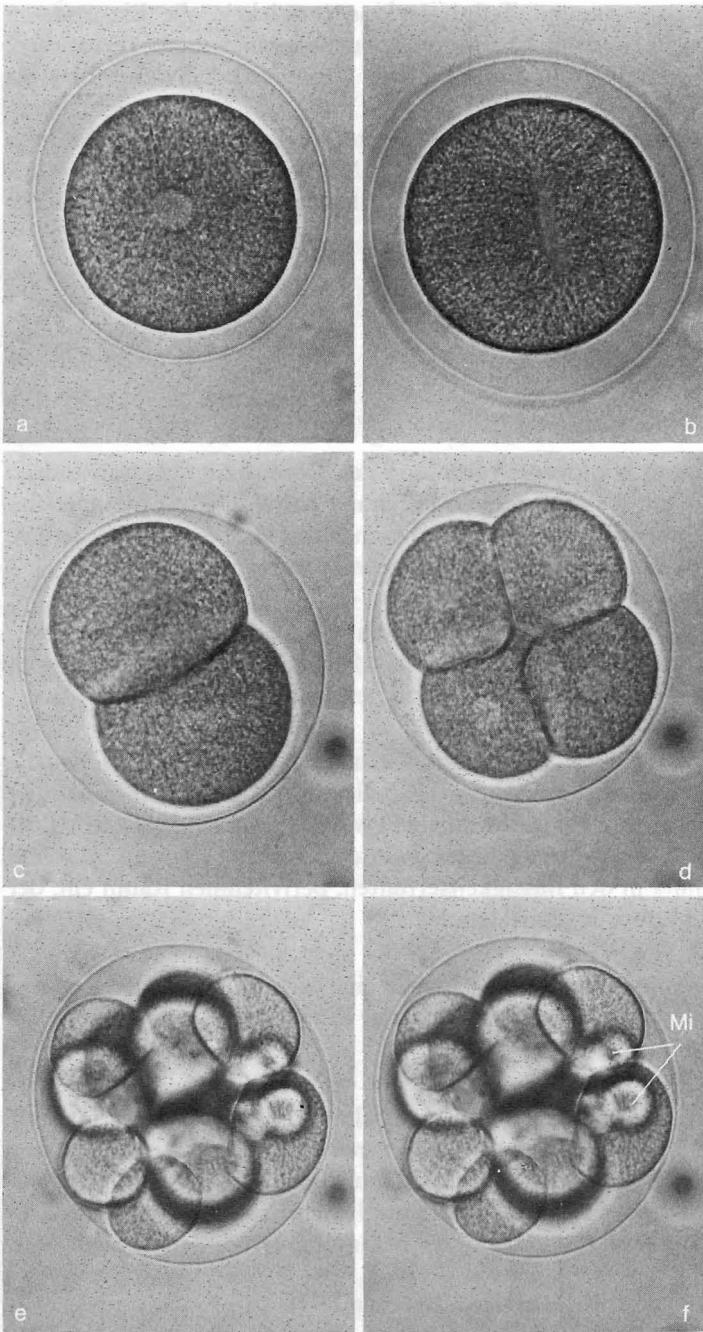
4. Hier dringt gerade das Spermium in die Eizelle ein. Beim Abheben der Befruchtungsmembran kontrahiert sich das Eiplasma an der Eindringungsstelle und zeigt so eine vorübergehende Einbuchtung.

Objektfeldbreite 195 µm; DIK; Aufn.-Freq. 24 B/s

5. Im Interferenzkontrast gelingt es, die Kernverschmelzung sichtbar zu machen. Zunächst nähert sich von links das Spermien-Centrosom als sog. Spermaster dem weiblichen Vorkern. Als bald wird auch der männliche Vorkern sichtbar. Beide Pronuclei wandern aufeinander zu, wobei der männliche Vorkern die größere Wegstrecke zurücklegt. Etwa 40 Minuten nach der Besamung verschmelzen beide Vorkerne zum Synkarion.

Objektfeldbreite 400 µm; DIK; Aufn.-Freq. 20 B/min

¹ Die *Kursiv*-Überschrift entspricht dem Zwischentitel im Film. – Die eingerückten Abschnitte in Kleindruck geben zusätzliche Informationen.



Die Abbildung zeigt die Entwicklung eines Embryos in den ersten Stadien. Die Zellen sind in den verschiedenen Stadien dargestellt. Die Zellen sind in den verschiedenen Stadien dargestellt. Die Zellen sind in den verschiedenen Stadien dargestellt.

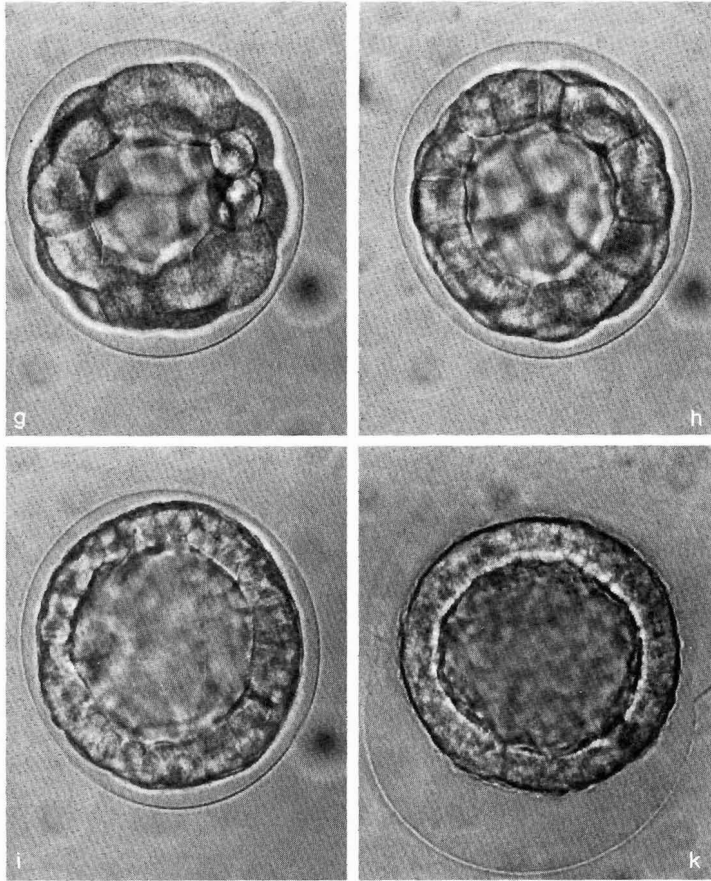


Abb. 6. Die Eifurchung bis zur schlüpfenden Blastula. a: Eizelle mit Synkarion; b: Spermaster als „Klarer Streifen“; c–g: 2 bis 36-Zellenstadium; h: Morula; i: Blastula; k: Schwimm-Blastula nach dem Sprengen der Eihülle (Befruchtungsmembran); Mi: Mikromeren

6. Im weiteren Entwicklungsablauf wird die Prophase mit der Centrosomenteilung eingeleitet. Beim Auseinanderweichen der beiden Tochtercentriolen wird eine als „klarer Streifen“ bezeichnete Cytoplasmafigur sichtbar, die während der Metaphase in die sog. Amphiasierstrahlung übergeht. Die erste Teilungsfurche verläuft senkrecht zu dieser Spindelebene. Es entstehen zwei Furchungszellen oder Blastomeren.

Objektfeldbreite 195 μm ; DIK; Aufn.-Freq. 20 B/min

7. An vier Zellen wird nun unter starker Zeitraffung der Furchungsablauf bis zum Schlüpfen der Blastula dargestellt. Der Entwicklungsablauf des Echinodermeneies ist durch eine totale und überwiegend äquale Furchung gekennzeichnet. – Die Teilungen erfolgen in mehr oder weniger regelmäßigen Intervallen, so daß nach etwa fünf Stunden acht Teilungsschritte vollzogen sind und jeder Keim aus 256 Blastomeren besteht.

An der Peripherie werden Cilien gebildet, die den als Blastula bezeichneten Hohlkörper in Rotation versetzen.

Etwa sieben Stunden nach der Besamung bricht die Befruchtungsmembran auf, und die Blastula geht zur planktischen Lebensweise über.

Objektfeldbreite 505 μm ; Hellfeld; Aufn.-Freq. 2 B/min

8. Hier der Furchungsablauf bei stärkerer Vergrößerung. Die ersten beiden Teilungen verlaufen meridional, die dritte äquatorial. Es differenzieren sich vier animale und vier vegetative Blastomeren. Die vierte teilweise inäqual verlaufende Teilung

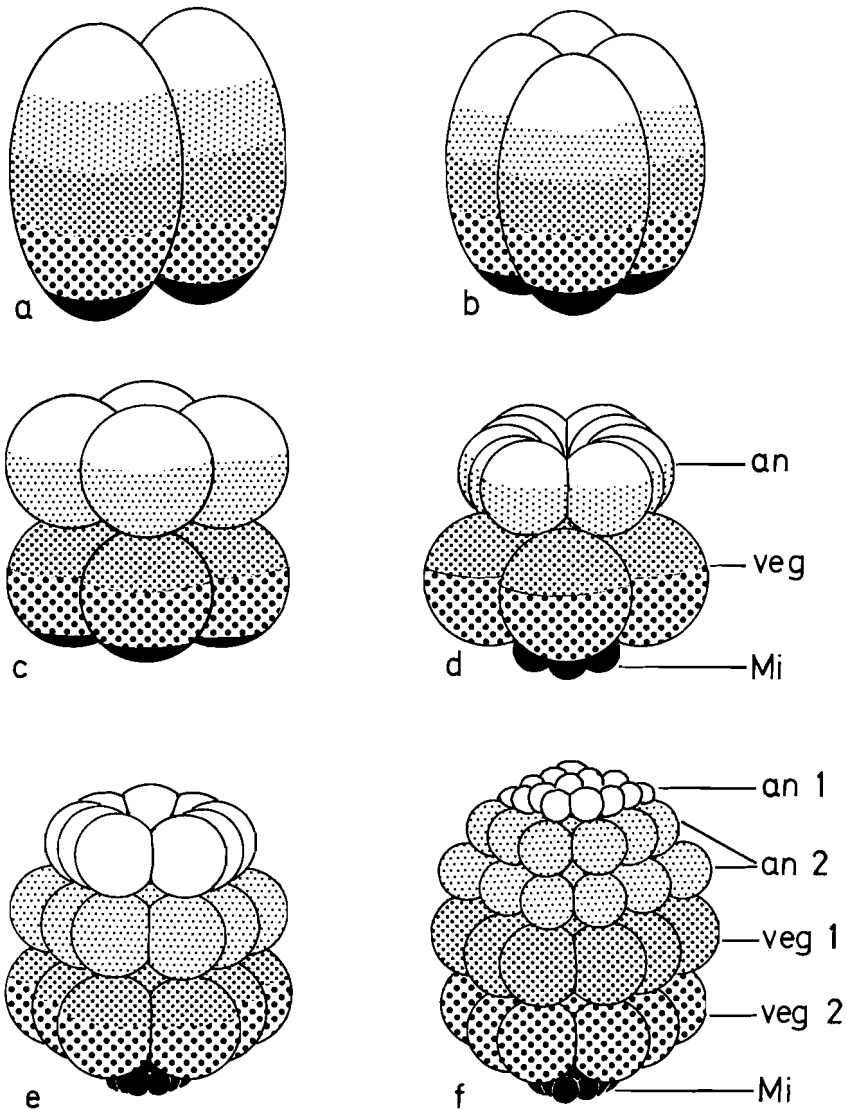


Abb. 7. Schema der Furchungsteilungen bis zum 64-Zellenstadium und Verteilung der bereits im befruchteten Ei vorgegebenen animal-vegetativen Tendenzen

läßt am vegetativen Pol vier Mikromeren entstehen. Die einzelnen Zellkränze bilden gemeinsam einen Hohlkörper, dessen Innenraum als Blastocoel bezeichnet wird.

Objektfeldbreite 385 µm; Hellfeld; Aufn.-Freq. 2 B/min

Phasentrick

Vom befruchteten Ei ausgehend wird hier der Furchungsverlauf bis zum 64-Zellenstadium in schematisch vereinfachter Form dargestellt. Das Seeigeei weist eine polare Organisation auf, wobei animale und vegetative Bereiche im Sinne einer Gefällepolarität orientiert sind. Die Farbgebung: gelb = animale Tendenz; grün + rot = vegetative Tendenz, soll das künftige Schicksal bestimmter Keimbereiche verdeutlichen.

Das regelmäßige Furchungsmuster des Seeigelkeimes beruht auf einem charakteristischen Wechsel der Spindelstellungen zur Eiachse.

Bei der ersten Furchung ist die Teilungsspindel horizontal in der Mittelebene des Eies orientiert.

Die 1. Teilung verläuft demnach meridional und führt zur Abschnürung von zwei gleich großen Blastomeren. Vor Einleitung der 2. Furchung liegen die beiden Teilungsspindeln wiederum in der Äquatorialebene, jetzt aber um 90° zur Bildebene versetzt.

Die 2. Teilung verläuft wie die erste Teilung meridional und äqual. Als Ergebnis differenziert sich ein Quartett aus vier äquivalenten Blastomeren. Vor Beginn der 3. Furchung orientieren sich die Spindelachsen vertikal, also senkrecht zur Äquatorialebene.

Die 3. Teilung erfolgt nunmehr äquatorial und führt zum 8-Zellenstadium, wobei erstmals animales und vegetatives Material durch Zellgrenzen voneinander getrennt sind. Die verschiedenartige Differenzierung der beiden Zellkränze wird auch durch einen unterschiedlichen Furchungsverlauf deutlich.

Vor der 4. Furchung stellen sich die Teilungsspindeln im animalen Mesomerenkranz horizontal ein. Die Spindeln im vegetativen Makromerenquartett hingegen verlaufen exzentrisch und schräg zum vegetativen Pol hinweisend.

Die 4. Teilung führt zum 16-Zellenstadium. Der animale Zellkranz ist durch äquale und meridionale Furchung in einen Kranz von acht gleichgroßen Mesomeren zerlegt. In der vegetativen Hälfte bedingt die spezifische Spindelstellung eine inäquale annähernd horizontale Furchung. Damit gliedert sich die vegetative Hälfte in einen äquatorialen Zellkranz von vier großen Makromeren, von denen sich vier wesentlich kleinere Mikromeren am vegetativen Pol abgeschnürt haben.

Bei den weiteren Teilungen folgen im Wechsel jeweils äquatoriale und meridionale Furchungsschritte. So werden bei der 5. Teilung die acht animalen Mesomeren durch äquatoriale Furchung in zwei etwa gleichgroße Zellkränze zerlegt. Die vier Makromeren hingegen teilen sich meridional und bilden einen aus acht gleichgroßen Zellen bestehenden, vegetativen Zellkranz. Durch eine etwas verzögerte Mikromerenteilung durchläuft der Keim zunächst ein 28-Zellenstadium, bevor das eigentliche 32-Zellenstadium mit 8 Mikromeren erreicht wird. In diesem Stadium

gliedert sich der Keim in vier Bereiche: Die beiden animalen Zellkränze 1 und 2, den vegetativen Makromerenkranz und insgesamt 8 Mikromeren am vegetativen Pol.

Die 6. Teilung führt durch wiederum verzögerte Mikromerenteilung über ein 56- zum 64-Zellenstadium. Dabei wird die Lage der beiden animalen Zellkränze unregelmäßiger; sie bilden schließlich eine abgerundete Kappe. Durch horizontale Furchung der 8 Makromeren haben sich auch in der vegetativen Hälfte die zwei Zellkränze vegetativ 1 und 2 differenziert. Im weiteren Furchungsverlauf wird die ursprüngliche Größendifferenz zwischen Makro- und Mikromeren durch eine verlangsamte Teilungsfolge der Mikromeren allmählich ausgeglichen.

9. Diese Aufnahmen zeigen noch einmal den Entwicklungsablauf am Objekt.

Im Verlauf der vierten Teilung, also vom 8- zum 16-Zellenstadium differenzieren sich – hier rechts im Bild – die vier Mikromeren. – Der anschließenden 5. Teilung folgt die der Mikromeren mit einer gewissen Verzögerung. Die rhythmische Bewegung der Blastomeren beruht auf den annähernd synchronen Furchungsteilungen. Im weiteren Verlauf hebt sich das Blastocoel immer deutlicher ab. Die Mikromeren sind nicht mehr sichtbar.

Nach der achten Teilung, also nach Erreichen des 256-Zellenstadiums, werden die Cilien gebildet, und der Keim beginnt innerhalb der Befruchtungsmembran zu rotieren.

Objektfeldbreite 385 µm; Hellfeld; Aufn.-Freq. 4 B/min

10. Das Ausschlüpfen der Blastula wird hier bei normaler Geschwindigkeit in drei Phasen wiedergegeben. Durch ein von der Blastula produziertes Enzym wird die Befruchtungsmembran teilweise aufgelöst, und der Keim kann ins Freie entweichen.

Objektfeldbreite 310 µm; Ph; Aufn.-Freq. 24 B/s

11. Die Blastula ist am vegetativen Pol abgeflacht und schwimmt mit dem apikalen Ende voran.

Objektfeldbreite 765 µm; Hellfeld; Aufn.-Freq. 24 B/s

English Version of the Spoken Commentary¹

Normale Geschwindigkeit, Zeitraffung 1:30 bis 1:720

(Normal speed, quick motion 1:30 to 1:720)

1. The sea urchin egg is characterized by the homogeneous distribution of deuto-plasm and thus it is particularly suited for observation of total and equal cleavage. To the right, an immature, still diploid ovum with large nuclear vesicle and nucleolus. To the left, a mature haploid egg with a poorly defined nucleus.

2. The spermatozoa have three distinct morphological regions: the conically pointed head with the acrosome and nucleus, the middle piece with the centrosome and numerous mitochondria, and the tail piece acting as a flagellum.

¹ The headline in *italics* corresponds with the subtitle in the film.

3. The sperm swim actively towards the egg cells. The first spermatozoon to reach the surface of the egg penetrates it immediately. At this moment the ovum is blocked for further sperms. Starting from the point of sperm attachment, the vitelline membrane rises from the egg to form the fertilization membrane. Cortical granules flow into the fluidfilled perivitelline space which surrounds the egg after about a minute.

4. Here a sperm is just entering the egg. When the fertilization membrane rises from the surface, the egg cortex contracts at the point of entry, showing a temporary indentation.

5. Under the interference contrast microscope, karyogamy is rendered visible. First the sperm centrosome in the form of an astrosphere approaches the female pronucleus, here from the left. Soon the male pronucleus becomes visible. Both pronuclei migrate towards each other, the male pronucleus covering the greater distance. About 40 minutes following sperm entry the two pronuclei fuse to form the synkaryon.

6. The next stage of development, the prophase, starts with the division of the centrosomes. As the two daughter centrioles separate, a cytoplasmic configuration described as the "streak" appears, which later gives way to the spindle fibres, the so called amphiaster, during metaphase. The first cleavage furrow is formed perpendicular to the spindle axis.

7. Time lapse cinematography demonstrates the cleavage of four cells up to blastulation. The morphogenesis of the echinoderm egg is characterized by its total and mainly equal cleavage. — The divisions take place at more or less regular intervals, so that, after about five hours, eight divisions have been accomplished, resulting in a hollow sphere consisting of 256 blastomeres.

Cilia are developed round the periphery and the blastula rotates within the fertilization membrane.

About seven hours after insemination, the fertilization membrane splits, releasing the blastula to a planktonic mode of life.

8. The first cleavages under stronger magnification. The first two cleavage planes are meridional; the third, equatorial. Four animal and four vegetal blastomeres are differentiated. The fourth, partly unequal cleavage gives rise to four micromeres at the vegetal pole. The individual tiers of cells now surround a spherical cavity called the blastocoel.

Starting from the fertilized egg, morphogenesis is now demonstrated schematically up to the 64-blastomere stage. The sea urchin egg exhibits polar symmetry, the animal and the vegetal areas being orientated in graded polarity. The colouring: yellow for animal tendency, green and red for vegetal tendency. This will serve to indicate the subsequent fate of various prospective areas.

The regular cleavage pattern of the sea urchin zygote is due to a characteristic change in orientation of the mitotic spindle plane to the polar axis of the egg. At the first cleavage, the spindle is horizontally aligned on the equatorial plane of the zygote.

So the first cleavage is meridional and leads to the segmentation of equally sized blastomeres.

Before the onset of the second cleavage, the two spindles are again aligned on the equatorial plane, but now they are turned at 90° to the plane of projektion.

The second cleavage, like the first, is meridional and equal. It results in a tetrad of four equivalent blastomeres. Before the onset of the third cleavage, the spindle axes are vertically orientated, that is, perpendicular to the equatorial plane.

The third cleavage is effected equatorially and produces the 8-blastomere stage, in which for the first time animal and vegetal cell material is separated by cell membranes. The heterogeneous differentiation of the two polar tiers of cells is made evident by their varying cleavage planes. Before the fourth cleavage, the spindles of the animal mesomeric tier are horizontally orientated. The spindles in the vegetal macromeric tetrad, on the other hand, are eccentric and pointing obliquely to the vegetal pole.

The fourth cleavage results in the 16-cell stage. By equal and meridional cleavages, the animal pole has now differentiated a tier of eight equally sized mesomeres. In the vegetal hemisphere, the specific spindle alignment has conditioned an unequal, approximately horizontal cleavage plane. Thus the vegetal hemisphere consists of an equatorial tier of four large macromeres, from which four considerably smaller micromeres have segmented towards the vegetal pole.

The following cleavages take place alternately on the equatorial and meridional planes. Thus, at the fifth cleavage, the eight animal mesomeres are divided by equatorial cleavage into two tiers of almost equal size. The four macromeres, conversely, divide meridionally, resulting in a vegetal tier of eight equally sized cells. On account of a somewhat retarded micromere cleavage, the early blastula passes through a 28-cell stage before reaching the actual 32-cell stage with eight micromeres. At this stage the early blastula is differentiated into four regions: the two animal cell tiers, 1 and 2; the vegetal macromere tier; and a total of eight micromeres at the vegetal pole.

The sixth cleavage is again in two phases, resulting in a 56- and a 64-cell stage. Now the position of the two animal tiers of cells becomes irregular; they ultimately form a rounded cap. Also in the vegetal hemisphere, by horizontal cleavage of the eight macromeres, both vegetal tiers of cells 1 and 2 have been differentiated. As cleavage proceeds, the original size difference between macro- and micromeres is gradually equalized by decelerated division of the micromeres.

9. These shots show the developmental stages in real life.

During the fourth cleavage, that is, from the 8- to the 16-cell stage, the four micromeres are in course of differentiation, here to the right. — The subsequent fifth cleavage follows that of the micromeres after an interval. The rhythmical movements of the blastomeres are due to the almost synchronous cleavages. As it proceeds, the blastocoele becomes more and more prominent. The micromeres are no longer visible.

Following the eighth cleavage, that is, upon reaching the 256-cell stage, the cilia are formed and the blastula begins to rotate within the fertilization membrane.

10. The release of the blastula is filmed in three phases at normal speed. The blastula produces a hatching enzyme which partially dissolves the fertilization membrane so that the embryo can escape.

11. The blastula is flattened at the vegetal pole, and swims with the apical end pointing forwards.

Literatur

Eingehendere Literaturangaben in den unter [1], [3], [5], [8] und [12] zitierten Publikationen)

- [1] BOOLOOTIAN, R.A.: Physiology of Echinodermata. (Interscience Publ.) New York 1966.
- [2] COLLINS, F.: A reevaluation of the fertilizin hypothesis of sperm agglutination and description of a novel form of sperm adhesion. *Developmental Biol.* **49** (1976), 381–394.
- [3] CZIHAK, G.: The sea urchin embryo—biochemistry and morphogenesis. Berlin 1975.
- [4] EPEL, D.: The program of and mechanisms of fertilization in the echinoderm egg. *Amer. Zool.* **15** (1975), 507–522.
- [5] GUIDICE, G.: Developmental biology of the sea urchin embryo. New York 1973.
- [6] HERTWIG, O.: Beiträge zur Kenntnis der Bildung, Befruchtung und Theilung des thierischen Eies. I. *Morph. Jb.* **1** (1875), 347–434; II. *ibid.* **3** (1877), 1–86; III. *ibid.* **4** (1878), 156–213.
- [7] HÖRSTADIUS, S.: Über die Determination im Verlaufe der Eiachse bei Seeigeln. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* **14** (1935), 251–479.
- [8] HÖRSTADIUS, S.: Experimental Embryology of Echinoderma. Oxford 1973.
- [9] KUHL, W.: Neue Ergebnisse zur Cytomechanik der Befruchtung und Furchung des Eies von *Psammechinus miliaris* GMEL. *Zool. Zt. (Abt. Anat. Ontog. Tiere)* **70** (1950).
- [10] MARX, W.: Über sekundäre Geschlechtsmerkmale bei *Psammechinus miliaris* und *Echinocyamus*. *Zool. Anz.* **80** (1929).
- [11] MILLER, R.L.: Distribution of sperm chemotaxis in the animal kingdom. In: *Advances in invertebrate reproduction*. Peralam Kenoth, India **1** (1977), 99–119.
- [12] ROTHSCHILD, Lord: Fertilization. New York 1956.

Filmveröffentlichungen

- [13] KUHL, W.: Die Entwicklung des Seeigel-Eies (*Psammechinus miliaris* GMEL). Film C 382 der Reichsanstalt für Film und Bild in Wissenschaft und Unterricht, Berlin 1941. Publikation von W. KUHL, Berlin 1941, 30 S.
- [14] UHLIG, G., und INST. WISS. FILM: Entwicklung beim Seeigel (*Psammechinus miliaris*) – II. Gastrulation und Larvenstadien. Film C 1188 des IWF, Göttingen 1976. Publikation G. UHLIG, *Publ. Wiss. Film., Sekt. Biol., Ser. 12, Nr. 24/C 1188* (1979), 17 S.

Abbildungsnachweis

Abb. 1: Foto GERRIT SAHLING; Abb. 2–6: Einzelbilder aus dem Film; Abb. 7: Zeichnung J. UFER.