Utrecht University Library
Partner in Science
Universiteit Utrecht

Over homogene en heterogene versmeltingen bij echinidenkiemen

https://hdl.handle.net/1874/257382

A 192
1913.

J. A. BIERENS DE HAAN

OVER HOMOGENE EN HETEROGENE VERSMELTINGEN BIJ ECHINIDENKIEMEN

A. qu.
192

.. OVER HOMOGENE EN HETEROGENE ..
VERSMELTINGEN BIJ ECHINIDENKIEMEN

RIJKSUNIVERSITEIT UTRECHT
0766 8845

OVER HOMOGENE EN HETEROGENE VERSMELTINGEN BIJ ECHINIDENKIEMEN

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN DOCTOR IN DE PLANT- EN DIERKUNDE AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS DR. C. EIJKMAN HOOGLEERAAR IN DE FACULTEIT DER GENEESKUNDE VOLGENS BESLUIT VAN DEN SENAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE TE VERDEDIGEN OP DINSDAG 14 JANUARI 1913 DES NAMIDDAGS TE 4 UUR DOOR **JOHAN ABRAHAM BIERENS DE HAAN** GEBOREN TE HAARLEM

P. DEN BOER
SENATUS VETERANORUM TYPOGRAPHUS ET LIBRORUM EDITOR
UTRECHT — 1913

VOORWOORD.

„Die Entwickelungsgeschichte muss zu einer Gesetzeswissenschaft gemacht werden." (ROUX).

In de inleiding tot zijn Règne Animal, getiteld: „De l'histoire naturelle et de ses méthodes en général" deelt CUVIER de natuurwetenschappen in drie rubrieken in, waaraan hij een afdalenden graad van exactheid toekent: de „sciences de calcul", de „sciences d'experience" en de „sciences d'observation". De Biologie plaatst hij daarbij in de laatste en laagste klasse, met de verzuchting dat zij „restera long-temps, dans un grand nombre de ses parties, une science toute d'observation". Doch dat hij niet bij dien toestand berusten wil, blijkt wel daaruit, dat hij er eenige bladzijden verder aan toevoegt: „En établissant entre elles des degrés très differens de certitude, elles indiquent en même temps le but auquel les deux dernières de ces sciences doivent tendre pour s'élever de plus en plus vers la perfection".

Het zou CUVIER zeker verheugd hebben indien hij had kunnen zien, hoe een der onderdeelen der Biologie, met name de ontwikkelingsleer, er in de laatste kwarteeuw naar streeft zich naar eene hoogere volmaaktheid, in den door hem bedoelden zin, te ver-

heffen. Hoewel de descriptieve methode vele belangrijke feiten aan het licht gebracht heeft voor het door haar gestelde probleem, n.l. het onderzoek naar de opbouwing van den organischen vorm (het zoo plastische woord „Formbildung" is niet direct in het Nederlandsch te vertalen), meent toch eene groep vooral Duitsche en Amerikaansche Zoölogen dat een meer volmaakt inzicht in die opbouwing slechts verkregen worden kan uit experimenten, die op eene causale analyse van de ontwikkelingsverschijnselen gericht zijn. De kennis, die hier uit verkregen wordt, zal zich tot de resultaten der descriptieve embryologie ongeveer verhouden, als de valwetten van NEWTON staan tot de beschrijving van eene groep vallende lichamen. In beide gevallen immers komt men door het descriptieve onderzoek niet verder dan tot r e g e l e n, meerderheidsgevallen waarop vaak uitzonderingen voorkomen; het causale onderzoek daarentegen dringt door tot w e t t e n, die zonder uitzondering gelden moeten. Het doel van al het geexperimenteer is dus, van de ontwikkelingsleer eene „Gesetzeswissenschaft" te maken.

In hoever nu de uitkomsten dezer „Ontwikkelingsmechanica" in die korte periode aan de verwachtingen beantwoord hebben, doet hier weinig ter zake; als doelbewuste verbetering in de methode is zij in elk geval toe te juichen. Daarom moet het verwondering wekken, dat deze nieuwe tak van wetenschap in Nederland, waar toch ten allen tijde eene zoo vruchtbare belangstelling voor de de-

scriptieve embryologie merkbaar was, zoo weinig ingang heeft gevonden. Zoo goed als nooit heeft eene experimenteel embryologische publicatie van de hand van een Nederlandsch auteur het licht gezien, aan geen Nederlandsche Universiteit wordt geregeld onderwijs er in gegeven, of bestaat voor beginnenden gelegenheid onder leiding te werken. En ook het particulier initiatief heeft bij ons (in tegenstelling tot Amerika en Oostenrijk) niet getracht, in deze leemte aan onze Universiteiten te voorzien.

Een proefschrift eigent zich uit den aard der zaak niet, het goed recht van eene bepaalde vraagstelling of methode te bewijzen. Toch zou het eene voldoening voor den schrijver van dit proefschrift zijn, indien daardoor misschien ten onzent eenige belangstelling in deze verjongde Embryologie kon worden gewekt, geloovend, met YVES DELAGE, dat „l'avenir, en Biologie, est aux recherches expérimentales".

* * *

Het schrijven van dit proefschrift is mij eene welkome gelegenheid mijn dank te betuigen aan allen, die mij geleid hebben langs mijn, wel eens wat kronkelend, studiepad; vooral aan de Biologische Hoogleeraren WICHMANN, NIERSTRASZ, WENT en HUBRECHT. In het bijzonder denk ik hierbij aan Professor WENT, aan wiens colleges en persoonlijken omgang ik mijne voorliefde voor de experimenteele methode dank, en aan mijn hooggeachten Promotor,

Professor HUBRECHT, die mij onder de bekoring wist te brengen van de wijde uitzichtpunten, die het onderzoek naar de ontogenetische ontwikkeling der dieren zoo voortdurend biedt. Ten zeerste hoop ik dat, nu ik dreig af te dwalen in eene richting, die hem niet onverdeeld sympathiek is, ik hem toch steeds als mijn Mentor zal mogen blijven beschouwen; de ruime opvatting van het Promotorschap, door hem bij deze gelegenheid aan den dag gelegd, doet mij echter ook voor de toekomst niet vreezen.

INHOUD.

Bladz.

I. Inleiding 1

II. Methode en materiaal 12

III. Eiversmeltingen 17

A. Spontane eiversmeltingen 17

B. Experimenteele versmelting van onbevruchte eieren 19

C. Versmelting van bevruchte eieren . 25

D. Ascaris-type en Philine-type . . . 29

IV. Versmeltingen op latere ontwikkelingsstadiën 33

A. Algemeen deel 33

B. Paracentrotus lividus 67

C. Parechinus microtuberculatus en miliaris 78

D. Arbacia pustulosa 83

E. Sphaerechinus granularis 84

V. Heterogene versmeltingen 94

VI. Slotbeschouwingen 101

VII. Samenvatting der resultaten 112

Literatuur 115

I. INLEIDING.

Ofschoon in het algemeen de regel geldt, dat eenerzijds uit een ei slechts één geslachtsrijp individu ontstaat, anderzijds ook een individu uit slechts één ei oorsprong genomen heeft, komen toch reeds in de natuur uitzonderingen op deze regels voor. Zoo kunnen, zelfs wanneer men van generatiewisseling in engeren zin afziet, door latere deelingen meer dan één individu opgebouwd worden uit hetgeen oorspronkelijk uitgangspunt voor slechts één geweest was. Reeds voor zestig jaren vond BUSCH dit bij de Scyphomeduse Chrysaora, waar de jonge planulae zich vaak in twee deelen splitsten, uit welke deelen dan poliepen ontstonden [BUSCH, 1851]. Eene dergelijke splitsing treedt bij de Hydrozoe Oceania armata in het blastulastadium op [METSCHNIKOFF, 1886], en bij Lumbricus trapezoides op het gastrulastadium [KLEINENBERG, 1879]. Ook bij ectoprocte Bryozoa (zie KORSCHELT und HEIDER, 1910) en bij parasitische Hymenoptera [MARCHAL, 1904] zijn soortgelijke

verschijnselen waargenomen, bij de Cyclostomata is het door BATAILLON [1900] beschreven, en zelfs bij de Zoogdieren (ordo Xenarthra) hebben KÖLLIKER [1876] en MILNE EDWARDS [1879] voor Tatusia novemcincta, VON JHERING [1886] en onlangs FERNANDEZ [1909] voor Tatusia hybrida kunnen aantoonen, dat daar het klievende ei zich geregeld in vier, respectievelijk acht tot elf deelen splitst, waaruit zich dan ten slotte meerdere embryonen van hetzelfde geslacht, ieder met eigen amnion en tezamen in één gemeenschappelijk chorion ontwikkelen, zoodat men in dit geval zelfs van „spezifische Polyembryonie" spreken kan.

Het kan hier nagelaten worden te onderzoeken, in hoever al deze door VON JHERING als „Temnogenesis" samengevatte verschijnselen eene overeenkomst met generatiewisseling vertoonen (VON JHERING wilde zelfs de tweelingen van gelijk geslacht bij den mensch als een geval van facultatieve generatiewisseling opvatten); in beide gevallen is echter het resultaat, dat meer geslachtsrijpe individuen gevormd worden dan er eieren bevrucht waren.

In eene lange reeks experimenten hebben latere onderzoekers er naar gestreefd, representanten van verschillende dierklassen eene meer of minder volledige scheiding van blastomeren of blastomerencomplexen (dus een kunstmatige temnogenesis) op te dringen. Voor de eerste maal is dit wel aan HAECKEL gelukt, die reeds in 1867 blastulae van de Siphonophore Crys-

tallodes in stukken sneed, en uit de grootere stukken normale larven opkweekte [HAECKEL, 1869]. Het meest bekend zijn op dit gebied de klassieke proeven van ROUX [1888] en O. HERTWIG [1893] met kikvorscheieren, en van DRIESCH [1892 en 1893] met eieren van Echinodermen geworden. Door al dergelijke proeven werd bewezen, dat de blastomeren van zeer vele dieren grootere potentie hebben, dan bij de normale ontwikkeling blijkt, en men dus, wanneer men deze potenties vrij maakt, uit het ei een grooter aantal individuen kan verkrijgen. Een dergelijk resultaat wordt ook, zij het op andere wijze, bereikt, wanneer volwassen individuen, die in stukken gesneden zijn, uit die stukken nieuwe individuen opbouwen (b.v. Planaria, Lumbricus, enz.).

Evenmin nu als de regel, dat uit één ei slechts één volwassen dier ontstaat, zonder uitzondering blijkt te zijn, blijft dit de tegengestelde regel, en ook over dit ontstaan van één individu uit meerdere eieren zijn door de waarneming van hetgeen in de natuur voorkwam de eerste gegevens aangebracht.

DE LACAZE-DUTHIERS had meermalen bij Gastropoden-larven dubbelmonstra gezien, en zich de vraag gesteld, of deze uit onvolledige scheiding van blastomeren, dan wel uit vereeniging van twee eieren ontstaan waren. Bij Philine aperta kon hij het laatste aantoonen [1875]; normalerwijze legt volgens hem dit dier slechts één ei in elke eischaal, doch soms, en in 't bijzonder als men het bij het eierleggen hindert, wel twee of meer in elke schaal, die

in het begin volkomen vrij zijn, doch bij het uitgroeien verkleven en tenslotte op verschillende wijzen versmelten kunnen [1]).

METSCHNIKOFF vond later [1886] iets dergelijks bij de Hydrozoe Mitrocoma Annae. Hier verkleefden vaak twee of drie blastulae tot volledige versmelting, wat soms aanleiding gaf tot het vormen van normaal gebouwde reuzen-planulae. Uit deze eenheids-reuzenlarven ontwikkelde zich echter eene Hydrorhiza als uit de normale larven, waardoor het bij-

1) Later hebben ook GUIART [1901] en TUR [1910] deze dubbelmonstra beschreven. Volgens den laatsten maakt het geen verschil of men de dieren tijdens het leggen hindert: normaal-leggende wijfjes bleven één ei in elke schaal leggen, zelfs wanneer ze tijdens het leggen heftig geëlectriseerd werden; daarentegen vormen „monstripare" individuen ook in gunstige omstandigheden een groot procent pluriovulaire eischalen. Ook kan men het verkleven en vergroeien niet zonder meer op gebrek aan ruimte terugbrengen: dubbellarven werden ook dan gevormd als er in de schaal genoeg ruimte voor twee was, en in de meeste schalen met meerdere eieren werden meerdere vrije Veligerlarven gevormd.

Tijdens mijn verblijf in Roscoff heb ik langen tijd beproefd Philines in handen te krijgen, doch tevergeefs: het anders in groote hoeveelheden optredende dier was in den zomer van 1912 spoorloos verdwenen. Tenslotte heeft men mij van eene nieuwe vindplaats toch nog enkele eierleggende exemplaren gebracht. Hiervan waren eenige monstripaar, d. w. z. bijna alle schalen bevatten twee of meer eieren, hoewel de dieren in 't minst niet gestoord waren. Slechts schijnt TUR over het hoofd gezien te hebben dat de schalen die meer eieren bevatten werkelijk grooter zijn dan die met eén ei; terwijl de laatste 11 × 11 deelstrepen van den oculair micrometer groot zijn, maten bijv. twee-eiige 12 × 20, hadden dus ongeveer het dubbele volumen. Dat in zulke schalen twee vrije Veligers zich ontwikkelen is niet te verwonderen; de oorzaken van de vergroeiingen blijven echter raadselachtig.

zondere van hunne ontstaanswijze weder verloren ging.

Een derde object, waarbij spontane kiemversmeltingen voorkomen, is Ascaris megalocephala. Hier werden ze voor 't eerst gezien en afgebeeld door CARNOY [1886], die ze echter voor eene ongewone wijze van deeling hield. Beter begrepen het de latere onderzoekers SALA [1895] en ZUR STRASSEN [1896 en 1898]. SALA onderscheidde twee typen bij deze dubbelvormen: de eenen waren, volgens hem, spontaan ontstaan, doordat bij laatste deeling van een oerei wel de kernen uiteengingen, doch de plasmalichamen samen bleven hangen (dus splitsings- en geen vergroeiingstweelingen), eene andere kategorie kreeg hij kunstmatig door inwerking van lage temperaturen op de levende dieren, waardoor de constitutie der eischalen veranderde, en bij onderlinge aanraking meerdere eieren verkleefden en tenslotte versmolten. Bij geen van beide soorten kon hij een ontwikkeling aantoonen, verder dan de vorming van de eerste klievingsspoel. Eerst ZUR STRASSEN gelukte het, de ontwikkeling dezer reuzeneieren te vervolgen: naar omstandigheden kwamen hieruit tweelingen of enkelvoudige reuzenembryonen. Echter verwierp hij de eerste kategorie van SALA, en nam aan dat al die reuzen door versmelting ontstaan waren, welke versmeltingen niet het gevolg van zijn experimenteeren waren, daar hij de meeste reuzeneieren in den uterus der wijfjes vond, zonder dat hij deze in abnormale omstandigheden gebracht had.

Tenslotte vond KORSCHELT [1895] eenige malen

in sterk met eieren gevulde segmenten van den Polychaet Ophryotrocha puerilis eiversmeltingen, die zich meestal onregelmatig deelden. Doch ook hij beschikte slechts over gefixeerd ei-materiaal, zoodat er over de mogelijkheid van ontwikkeling geene zekerheid bestaat.

Direct moge hier de aandacht gevestigd worden op een verschil in de wordingswijze van deze reuzenlarven: terwijl bij Philine en Mitrocoma de vereenigingen eerst op latere ontwikkelingsstadiën plaats vonden, versmolten bij Ascaris slechts bij uitzondering gedeelde, meestal ongedeelde en zelfs onbevruchte eieren. Slechts uit die, welke vóór de bevruchting versmolten en daarna monosperm bevrucht waren, ontstonden hier de reuzen-eenheidslarven. Dit onderscheid is niet zonder beteekenis: slechts in het geval van Ascaris vindt eene werkelijke versmelting plaats, vereenigen zich inderdaad twee plasmalichamen; in het andere geval is het woord „versmelting" overdrachtelijk op te vatten, daar wel de cellen zich tegen elkaar leggen, maar het plasma van beide individuen gescheiden blijft.

Het is te begrijpen, dat de belangrijkheid van deze verschijnselen de experimenteerende zoölogen tot nabootsing er van aan andere objecten aanzette. De eerste, die (reeds in 1893) beproefde Echinideneieren tot versmelting te brengen, was Driesch [1])

1) In elk geval was DRIESCH de eerste die zijne negatieve resultaten publiceerde, ook BOVERI heeft het langen tijd tevergeefs beproefd [BOVERI, 1901].

[1895], doch had hij slechts negatief resultaat, daar wel de membraanlooze eieren onderling samenkleefden en als een epithelium afplatten, doch de latere klievingsholten in die kiemen zich nooit met elkaar vereenigden. Voorts zag HERBST [1893] onder meer of minder pathologische [1]) plutei en blastulae, die zich in een medium met verhoogd KCl- of $CaCl_2$-gehalte ontwikkeld hadden, eenige spontane versmeltingen optreden. Eerst MORGAN [1896] gelukte het, werkelijke versmelting van Echinidenkiemen tot stand te brengen: door schudden beroofde hij de eieren van Sphaerechinus granularis ten behoeve van andere proeven van hunne bevruchtingsmembranen, en vond daarna in zijne culturen eenige blastulae van grooter volumen dan de normale. Deze dubbelvormen stulpten twee darmen in, eén van die twee kon echter den ander voorbij groeien, en door rudimentair blijven van een der beide skeletten kon dan een schijn van eenheid bereikt worden.

Het uitvoerigst zijn deze versmeltingen door DRIESCH in zijne beide publicaties [1900 en 1910] beschreven. Het technisch nieuwe, dat hij hierbij invoerde, was het gebruik maken van alkalisch kalkvrij zeewater, waardoor de, door schudden van hunne membraan beroofde en al een weinig

1) Pathologisch waren ook de versmeltingen, die FÜHNER later in ureum- en butylalkohol-oplossingen vond. In het gunstigste geval kon hij van deze producten slechts zeggen, dat ze zich nog aktief bewogen [FÜHNER, 1905].

verkleefde, eieren zich intensiever vereenigden en in grooteren getale dan bij MORGAN tweelingen vormden. In hetgeen volgt zullen we nog meermalen op DRIESCH' publicaties terugkomen, het zij voldoende hier nog te vermelden dat hij met Sphaerechinus en (Par) Echinus microtuberculatus werkte, en van beiden ten slotte een aantal „eenheids-plutei" kreeg, d. w. z. plutei, die geheel als de normale gebouwd waren, en slechts door hunne grootere afmetingen zich van de gewone plutei onderscheidden.

Ook bij andere dieren heeft men dergelijke resultaten verkregen. LOEB [1901] vond bij eieren van Chaetopterus, die zich in oplossingen met KCl parthenogenetisch ontwikkelden, versmeltingen, waaruit vergroeide Trochophoren of ook eenheidsreuzen kwamen; en LILLIE [1902] kreeg in dezelfde omstandigheden bij hetzelfde dier versmeltingen op groote schaal tot honderd stuks toe, echter zonder dat klieving optrad. Zeer merkwaardig was, wat JANSSENS [1904] bij Arbacia meende te vinden. Tusschen eieren, die in het einde der rijpheidsperiode gelegd waren, vond hij vaak grootere plasmaklompen, waarin resten van eieren op verschillende ontwikkelingsstadien ingebed waren. Terecht hield hij deze „Syrphoplasmen" voor degeneratieproducten der ovariumweefsels, tengevolge van het afloopen van den rijpheidstijd. Deze degeneratieproducten waren begrijpelijkerwijze niet tot ontwikkeling in staat, hoewel spermatozoën daarin binnendrongen, maar hij vond wel dat eieren,

die door behandeling met hypotonisch zeewater gebarsten waren en een extraovaat gevormd hadden, zich hiermee aan de syrphoplasmen vasthechtten, en uit deze combinaties zich reuzenblastulae en -plutei ontwikkelden. Dit alles is wel te aanvaarden, hoe licht kunnen niet de veranderingen, die aan 't einde der rijpheidstijd in het eiplasma optreden, er oorzaak van zijn dat samenklevende eieren zonder bijzondere bewerking versmelten, zooals ook onbevruchte eieren het in zulke omstandigheden doen kunnen (zie bladz. 19). Hetgeen mij echter minder waarschijnlijk voorkomt is, dat volgens JANSSENS de syrphoplasmen hierbij eene directe rol spelen zouden, dat dus degenereerende ovariumcellen direct omgezet zouden worden in deelen van het jonge organisme. Heeft JANSSENS echter wel uit eén ei met syrphoplasma-aanhang reuzenlarven opgekweekt?

Ik heb zelf nooit deze syrphoplasmen bij Arbacia kunnen vinden, wat wel een gevolg daarvan zijn kan, dat ik te vroeg in het seizoen er naar zocht. Zeker ben ik echter, dat JANSSENS ongelijk heeft, wanneer hij aan zijne uitkomsten eene meer algemeene waarde toekent en meent, dat reuzenvormen slechts onder medewerking van zulke afvalproducten tot stand komen. Mijne tweelingen zijn steeds uit twee verkleefde eieren of blastulae ontstaan, zonder eenige vermenging met vreemde elementen, en indien eens een weefseldeeltje tusschen de eieren kwam, die ik gebruiken wilde (wat overigens in zeer geringe mate geschiedt, wanneer men bij het gebruik maken

van met rijpe eieren gevulde ovariën deze zonder schudden zich zelf laat ledigen), vischte ik het er vóór de bevruchting uit, om het water zoo zuiver mogelijk te houden. Wel heb ik bij gelegenheid opgemerkt, dat in het water zich bevindende stofdeeltjes eene, zij het ook geringe, rol speelden als verklevingscentren, en het schijnt mij toe dat JANSSENS' weefselderivaten ook slechts als zoodanig op te vatten zijn.

* * *

Dat een individu opgebouwd kan worden uit brokstukken van andere individuen, die uit verschillende eieren zich ontwikkeld hebben, was reeds lang door de vele transplantatie-resultaten bewezen. In 't bijzonder zijn hier de heteroplastische transplantaties van gewicht, waarbij de vereenigde deelen aan dieren van verschillende species ontnomen waren. Door deze mogelijkheid der heterogene combinatie wordt het probleem der verbinding van twee individuen veel gewichtiger dan het boven besprokene van de splitsing eener individualiteit, en als men de bekende Chimaeren-achtige individuen beschouwt, als ze b.v. BORN [1897] uit Rana esculenta en Rana arvalis of zelfs Bombinator igneus opgebouwd heeft, dringt de vraag zich op of zulke verbindingen slechts bij deelstukken van verschillende dieren gelukken, of dat men de bovenvermelde resultaten van

kiemversmeltingen in deze richting uit kan breiden, en zoo een blijvende vereeniging van twee g e h e e l e individuen van verschillende species tot stand brengen. Hier in 't bijzonder zouden de bovengenoemde eenheids-plutei zeer merkwaardig kunnen zijn.

De taak, die ik mij voor mijn verblijf aan zee gesteld had, was voornamelijk te trachten deze heterogene versmeltingen te verkrijgen, en verder de resultaten van DRIESCH over andere species uit te breiden. Echter heb ik mij voor mijn hoofddoel met vrij karige uitkomsten tevreden moeten stellen: zeer veel meer dan de mogelijkheid van het door mij gezochte heb ik niet kunnen aantoonen. Daarentegen ben ik door de beschouwing van de gemakkelijker te verkrijgen homogene versmeltingen tot eenigszins andere inzichten gekomen dan DRIESCH destijds.

II. METHODE EN MATERIAAL.

Voor de nauwe aaneensluiting der jonge kiemen is de, direct na het binnendringen van het spermatozoön gevormde, taaie bevruchtingsmembraan een gewichtig mechanisch beletsel. Op twee wijzen kan men echter dezen hinderpaal uit den weg ruimen: men kan n.l. door schudden de membranen der bevruchte eieren verwijderen, òf wachten tot de larven zelf hunne omhulsels verbreken, wat op een vroeg blastulastadium geschiedt. Beide methoden hebben hunne nadeelen: in het eerste geval gelukt het niet, alle eieren van de membraan te bevrijden, vooral bij Paracentrotus wordt deze weldra zeer taai en moeilijk af te schudden, terwijl bij sterker bewegen de eieren zelf vaak beschadigd worden. Het is dus gemakkelijker den larven zelf dit werk over te laten, maar dan heeft men weer het nadeel te moeten werken met reeds verder ontwikkelde organismen (kort daarop wordt mesenchym gevormd en begint de darminstulping), waarvan men verwachten moet dat de meerdere differentiatie een afnemen van de bruikbaarheid voor het experiment ten gevolge heeft.

Meestal heb ik de door DRIESCH [1900] beschreven methode gevolgd. Direct na de bevruchting werden de eieren in glazen buisjes gebracht, en daarin ongeveer 30-maal sterk geschud. Nadat eenigen tijd gegeven was voor het bezinken, werd het normale zeewater afgezogen en door kalkvrij zeewater [1]) vervangen, dat, bv. door toevoeging van 10 druppels van een 0,5 % oplossing van Natronloog op 25 ccM, zwak alkalisch gemaakt was. Hierin bleven de eieren dan 15—60 minuten, daarna werden ze in een kultuurschaaltje met normaal zeewater teruggebracht. Het is mij nooit gelukt voor één der species een bepaald optimum te vinden. In 't algemeen heb ik, als DRIESCH, zeer sterk ondervonden dat we het maken van versmeltingen nog slechts weinig in de hand hebben, het procent der tweelingen blijft klein. Wel kan men door kleine veranderingen in de behandeling veroorzaken dat dit procent nog kleiner wordt, of dat men zelfs in 't geheel geene versmeltingen meer krijgt (hierover zal in een volgend hoofdstuk nog gesproken worden), maar aan de vergrooting van het aantal is niet veel te doen. Bovendien werken zulke verbeteringen in de methode ook niet onvoorwaardelijk zeker. Zoo kreeg ik b.v. eenige malen betere resultaten bij Paracentrotus door de eieren tijdens hun verblijf in het

---

1) Samengesteld volgens het recept van HERBST [1900]: 3 % NaCl; 0,08 % KCl; 0,66 % $MgSo_4$ en een spoor $MgHPo_4$ in gedistilleerd water.

kalkvrije medium te centrifugeeren, totdat weer eens een wijfje, ook na deze behandeling, geen enkele versmelting gaf. Men voelt duidelijk dat het toch inwendige factoren in de eieren zijn, die hier het gewichtigste woord spreken, en dat de uitwendige factoren slechts bij gunstige dispositie iets tot stand kunnen brengen. Met die dispositie is het echter vaak ook eigenaardig gesteld. Zoo kon ik eens uit de eieren van een Sphaerechinus wijfje 17 (dus vrij veel) versmeltingen isoleeren, terwijl de behandeling der blastulae uit de eieren van het zelfde wijfje geen enkele tweeling gaf. Omgekeerd isoleerde ik eens 20 versmeltingen uit blastulae van een Paracentrotus-wijfje, waarvan de eieren mij geen enkelen dubbelvorm opgeleverd hadden. En zelfs uit de eieren van een Sphaerechinus-wijfje, waarvan twee ongedeelde eieren versmolten waren, kreeg ik geen vereeniging meer na de eerste klieving.

Om vrijzwemmende blastulae te vereenigen centrifugeerde ik deze eenige minuten, zoog dan het normale zeewater af en bracht er het kunstmatige voor in de plaats. Ook om ze weer in normaal zeewater terug te brengen moesten ze gecentrifugeerd worden, zoodat ze dan nog eens sterk samengedrukt werden.

Mijne proeven heb ik voor het grootste gedeelte in de „Stazione Zoologica" te Napels gedurende de maanden Januari tot Mei 1912 uitgevoerd, en daarna nog gedurende enkele zomermaanden in het „Laboratoire Lacaze-Duthiers" te Roscoff voortgezet. Aan de

Middellandsche Zee stonden daartoe Parechinus [1]) microtuberculatus, Paracentrotus lividus, Sphaerechinus granularis en Arbacia pustulosa steeds in grooten getale ter mijner beschikking, aan de Bretonsche kust moest ik mij met Parechinus miliaris en Paracentrotus lividus tevreden stellen. Van Echinus esculentus, die daar ook vrij gemakkelijk te vinden is, heb ik nooit geslachtsprodukten kunnen krijgen, deze species schijnt eerder dan de beide anderen haar rijpheidsperiode te beeindigen. Dit was vooral daarom jammer, daar de vraag of misschien heterogene versmeltingen tusschen nader verwante soorten [2]) gemakkelijker tot stand komen dan tusschen verder afstaanden (wat mogelijk, maar volstrekt niet van zelf sprekend is), daardoor niet beantwoord worden kon.

Tusschen de eieren en larvenstadiën dezer soorten bestonden verschillen, die duidelijk genoeg waren

---

1) Hoewel nog vaak, vooral in publicaties over experimenteele embryologie, de oudere namen gebruikt worden, heeft het m. i. geen zin meer na het systematische werk van MORTENSEN [1903], wiens indeeling ook door MEISSNER in BRONN'S Klassen und Ordnungen gevolgd wordt, nog van Strongylocentrotus, event. Echinus (microtuberculatus en miliaris) te spreken.

2) Zooals bekend is, werden door MORTENSEN de geslachten Echinus en Paracentrotus in de onderfamilie der Echininae vereenigd, die met de onderfamilie der Parechininae (o. m. geslacht Parechinus) de familie der Echinidae vormt. Arbacia en Sphaerechinus behooren dan tot andere families, respect. de Arbaciidae en Toxopneustidae

om bij menging zonder veel moeite de tot ééne species behoorende terug te kunnen vinden. In het begin had ik een van de beide soorten door vitaalkleuring gemerkt (een $^1/_{20}$ % oplossing van neutraalrood bleek mij daarvoor het geschikste), later heb ik het echter nagelaten daar het overbodig was, en ook geen zekere resultaten gaf, aangezien na de menging de gekleurde larven hunne kleur gedeeltelijk weer aan het zeewater afgaven, en de ongekleurde dit dan weer meer of minder opnamen.

De teekeningen zijn allen tijdens het leven of direct na fixatie met een teekenapparaat gemaakt. Ter verdooving van de vlug rondzwemmende blastulae en plutei heb ik met goed gevolg cyaankalium gebruikt: eenige druppels van een 1 % oplossing zijn voldoende om de larven in een isolatiezoutvaatje spoedig tot rust te brengen, en als men ze na niet al te langen tijd weer in frisch water terugbrengt, zijn ze in enkele uren geheel van de inwerking van het gift hersteld.

III. EIVERSMELTINGEN.

A. Spontane eiversmeltingen.

Zooals reeds BOVERI [1901] meedeelt, worden van tijd tot tijd onder de eieren der Echiniden er enkele gevonden, uit wier grootere afmetingen men afleiden kan, dat ze uit twee of meer normalen vereenigd zijn. Indien zulke eieren zich na de bevruchting ontwikkelen — en BOVERI heeft geen reden, aan te nemen dat dat niet geschieden zou — zullen ze waarschijnlijk vormen vertoonen, die overeenkomen met de reuzen-eenheidsplutei van DRIESCH, en kunnen zoodoende, als ze onder de normale eieren van eene cultuur gemengd blijven, gevaarlijk worden voor de juiste beoordeeling van de versmeltings-resultaten.

Bij zijne latere proeven [1910] heeft DRIESCH dan ook steeds voor verontreiniging zijner culturen door reuzeneieren gewaakt.

Ook ik heb vóór elke bevruchting in mijne culturen naar reuzeneieren gezocht, ook omdat ik ze voor andere doeleinden gebruiken wilde. Toch heb ik

slechts eenmaal, en wel bij Paracentrotus, er een gevonden. Dit mat 8,5 deelstrepen [1]) in diameter, terwijl de normalen er 6,5 à 7 telden, wat voor de stralen eene verhouding van 1,26 : 1 of $\sqrt{2}$: 1 geeft. De oorzaak van deze verhouding is gemakkelijk te begrijpen, men bedenke slechts dat hier twee even groote bolvormige lichamen samengesmolten zijn tot een nieuw bolvormig lichaam. Met eigen sperma bevrucht heeft het zich slechts tot het blastulastadium ontwikkeld, en begon er weldra ongezond uit te zien. Voorzichtigheidshalve heb ik de overige eieren van hetzelfde wijfje niet voor verdere proeven gebruikt.

Hoe ontstaan zulke spontane versmeltingen? Dat het door druk bij het uitnemen van de ovarien zou zijn, is niet waarschijnlijk. HERBST vond in Napels vaak reuzeneieren van Parechinus bij zijne culturen in Mei, dus aan het eind van de periode der geslachtsrijpheid, en in gelijke omstandigheden vond JANSSENS [1904] ze bij Arbacia. Zooals men in een volgend hoofdstuk nog zien zal, zijn de eieren in die omstandigheden zeer tot versmelting gedisponeerd. Daar ik het reuzenei echter in Maart, dus midden in de rijpheidsperiode, vond, mag men zijn ontstaan niet uitsluitend als een degeneratieverschijnsel opvatten. Misschien speelt eene verhoogde alkaliniteit van het omgevende zeewater hierbij eene rol.

---

1) Een deelstreep van den oculair-micrometer bij Zeiss Obj. A Oc. 2 is equivalent met 16,2 mikron.

B. Experimenteele versmelting van onbevruchte eieren.

Het lag nu voor de hand te beproeven, op experimenteelen weg onbevruchte eieren tot versmelting te brengen. Dit was reeds aan DRIESCH [1904] gelukt met eieren van Parechinus, die hij in de tweede helft van Mei, dus ook weer aan 't einde der rijpheidsperiode, in gewoon zeewater, doch „recht dicht gedrängt", had laten liggen. Na de bevruchting ontwikkelde zich slechts de helft daarvan, en slechts drie kwamen voorbij het blastulastadium. Elk van die drie blastulae stulpte twee darmen in.

Op dezelfde wijze als DRIESCH bij Parechinus microtuberculatus heb ik bij Parechinus miliaris, die in Roscoff in Juli aan 't eind van zijn rijpheidstijd is, versmeltingen van onbevruchte eieren gekregen. Laat men zulke eieren samenliggen, dan ziet men reeds na korten tijd, dat er ophoopingen tot stand komen en ze tegen elkaar afgeplat worden. De eerste oorzaak van deze ophoopingen moeten wel kleine bewegingen van het cultuurschaaltje of de tafel zijn, in elk geval was het niet noodig ze dicht bijeen te laten liggen. Na ongeveer 40 uren begonnen de eieren van Parechinus miliaris zich te vereenigen: plotseling ziet men dan een grenslijn verdwijnen, het dubbele ei krijgt daardoor een zandloopervorm, die hoe langer hoe meer zich tot een bolvorm afrondt, en in enkele minuten heeft zich uit de twee afgeplatte één rond, tweekernig reuzenei

gevormd. Eerst zijn in het reuzenei de beide plasmata nog scherp van elkaar gescheiden (door een klein verschil in kleur van beiderlei plasma is deze grens duidelijk te zien), maar in korten tijd verdwijnt ook deze afscheiding, zoodat men dan een werkelijke vermenging van beider plasma aannemen moet. Later komen ook de kernen meer of minder dicht bij elkaar, of ze echter ook versmelten is aan het levend object nooit volkomen zeker te zeggen, hoewel soms een kernversmelting mij zeer waarschijnlijk voorkwam. Daar het mij van grooter gewicht scheen de verdere ontwikkeling van het reuzenei te vervolgen, en ik bovendien nooit over zeer veel materiaal beschikken kan, moest ik tot mijn spijt van cytologisch onderzoek afzien.

Als eenmaal eieren zijn begonnen te versmelten, volgen er weldra meerderen op verschillende plaatsen in het cultuurschaaltje, en men krijgt een aantal van dergelijke, niet slechts uit twee, maar ook uit meer samengestelde reuzen. Evenals bij spontane reuzeneieren, was ook hier het volumen evenredig met de „kiemwaarde": een ei b.v. dat 15 deelstrepen mat, terwijl de normale er 8,5—9 maten, had 5 kernen, was dus blijkbaar uit vijf versmolten, terwijl zijn radius 15 : 8,75 = 1,71 maal zoo groot was als de normale (1,71 = $\sqrt[3]{5}$). Ook een achtvoudige met dubbelen diameter (17,5 deelstrepen) kwam voor.

Na de bevruchting zetten deze eieren geen membranen af, evenmin als de normalen die men zoo

lang heeft laten liggen. Vaak deelden ze zich niet of zeer onregelmatig. Van 40 bevruchten brachten slechts 16 het tot slecht uitziende blastulae, hiervan werden 8 gastrula [1]), allen echter stulpten slechts één darm in. Of misschien bij eenige hunner de pathologische toestand er oorzaak van was dat er niet later nog een tweeden darm ingestulpt werd, valt lastig uit te maken; dat dit bij allen het geval zijn zou is in elk geval niet zeer waarschijnlijk.

Echter is het mij bij Sphaerechinus gelukt, ook in Februari, dus midden in de rijpheidsperiode, onbevruchte eieren tot versmelting te brengen, door ze in met Na OH alkalisch gemaakt zeewater te laten liggen, terwijl een contrôle-cultuur in normaal zeewater zonder meer te gronde ging. Bij anderen, b.v. bij Paracentrotus of Parechinus microtuberculatus gelukte mij dat nooit, hier werden de eieren te snel onder invloed van het alkali gecytolyseerd.

De Sphaerechinus-eieren waren reeds na eenige uren verkleefd en afgeplat, en den volgenden morgen (na ± 19 uur) vond men meerkernige reuzen, waarbij de drielingen 40 deelstrepen [2]), de tweelingen 35, de enkelvoudigen daarentegen 28 maten, zoodat men hier de verhoudingen 1,44 = $\sqrt[3]{3}$ en 1,26 = $\sqrt[3]{2}$

---

1) De verhoudingen in de afmetingen waren op latere stadien niet meer zoo duidelijk, toch bleef ongeveer de relatie $\sqrt[3]{n}:1$ bewaard.

2) Een deelstreep van den oculair-micrometer bij Zeiss Obj. D Oc. 2 is equivalent met 3,8 mikron.

vrij nauwkeurig terugvindt (Fig. 1). Evenals bij de boven beschreven Parechinus-reuzeneieren was ook hier de samenhang vrij los, zoodat bij het overpipetteeren enkele uiteenvielen.

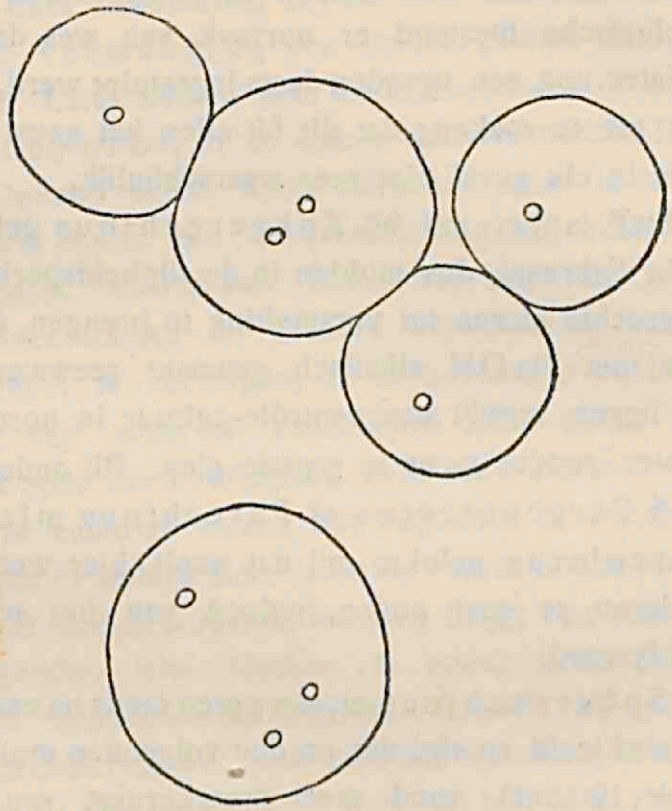


FIG. 1. Sphaerechinus granularis. Verklevingen en versmeltingen van onbevruchte eieren. Afmetingen respect. 28, 35 en 40 deelstrepen. Zeiss Obj. D Oc. 2, daarna op $^2/_3$ verkleind. Vergrooting dus thans 150 ×.

Van deze dubbeleieren heb ik getracht tien tweelingen, waarvan drie waarschijnlijk éénkernig waren (ook hier durf ik mij niet zeker over de kernversmelting uit te spreken) met Paracentrotus-

sperma te bastaardeeren. Een bevruchtingsmembraan was niet te zien, en werd waarschijnlijk ook niet afgezet, want ook na de isolatie en bevruchting (in normaal zeewater) kwamen er nog enkele versmeltingen voor tusschen de geisoleerden, waardoor er nog een drieling en een vierling gevormd werden. Van deze bastaarden bracht slechts één het tot een ziekelijke blastula.

Verder werden 18 tweelingen, waarvan één als „waarschijnlijk éénkernig" genoteerd werd, met Parechinus-sperma bevrucht, hierbij werd in 't algemeen een membraan zichtbaar. Toch bleef ook hier het resultaat der bevruchting gering: slechts twee bereikten het blastulastadium, één van deze twee stulpte een enkelen darm in, en vormde zes dagen na de bevruchting zelfs skelet-driestralen, doch ontwikkelde verder zeer weinig skelet. Op dit stadium mat hij 16 deelstrepen (Obj. A. Oc. 2), normale gastrulae uit eene andere cultuur [1]) op ongeveer gelijk ontwikkelingsstadium maten er 13. Ditmaal is de verhouding 1,23, komt dus dicht bij de waarde $1{,}26 = \sqrt[3]{2}$, het tekort mogen we op rekening schuiven van het feit, dat de eenigszins ongezonde reuzengastrula wel niet geheel uitgegroeid was.

---

1) Ter vergelijking der afmetingen heb ik steeds met de reuzen-larven eenige normale uit dezelfde cultuur geisoleerd en dan onder hen de grootten vergeleken, om zoo goed mogelijk ongelijke omstandigheden te vermijden. Daar ditmaal de dubbelgastrula de eenig overlevende was, moest ik noodzakelijk van dit principe afwijken.

Deze enkelvoudige reus was niet degene, die als „waarschijnlijk eenkernig" genoteerd stond. Toch ligt het voor de hand aan te nemen, dat ook hier eene kernversmelting, misschien na de bevruchting, plaats gevonden had, en dit juist de oorzaak was, dat hij, in tegenstelling tot hetgeen DRIESCH waarnam, van den aanvang af zich als een eenheid gedroeg, en niet door instulping van een tweeden darm zijn dubbelen oorsprong te voorschijn bracht. Want dat hier een tweede darminstulping uit pathologische oorzaken achterwege bleef, zooals dat bij de boven beschreven P a r e c h i n u s-dubbeleieren mogelijk geacht werd, schijnt mij niet zeer waarschijnlijk, gelet op het feit dat de larve na instulping van den eersten darm nog lang genoeg in leven bleef.

Dat van 18 met eigen sperma bevruchte reuzeneieren slechts twee het blastulastadium bereikten, is waarschijnlijk toe te schrijven aan onregelmatige chromatineverdeeling, tengevolge van Poly-, respect. „Oligo"-spermie. Hoewel ik met verdund sperma bevrucht heb, is het binnendringen van meerdere spermatozoa in één ei tengevolge van de slechte afzetting der bevruchtingsmembraan niet uitgesloten. Omgekeerd is het ook niet uitgesloten dat in een ei, waar de twee kernen niet versmolten waren, slechts één spermatozoön binnendrong; ook dit kan eene onregelmatige chromatineverdeeling ten gevolge hebben, en al zulke onregelmatigheden hebben dan eene abnormale en tot geen resultaat leidende klieving tot resultaat [BOVERI, 1908]. Zoo hebben we dan wel

het recht aan te nemen, dat de beschreven één-darmige reuzengastrulae hun ontstaan te danken hebben aan reuzeneieren, waarin één spermatozoön met de uit twee kernen versmolten reuzenkern copuleerde, evenals dit bij Ascaris door ZUR STRASSEN [1898] aangetoond werd. Zekerheid kan in dezen echter slechts een cytologisch onderzoek geven.

C. Versmelting van bevruchte eieren.

Dat het mij ook slechts bij Sphaerechinus gelukt is, eene versmelting van twee bevruchte, maar nog ongedeelde, eieren waar te nemen, vindt gedeeltelijk wel zijn oorzaak in den langeren tijd, die deze species voor hare eerste klieving noodig heeft, waardoor aan de nog ongedeelde samenklevende eieren meer gelegenheid tot versmelten gegeven wordt. Want nadat de eerste deeling afgeloopen is, schijnt zich iets in de constitutie der blastomeren te veranderen: nooit heb ik een werkelijke blastomerenversmelting, d. w. z. een menging van het plasma van twee blastomeren van verschillende eieren, kunnen waarnemen.

Ook hier blijft de eigenlijke versmelting-veroorzakende factor onbekend. Hoe vaak ziet men niet verklevingen en zelfs sterke afplattingen van ongedeelde eieren, ook bij Sphaerechinus, en bijna altijd ontwikkelen deze zich geheel onafhankelijk. Ook kan men niet zeker zeggen dat lange inwerking van

alkalisch kalkvrij zeewater de eiversmelting bevordert, zooals ik eerst geloofde; want eens kwam het voor bij eene groep, die slechts 30 minuten in alkalisch kalkvrij zeewater gebleven was, terwijl ik bij het Sphaerechinus-wijfje, waarvan onbevruchte eieren versmolten waren, zelfs na 40 en 60 minuten

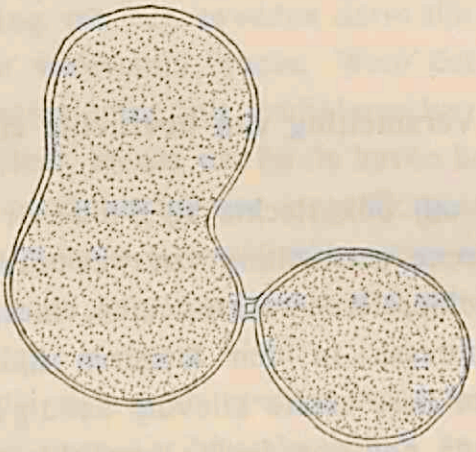


FIG. 2. Sphaerechinus granularis. Versmelting van twee bevruchte eieren, waar een derde mee verkleefd is. Beide duidelijk door verbindingsmembraan omgeven. Vergrooting 150 ×.

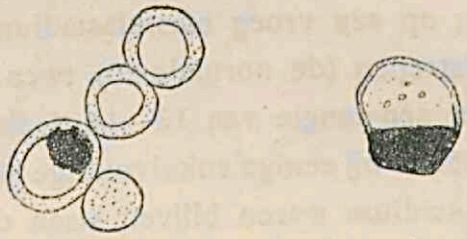
inwerking geen versmelting van bevruchte eieren aantrof.

De versmelting van twee bevruchte eieren vond altijd plaats eenigen tijd nadat deze uit het kalkvrije weer in het normale medium teruggebracht waren. Een verschil met de versmelting van onbevruchten is, dat hier de afronding van den vorm veel meer tijd in beslag neemt, en de zandlooppervorm van het dubbelei langeren tijd bewaard

blijft, wat op eene verandering van de physisch-chemische samenstelling van het eiplasma door de bevruchting duidt. In Fig. 2 ziet men een reuzenei op dit stadium, met een normaal als aanhangsel, dat zich toch onafhankelijk van het reuzenei ontwikkelde. Dit laatste was zelfs op het blastulastadium nog wat ingesnoerd, werd dan ovaal, en stulpte één darm in, korten tijd later werd het echter onhelder, en vormde geen skelet. Twee anderen uit dezelfde cultuur kwamen niet over het blastulastadium heen; op een vroeg blastulastadium maten ze 12—13 deelstrepen (de normale 10), twee dagen later waren ze tot een lengte van 13—14 deelstrepen uitgegroeid, terwijl bij eenige enkelvoudige blastulae, die ook op dit stadium waren blijven staan de diameter 11 deelstrepen bedroeg, zoodat ook hier tijdens de ontwikkeling de verhouding 1,26 : 1 of $\sqrt{3}$: 1 duidelijk voor den dag kwam.

Doch niet altijd ontwikkelden zich na de bevruchting versmolten eieren zoo regelmatig. Een dubbelei dat bij de isolatie nog duidelijk ingesnoerd was en twee gescheiden kernen vertoonde, had zich den volgenden morgen tot eene blastula ontwikkeld, waarvan één helft een gezond uiterlijk vertoonde, terwijl de andere helft er korrelig en ongezond uitzag. Deze toestand veranderde niet; nog eenige dagen bleef de blastula, gescheiden in eene zwarte en een normale helft, in leven, zonder een darm in te stulpen (Fig. 3). De oorzaak hiervan was mij niet duidelijk, ik dacht aan de mogelijkheid dat een der

twee eieren geinfecteerd geweest was, wat echter niet waarschijnlijk was, daar dan wegens de vermenging van het plasma het geheel er ongezond had moeten uitzien. De verklaring vond ik pas, toen ik bij een ander reuzenei de eerste klieving waarnam. Hierbij kwamen namelijk d r i e astrosphaeren voor den dag, en het ei deelde zich daarop in drie blastomeren, de klieving bleef onregelmatig en het blastulastadium werd niet bereikt.



a *b*

FIG. 3. Sphaerechinus granularis.

a. Verkleving van twee normale blastulae, een dubbelblastula en een ongedeeld ei. De reuzenblastula is voor de helft ongezond.

b. De reuzenblastula twee dagen later.

Beide Zeiss Obj. A Oc. 2, daarna op $^2/_3$ verkleind. Vergrooting dus thans 36 ×.

In het laatste geval nu had men een deeling volgens het Triastertype voor oogen, zooals BOVERI [1908] het bij disperm bevruchte eieren waarnam. Ook het geval, dat één deel der larve er gezond, en één deel ziek uitzag, is door hem als gevolg van onregelmatige chromatineverdeeling na disperme bevruchting waargenomen. Ofschoon ik in het eerste geval de stralingsfiguur en eerste klie-

ving niet gezien heb, mag men wel aannemen dat ook hier de abnormaliteit een gevolg van dispermie geweest is. Maar wat voor dispermie was het hier? Vrij waarschijnlijk waren na de versmelting twee mannelijke en twee vrouwelijke voorkernen in het dubbelei aanwezig, over de rest kan men slechts vermoedens uiten. Waren de beide eikernen versmolten, en de onregelmatigheid op die wijze een geval van gewone „reuzendispermie"? Of waren beiderzijds ei- en spermakern vereenigd, en hadden dan de spermacentra de chromosomen der beide gescheiden gebleven klievingskernen uiteengetrokken? Het is jammer dat wegens de zeldzaamheid der objecten met deze reuzeneieren voor cytologisch onderzoek voorloopig zoo weinig te beginnen is.

D. Ascaris-type en Philine-type.

Het was niet zonder reden, dat we al deze eiversmeltingen van de hieronder te bespreken versmeltingen op latere ontwikkelingsstadien afscheidden, daar aan de laatsten een ander ontwikkelingsprincipe ten grondslag ligt als aan de eersten. Men vindt bij dezen hetzelfde onderscheid terug als bij de in de natuur gevonden dubbelvormen: slechts bij de versmelting van ongedeelde eieren (Ascaris-type) vindt werkelijke plasmavermenging plaats (afgezien daarvan of zich de kernen vereenigen of niet), in het andere geval (Philine-type) blijven celplasma en kernen gescheiden, hoewel de weef-

sels eene eenheid kunnen vormen. Het eenige, wat zich in dit geval werkelijk mengt is de blastocoelvloeistof, waaraan toch wel niemand eene belangrijke beteekenis voor den opbouw der larve toe zal willen schrijven. Dat bij het tweede type aan de vereeniging altijd iets Chimaeren-achtigs (in de beteekenis die WINKLER aan dit woord gaf) blijft kleven, komt bijzonder duidelijk bij de heterogene versmeltingen voor den dag.

In één punt nu wordt dit onderscheid scherp uitgedrukt, n.l. in de relatieve dimensies van enkel- en dubbelvormen. DRIESCH [1900a] vond dat bij zijne uit $^1/_2$-blastomeren opgekweekte blastulae de stralen zich tot die van normale verhielden als $^1/_2\sqrt{2}:1$, of met andere woorden: de oppervlakken verhielden zich als de kiemwaarde. Aan den anderen kant vond hij, dat bij zijne dubbellarven de radien der versmolten en normale blastulae zich verhielden als $\sqrt{2}:1$, ook hier dus verhielden zich de oppervlakken als de kiemwaarde. Deze verhouding bleef tot het pluteusstadium, en zelfs in de verschillende organen der larve bewaard, iets wat ook ik steeds heb kunnen vaststellen, zooals later nog ter sprake komen zal. Verder kon hij aantoonen, dat in de $^1/_2$-larven het aantal mesenchymcellen de helft was van het normale getal, en dat de dichtheid der kernen in den darm van b.v. $^1/_4$-larve even groot was als bij den darm van een normale gastrula. Terecht trekt hij uit dit alles de conclusie dat de half-, respect. dubbellarven

opgebouwd waren uit cellen van normale afmetingen (dus ook oppervlakken), die echter in halven, respectievelijk dubbelen getale aanwezig waren. Hiermede kwam hij echter in tegenspraak tot ZUR STRASSEN [1898] die bij de Ascaris-reuzen gevonden had dat elk orgaan in typischen vorm en uit het typische aantal cellen gevormd was, doch deze grooter waren dan de normale.

Nu is bij het voorafgaande herhaaldelijk gebleken, dat niet alleen het reuzenei zelf zich tot een normaal ei verhoudt als $\sqrt[3]{2} : 1$, maar ook deze verhouding tijdens de ontwikkeling minstens tot in het gastrulastadium (verder ontwikkelden zich ditmaal de reuzen-eieren niet) behouden blijft. Hier blijft dus het volumen, niet het oppervlak, aan de kiemwaarde evenredig. Eene directe telling der cellen was natuurlijk uitgesloten, maar, in samenhang met hetgeen door ZUR STRASSEN waargenomen is, mag aangenomen worden, dat hiermee een principieel verschil in de ontwikkeling van de beide soorten van tweelingen geraakt wordt, en in de gevallen dat de uit ongedeelde eieren versmolten reuzenvormen zich ontwikkelen, de cellen der larve het dubbele volumen hebben van die van normale larven, maar in normalen getale voorkomen.

Later heeft DRIESCH [1902] er op gewezen, dat dit onderscheid tusschen zijne larven en die van ZUR STRASSEN door de wet van de constante verhouding tusschen kerngrootte en celgrootte te verklaren was. Bij ZUR STRASSEN's reuzeneieren was

n.l. een dubbelgroote kern ontstaan, en deze kon eene dubbelgroote cel beheerschen, zoodat de deelingsrythmus gelijk bleef aan die van het normale ei. Zoo vond ook BOVERI [1904], dat in Strongylocentrotus-gastrulae, die zich uit monastereieren ontwikkeld hadden, en waarvan dus de kernen eene dubbele hoeveelheid chromatine bevatten, en grooter waren dan in de normale gastrulae, deze kernen in geringere dichtheid verspreid waren dan in die normale gastrulae, en bij zijne partieel-thelykariotische larven was een dergelijk verschil in de beide helften van ééne larve waar te nemen [BOVERI, 1905]. Vaak heeft men er over gestreden of reuzen en dwergvormen, b.v. bij den mensch, uit een ongelijk aantal cellen opgebouwd waren, of dat verschillen in de celgrootte van dit verschil in afmetingen oorzaak waren, hier nu blijkt dat bij een en hetzelfde object beide ontwikkelingstypen mogelijk zijn, en dat de wijze, waarop de reuzenvormen tot stand kwamen, bij de keuze uit beide mogelijkheden den doorslag geeft.

Dit alles neemt niet weg dat er tusschen de beide typen een scherp verschil bestaan blijft, en we moeten toegeven, dat het Ascaristype, juist door zijn cellulairen bouw, een volkomener beeld van een reuzenlarve geeft dan het Philinetype.

IV. VERSMELTINGEN OP LATERE ONTWIKKELINGSSTADIËN.

A. Algemeen deel.

Zooals in een vorig hoofdstuk gezegd werd, heb ik meestal de door DRIESCH beschreven methode gevolgd, en getracht de membraanlooze kiemen door behandeling met alkalisch kalkvrij zeewater tot vereeniging te brengen. Het lag echter voor de hand te onderzoeken, welke der beide abnormale factoren, de kalkloosheid of de verhoogde alkaliniteit, voor het ontstaan der tweelingen aansprakelijk was, en na te gaan of misschien een van beiden gemist kon worden.

Hiertoe heb ik vrijzwemmende blastulae van Parechinus en Paracentrotus in kalkvrij zeewater gebracht, tot het onderling verband der cellen merkbaar losser begon te worden, en bij Paracentrotus zelfs enkele cellen den lichaamswand van de larve begonnen te verlaten. Een deel dier blastulae werd dan na centrifugeeren in normaal zeewater teruggebracht, een ander deel in zee-

water, dat op de gebruikelijke wijze alkalisch was gemaakt. Door het centrifugeeren waren de larven een weinig verkleefd, maar na enkele uren zwommen bij beide groepen allen vrij in het cultuurschaaltje rond. Eene andere proef, waarbij een deel der blastulae in alkalisch kalkvrij zeewater gebracht was, een ander deel daarentegen de inwerking van de kalkloosheid en de verhoogde alkaliniteit n a e l k a a r onderging, gaf een dergelijk resultaat: slechts de eerste groep bracht het tot verklevingen en versmeltingen. Ten slotte gaf eene poging om vrij zwemmende blastulae van P a r e c h i n u s en P a r a c e n t r o t u s te vereenigen, uitsluitend door toevoeging van NaOH bij het normale zeewater, geen resultaten, hoewel hierbij de larven tweemaal moesten gecentrifugeerd worden, zoodat men tenminste voor de blastulae moet aannemen, dat niet slechts b e i d e abnormale factoren voor het verkrijgen van versmeltingen noodig zijn, maar daarbij nog hunne g e l i j k t i j d i g e i n w e r k i n g komen moet.

Voor e i e r e n zijn de uitkomsten wat minder duidelijk, daar hier, zooals DRIESCH vond, het samendrukken als gevolg van het schudden reeds verkleving en onderlinge afplatting veroorzaken kan. MORGAN heeft zijne versmeltingen zelfs uit eieren verkregen, die hij slechts op die wijze bewerkt had, hoewel het feit, dat MORGAN ze min of meer toevallig vond en ze later niet meer krijgen kon, aan de waarde zijner methode afbreuk doet. Als ik nu van eene groep geschudde membraanlooze eieren de

eene helft in alkalisch kalkvrij, de andere in alkalisch kalkhoudend zeewater bracht, vond ik in beide gevallen verklevingen, in het tweede echter kwamen uit deze verklevingen slechts zeer weinig of in 't geheel geen versmeltingen. Wanneer men daarentegen, zooals mij eens overkwam, vergeet het kalkvrije water alkalisch te maken, dan krijgt men in 't algemeen zelfs geen verklevingen, ook niet indien men de eieren in het kalkvrije medium eenige minuten centrifugeert. Zoo is dus ook hier, om eene eenigszins beteekenende hoeveelheid versmeltingen te krijgen, inwerking van b e i d e factoren noodig. Dat echter reeds de toevoeging van NaOH bij normaal zeewater een zekere uitwerking hebben moet, blijkt uit de resultaten met o n b e v r u c h t e Sphaerechinus-eieren (die dus membraanloos zijn zonder de bevruchting en het schudden met hunne gevolgen doorgemaakt te hebben) en die, als in een vorig hoofdstuk beschreven, in zulk een medium versmolten, terwijl eene in normaal zeewater gebleven contrôlecultuur geen spoor zelfs van verkleving vertoonde.

Om nu nog te onderzoeken of ook bij eieren eene g e l i j k t i j d i g e inwerking van verhoogde alkaliniteit en kalkloosheid noodig is, deelde ik van hunne membraan beroofde eieren van P a r e c h i n u s m i c r o t u b e r c u l a t u s in drie groepen. De eerste groep werd gedurende 25 minuten in alkalisch kalkvrij zeewater gebracht, de tweede 25 minuten in kalkvrij zeewater zonder NaOH-toevoeging, en daarna, als de eerste, in normaal zeewater terug. De derde

ten slotte werd eerst gedurende 25 minuten in kalkvrij zeewater, daarna denzelfden tijd in alkalisch kalkhoudend, en vervolgens weer in normaal zeewater teruggebracht. De eerste groep leverde den volgenden morgen een groot aantal versmeltingen; de tweede — zooals na het bovenbeschrevene te verwachten was — zelfs geen verklevingen; terwijl de derde groep, om welker tegenstelling tot de eerste het hier te doen was, slechts enkele verklevingen gaf, die in den loop van den dag, toen de larven levendiger begonnen rond te zwemmen, zich weer geheel los maakten, zoodat daarmede ook voor eieren aangetoond werd, dat eene gelijktijdige inwerking van beide factoren, zoo al niet volstrekt noodzakelijk voor versmeltingen, toch in elk geval het middel is om deze in eenigszins voldoende aantal te krijgen.

Nog eene andere vraag kon gesteld worden. Zooals gezegd is bleven de eieren hoogstens een uur (meestal korter) in het kunstmatig medium, en werden dus vóór de eerste deeling in normaal zeewater teruggebracht. Zou het misschien mogelijk zijn, dat onder de nawerking van het abnormale medium wel versmeltingen tot stand komen, maar men er nog meer krijgen zou, indien de nawerking door eene directe werking tijdens de klieving gevolgd werd? Hoewel ik van het resultaat niet veel verwachtte, wilde ik toch niet nalaten het eenige malen met eieren van Parechinus miliaris te beproeven. Vier groepen eieren van een wijfje werden dus na

afschudden der membraan 25 minuten in alkalisch kalkvrij zeewater gebracht, daarna de eerste groep in normaal zeewater, de tweede in zeewater met NaOH-toevoeging, de derde in kalkvrij, de vierde in kalkvrij zeewater met NaOH, en gedurende de klieving daarin gelaten. Van de laatste groep deelde zich geen enkel ei, alle gingen aan cytolyse te gronde. Van de derde groep deelde zich ook niet alles, wat zich deelde viel echter tot een hoopje losse blastomeren uiteen, zooals het door HERBST [1900] beschreven is. Ook die in normaal alkalisch zeewater gebleven waren ontwikkelden zich slecht, hierbij kwamen slechts enkele pathologische korrelige tweelingen voor. Daarentegen leverden de na de eerste behandeling in normaal zeewater teruggebrachten het gewone quantum versmeltingen. Dit bewijst dus dat het geen verbetering geeft, indien men tijdens de klieving de eieren blijft blootstellen aan de inwerkingen, die oorzaak zijn van de versmeltingen.

Dat het tenslotte niet het Natrium-, maar het OH-ion was, waarop het bij de toevoeging van de natronloog aankwam, bleek daaruit, dat men dezelfde resultaten kreeg, wanneer men NaOH door KOH verving.

Resumeerende mogen we besluiten, dat de verhoogde alkaliniteit en het ontbreken van calcium in het zeewater twee factoren zijn, die elk hun bijzonderen invloed op de Echinidenkiem uitoefenen, doch slechts bij gelijktijdige inwerking, die bij de eieren vóór de eerste klieving afgeloopen moet zijn, ten gevolge hebben, dat de weefsels der larven eene

blijvende verbinding aangaan. Op de vraag wat die bijzondere invloed is, zullen we in het laatste hoofdstuk nog terugkomen.

* * *

Terwijl DRIESCH slechts getracht heeft uit membraanlooze eieren versmeltingen tot stand te brengen, heb ik, als boven reeds gezegd, het ook met vrij zwemmende blastulae beproefd. Mijne eerste experimenten heb ik met dit larvenstadium van Parechinus microtuberculatus gedaan.

Zoo werden b.v. blastulae, die 19 uur oud waren, levendig rondzwommen en zelfs al wat mesenchym gevormd hadden, even gecentrifugeerd en werd daarna het gewone door alkalisch kalkvrij zeewater vervangen. In dit medium bleven deze larven respect. 6, 15 en 30 minuten, om dan na eene tweede korte centrifugeering weer in normaal zeewater teruggebracht te worden.

De resultaten van deze bewerking waren hoogst verrassend. In elke groep vertoonden de blastulae eenigszins de sporen van het kalkgebrek, overal echter bevonden zich samenklevingen van 3 of 4 stuks of nog meer, zelfs hoopen van 12 stuks kwamen voor. Vooral de eerste groep was rijk aan zulke ophoopingen, zoodat ik in den middag, toen de blastulae reeds begonnen een darm in te stulpen, ongeveer 130 van zulke klompen, te samen uit ± 330 blastulae bestaande, kon isoleeren. Van den schadelijken invloed van het kalkgebrek had zich deze groep toen geheel

hersteld, [1]) de niet verkleefde blastulae zwommen vlug rond en de verklevingen zelf voerden ingewikkelde kronkelende bewegingen uit, resultanten van de eigenbewegingen der componenten, waaruit ze waren samengesteld.

Zooals men in Fig. 4 ziet, waar eenige van deze

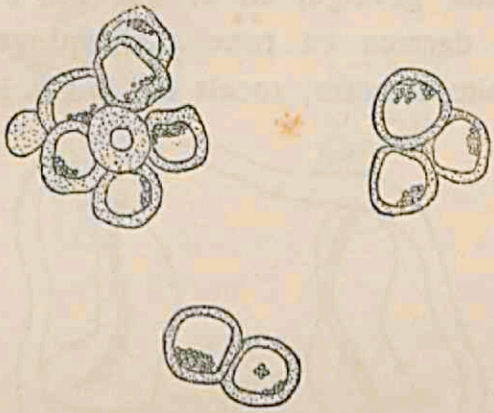


FIG. 4. Parechinus microtuberculatus. Verklevingen van blastulae, na behandeling met alkalisch kalkvrij zeewater. Blastocoelen niet versmolten, mesenchymcellen zijn gevormd, bij enkelen begint darminstulping. Vergrooting 36 ×.

ophoopingen afgebeeld zijn, zijn hierbij de blastulae onderling zeer verschillend gericht, en verder de blastocoelen gescheiden gebleven, hoewel de blastulae zelf vaak tegen elkaar afgeplat zijn. Dit gescheiden blijven der blastocoelen was dan ook de zwakke zijde: den volgenden morgen trof men in bijna alle isolaties de te voren verkleefden als jonge plutei vrij rondzwemmend aan: de vormverandering na het ont-

1) De derde groep, die een half uur in het kalklooze medium vertoefd had, genas niet zoo goed, en was gedeeltelijk nog onhelder gebleven.

wikkelen van het skelet, benevens de krachtiger en meer individueele bewegingen waren te sterk geworden voor de verbinding, en hadden zelfs de reeds afgeplatte individuen weer losgemaakt. Slechts twee van de 130 hadden zich anders gedragen, bij deze was op de verkleving eene verdwijning van den tusschenwand gevolgd, en er was een dubbellarve met twee darmen en twee skeletspangen in ééne lichaamsholte ontstaan, zooals dat in Fig. 5 afgebeeld

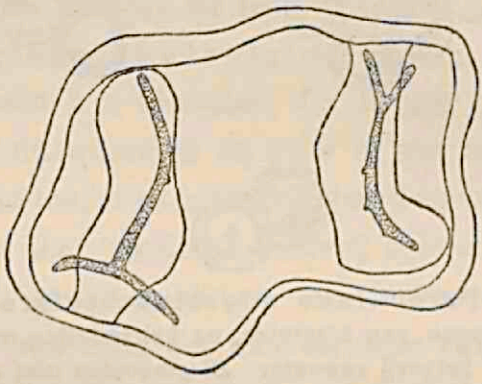


FIG. 5. Parechinus microtuberculatus. Versmelting, gevolgd op eene verkleving als die in Fig. 4. In ééne blastula ziet men twee darmen ingestulpt, die een hoek van ± 180° maken. Ook is er al eenig skelet. Vergrooting 150 ×.

is. Zooals men ziet, zijn hier de partners ongeveer 180° ten opzichte van elkaar gedraaid, en is het skelet bij beide nog slechts weinig ontwikkeld.

Duurzamer was de onderlinge verkleving van de eieren, die respect. 15 en 30 minuten in alkalisch kalkvrij zeewater gebleven waren. Ofschoon ook hier de meeste verbindingen zich weer los maakten, waren enkele toch solide genoeg om aan de meer

energieke bewegingen der plutei weerstand te kunnen bieden, en ontwikkelden zich tot vormen, als in Fig. 6 geteekend zijn. Zoo vond men plutei, die aan den top of langs een kant vergroeid waren, doch zonder blastocoelvereeniging en daardoor ook in hun

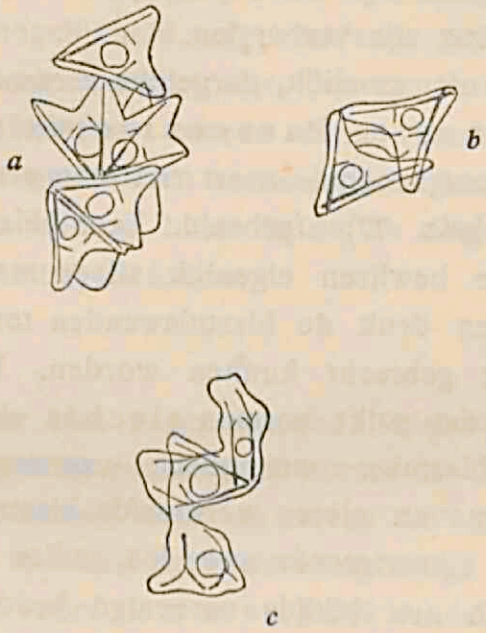


FIG. 6. Parechinus microtuberculatus. Vergroeide Plutei. In *b* zijn twee plutei door eene ectoderm-brug verbonden, in *c* zijn bij de bovenste twee de lichaamsholten verbonden, de derde zit door eene ectodermbrug aan de twee anderen vast. Dezen derden ziet men juist op den top, de middelste in *c* van terzijde; de bovenste in *c* is zeer abnormaal van vorm. Vergrooting 36 ×

uitwendigen vorm vrij normaal (Fig. 6a). Anderen waren of door eene ectodermbrug verbonden (Fig. 6b), waaromheen ze bewegingen maakten, die voor hunne verbinding gevaarlijk konden worden. Weer anderen

vertoonden combinaties van plutei met en zonder blastocoelvereeniging, zooals in Fig. 6c, waar de twee bovenste eene door een tamelijk nauw kanaal vereenigde lichaamsholte hebben (men lette op de kruising der skeletspangen) en met den derden, dien men juist op den top ziet, door eene smalle ectoderm-brug zijn verbonden.

Het was niet moeilijk, dergelijke vergroeiingen bij Parechinus en Paracentrotus te krijgen, van de laatstgenoemde soort ziet men er enkele in Fig. 21 (bladz. 77) afgebeeld. Zeer belangrijk zijn ze niet, ze bewijzen eigenlijk alleen maar, dat bij genoegzamen druk de blastulawanden tot blijvende vergroeiing gebracht kunnen worden. Ik wil er bijvoegen, dat zulke vormen slechts uit gecentrifugeerde blastulae ontstonden; wanneer ik door behandeling van eieren verkleefde blastulae kreeg, lieten die elkaar steeds weer los, indien de blastocoelen zich niet bijtijds vereenigd hadden. Waarschijnlijk is dit verschil daaraan toe te schrijven, dat de druk, die bij de centrifugeering der blastulae uitgeoefend wordt, de tevoren eenigszins losgemaakte weefsels onderling steviger vereenigt, dan bij de verkleving van eieren geschiedt.

Gewichtiger zijn in elk geval de werkelijke versmeltingen, waarbij dus de lichaamsholten zich vereenigen, daar ze de mogelijkheid bewijzen, dat ook bij kiemen, die reeds op een verder ontwikkelings-stadium gekomen zijn, de scheidende tusschenwand nog kan verdwijnen, en de weefsels van twee verschillende indivi-

duen nog één enkel weefsel kunnen gaan vormen. MORGAN vermoedde „that fusion takes place on the blastulastage", en ook DRIESCH spreekt van een „Verschmelzung als Blastula", hoewel geen van beiden dit waargenomen heeft. Door het hier beschrevene, en door hetgeen ik bij Sphaerechinus zag, is in elk geval de mogelijkheid ervan bewezen. Of het echter noodig is, met MORGAN algemeen aan te nemen, dat het reuzenblastocoel steeds door vereeniging van twee eerst gescheiden blastocoelen ontstaat, valt te betwijfelen. Hierop hoop ik in de volgende bladzijden nog terug te komen.

* * *

Meer dan met vrijzwemmende blastulae heb ik met van hunne bevruchtingsmembraan beroofde eieren gewerkt. Wanneer men de eieren uit het kalkvrije medium in normaal zeewater terugbrengt, vindt men ze meestal, voorzoover ze werkelijk hunne membraan verloren hebben, in groote hoopen samengepakt; de eieren, waarvan de membranen niet of niet voldoende verwijderd zijn, blijven geïsoleerd liggen. Deze ophoopingen zijn dan centra der versmeltingen. Bij de klieving werden de morulae, vooral die binnen in zoo'n hoop liggen, door de vergrooting hunner afmetingen nog meer samengeperst, wat zonder twijfel invloed op de vereeniging moet uitoefenen. Isoleerde ik enkele van zulke samenklevende klievingskogels, als b.v. de in Fig. 7 afgebeelde, dan heb ik nooit daaruit versmeltingen zien komen. Grootendeels zal

dit wel, zooals ook DRIESCH opmerkt, daaraan liggen, dat het wel een zeer gunstig toeval zijn zou, als men juist één van de betrekkelijk zoo zeldzame toekomstige versmeltingen had uitgekozen, aan den anderen kant is ook niet te vergeten, dat door de isoleering uit een hoop de zoo gunstige samenpersing wordt opgeheven. De drie in Fig. 7 afgebeelde morulae, waarvan ik verwachtte dat in elk geval de twee

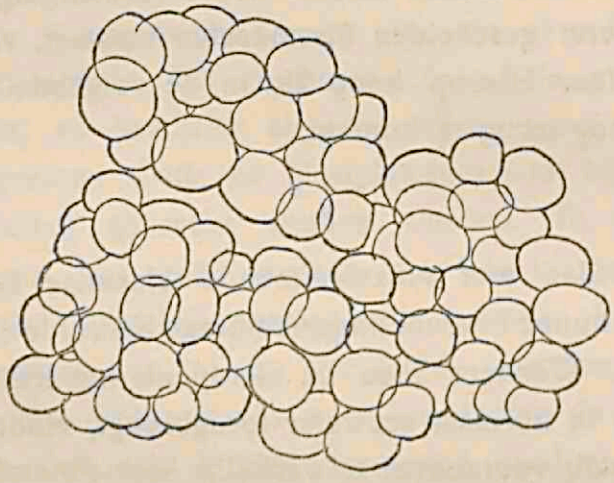


FIG. 7. Parechinus microtuberculatus. Drie verkleefde morulae, waaruit drie vrije blastulae zich ontwikkelden. Vergrooting 150 ×.

ondersten ééne reuzenblastula zouden vormen, hebben zich ten slotte tot drie geheel vrije blastulae ontwikkeld.

Meestal zijn het twee kiemen, die zich vereenigen; maar ook combinaties van meerderen komen voor, speciaal bij Parechinus en Paracentrotus. Deze hebben dan altijd een vrij bizar uiterlijk, daar de oorspronkelijke insnoeringen meestal slechts

onvolkomen vereffend werden; en door de vele skeletspangen met hunne onregelmatigheden en defecten werden de eindresultaten zeer ingewikkeld en onbegrijpelijk. Een merkwaardigen vorm vond ik eens bij Sphaerechinus (Fig. 8). Hier was eene ovale reuzenblastula met eene kleine versmolten, en eene tweede kleine blastula was met de eerste verkleefd.

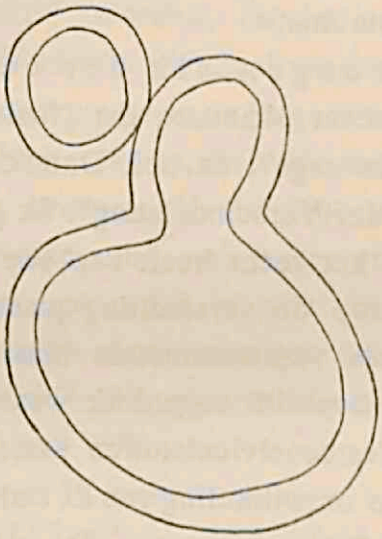


FIG. 8. Sphaerechinus granularis. Verkleving van eene blastula, uit een $^1/_2$-blastomere ontwikkeld, met een $2^1/_2$-ling, d. w. z. eene versmelting uit twee geheele en een halven kiem. Vergrooting 150 ×

Vergelijking der afmetingen met die eener normale blastula bewees, dat de reuzenblastula een dubbelvorm was, de beide kleinen daarentegen half-blastulae. Er had dus op een tweecellig stadium eene scheiding der blastomeren plaats gevonden, en één

der twee helften was met eene naburige dubbelblastula versmolten, de ander daarentegen onafhankelijk gebleven. De versmelting is dus een twee-en-een-half-ling en toont daarmee dat een groot aantal versmeltings-combinaties mogelijk zijn. In dit geval stulpte de groote helft één darm in, maar de daarmee versmolten „half-ling" werd na korten tijd onhelder en stierf, en veroorzaakte daardoor den dood van de geheele combinatie.

Wat nu het oogenblik der versmelting betreft, zoo meent MORGAN, dat „fusion takes place on the blastula-stage", en ook DRIESCH spreekt van het „Moment der Verschmelzung". Ik geloof eigenlijk niet, dat men het recht heeft van een moment te spreken, waarop de versmelting plaats zou hebben. Wel is er, als vrijzwemmende blastulae vereenigd worden, één bepaald oogenblik waarop de vroeger gescheiden blastocoelvloeistoffen samenvloeien, maar dit is voor de ontwikkeling van de dubbellarven eene vrij onbelangrijke gebeurtenis. De eigenlijke vereeniging der kiemweefsels heeft dan al te voren geleidelijk plaats gevonden, en kan, zoolang een bepaald minimum van vastheid niet bereikt is, weer verbroken worden. In de meeste gevallen kan men dan ook niet zeggen, of twee kiemen versmolten zijn of niet, b.v. in het geval van Fig. 7. Daar zijn nog drie mogelijkheden te verwachten: er kunnen bij het uiteenwijken der morulacellen twee blastocoelholten gevormd werden, die gescheiden kunnen blijven, dan wel zich secundair vereenigen, òf er kan van den aanvang af één

enkelvoudig blastocoel ontstaan [1]), misschien eerst nog lang en smal, maar later een ronderen vorm aannemend. Men heeft zoodoende vereenigingen in verschillende graden, en pas als een bepaalde graad van vastheid bereikt is, is een weder losraken onmogelijk. Wanneer die graad bereikt wordt, is voor ons niet waar te nemen, slechts kunnen we zeggen dat eerst op het blastulastadium versmeltingen kunnen geconstateerd worden, en dat is dan de waarheid die in MORGAN'S uitspraak verborgen ligt.

In het algemeen vertoonen de jonge tweelings blastulae eerst een zandlooper-vorm, die vaak, maar niet altijd [2]), in een ronden overgaat. Veelal blijft eene duidelijke insnoering bestaan, die ook later, wanneer in elke helft een darm gevormd is, niet verdwijnt. Zulke tweelingen leveren dan, wanneer zij beide skelet vormen, een dubbel-pluteus, waarbij elke partner eene

---

1) Zoo kon ik eens bij Parechinus miliaris reeds 7 uren na de bevruchting versmeltingen isoleeren. In de contrôle-cultuur waren de jonge blastulae natuurlijk nog door hunne membraan omgeven. Het is niet goed aan te nemen, dat zich hier in zoo korten tijd twee onafhankelijke blastocoelen gevormd zouden hebben, en die zich dan secundair zouden hebben vereenigd. Ook was de vorm van het blastocoel lang en plat, geheel zooals men verwachten zou, wanneer de morulacellen van Fig. 7 tezamen ééne blastula gevormd hadden.

2) DRIESCH [1900, blz. 417] geeft aan, dat de vorm steeds in een ellipsoiden of ronden overgaat. Dit komt wel, doordat DRIESCH bij zijne eerste proeven voornamelijk met Sphaerechinus werkte, en door deze zich langzaam ontwikkelende species een eenigszins eenzijdigen blik op het versmeltingsprobleem kreeg, evenals MORGAN, die uitsluitend met Sphaerechinus werkte.

betrekkelijk groote vrijheid in bouw behouden heeft.

De beide darmen, die in het algemeen door de twee partners ingestulpt worden, verschijnen vaak na elkaar; in het bijzonder is bij Sphaerechinus, waar de geheele ontwikkeling langzamer verloopt, dit tijdsverschil vaak vrij aanzienlijk. Dit bewijst dat ondanks de morphologische verbinding de twee partners toch physiologisch tamelijk onafhankelijk van elkaar blijven. DRIESCH deelt mede, dat hij wel zag, dat in de ééne helft van eene ingesnoerde dubbel-blastula twee darmen werden ingestulpt, in de andere helft daartegen geen; dit echter heb ik nooit gezien. Wel meende ik het eens bij Parechinus miliaris aan te treffen: eene reuzen-blastula was in eene grootere en eene kleinere helft ingesnoerd, en in de grootere afdeeling invagineerden twee darmen en vormde zich slechts weinig skelet, terwijl in de kleinere geen darm ingestulpt werd, maar een volledig skelet gevormd. Spoedig werd echter de samenhang duidelijk: de zonderlinge vorm was een drieling, uit een tweeling met twee darmen en eene daarmede verbondene exogastrula (zie later) samengesteld, en daardoor werd ook het onderscheid in grootte tusschen de twee deelen begrijpelijk.

Terwijl nu van de ophoopingen slechts enkele blastulae zich blijvend verbinden, blijven toch ook de anderen wel eenigen tijd verkleefd en zwemmen samen in rijen of klompen rond. Wanneer echter de bewegingen levendiger worden, lossen zich die verklevingen op tot steeds kleinere hoopen, en slechts zelden

ziet men ze nog op het gastrulastadium samen verkleefd rondzwemmen. De vrijgewordenen ontwikkelen zich meestal tot normale plutei, vaak echter vertoonen de geschudde en met kalkvrij water behandelde culturen sporen hiervan: de sterfelijkheid is grooter dan bij de contrôle-cultuur, meer larven liggen op den bodem in plaats van rond te zwemmen en vele vindt men waarbij de ontwikkeling van een bepaald oogenblik af is blijven stilstaan, die dus niet over het blastulastadium heenkomen, of geen skelet vormen.

Het is duidelijk dat men zulke abnormaliteiten ook bij reeds versmolten kiemen mag verwachten, zij het bij beide partners, zij het tengevolge van de physiologische onafhankelijkheid, die ook bij het tijdsverschil der darminvaginatie te voorschijn kwam, bij slechts één van beide kiemen. En werkelijk vindt men bij hen vaak onvolmaaktheden, speciaal aan het skelet. Nu hangt de vorm van den pluteus geheel van zijn skelet af, zoodat bijna elke skelet-abnormaliteit eene vorm-abnormaliteit, en eene onvolkomen skeletontwikkeling ook eene onvolkomen uitgroeing van de larve ten gevolge heeft. Bij een zeer gering skelet blijft zelfs meer of minder de kogelvorm bewaard, hoewel de darm zich in drie deelen geleden en ombuigen kan. Onregelmatigheden en onvolkomenheden in den uitwendigen vorm kan men dientengevolge bij de tweelingen zeer vaak waarnemen. Zoo vond ik wel dubbelvormen waar slechts één partner een, bovendien onvoltooid, skelet ge-

vormd had, en in Fig. 22 (blz. 79) bleef wegens onvoldoende skelet van beiden de vorm bijna rond. In Fig. 25 (blz. 86) overweegt één skelet sterk en geeft daardoor aan het geheel een schijn van eenheid, die echter spoedig verstoord wordt, wanneer men op de twee evengroote darmen let. Ook andere onregelmatigheden komen voor; zoo kan b.v. één der twee ingestulpte darmen geen levensvatbaarheid hebben, en na eenigen tijd samenschrompelen. Geschiedt zoo iets bij een vrijlevend individu, dan gaat dit daardoor te gronde, maar indien het geschiedt wanneer de larve met eene andere verbonden is, blijft de zieke darm als een rudimentair orgaan in het tweelingslichaam bestaan, en de eene partner wordt door den darm van den ander gevoed, zonder dat daarbij de gezonde door eene compensatorische hypertrophie eene merkbare vergrooting ondergaat, zooals ik steeds door vergelijkende meting heb kunnen uitmaken. Nu komt zulk een rudimentair worden van een der twee darmen wel voor in een tweeling, die twee goed ontwikkelde skeletten heeft, maar wanneer de ziekelijke helft ook nog te weinig skelet ontwikkelt, krijgt men vormen als die van Fig. 9, waar een van beiden door zijn skelet domineert, en de geheele larve een schijn van eenheid aangenomen heeft, die nog grooter zijn zou indien de eenige skeletspang van het achtergebleven individu zich nog minder ontwikkeld had.

Indien deze spang in 't geheel niet gevormd was,

dan had men iets gekregen wat door DRIESCH bij zijne kategorie der „Einheitsbildungen mit parasitischem zweiten Darm" zou kunnen worden ingegedeeld. Toch heb ik juist tegen zijne Fig. 7 [1910], die door DRIESCH als bijzonder duidelijk voorbeeld van deze klasse afgebeeld is, eenige bezwaren. Wanneer men deze figuur met de normale plutei van zijne

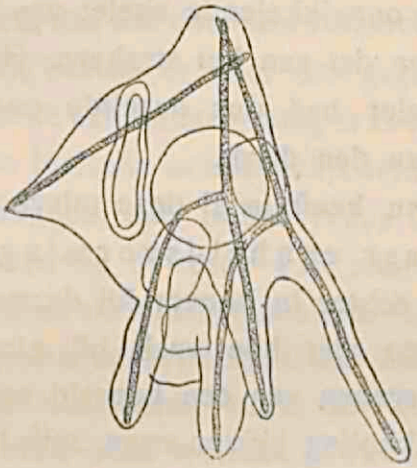


FIG. 9. Parechinus miliaris. Tweeling, waarvan één darm samengeschrompeld en bruin was, de ander daarentegen goed ontwikkeld en hyalien. De gezonde darm is niet grooter dan een normale. Het skelet van den partner met verschrompelden darm bestaat slechts uit ééne enkele spang. Zeiss Obj.A Oc.4, daarna op $^2/_3$ verkleind. Vergrooting dus thans 65 ×.

Fig. 8, en met de reuzenplutei van zijne Fig. 10 en 11 vergelijkt, krijgt men den indruk, dat men hier met een drieling te doen heeft, daar hij in zijne afmetingen grooter is dan de afgebeelde eenheidsreuzen, in skelet en darm daarentegen met hen overeenstemt. Van dezen drieling (of misschien

twee-en-een-halfling, want de „parasiteerende" darm is wel zeer klein gebleven, hoewel hij zich nog in drie deelen geleedde) hadden twee deelen een eenheids-pluteus tot resultaat; het derde ontwikkelde geen skelet en zijn darm groeide niet goed uit. Daarmee vervalt dan echter de mogelijkheid, met DRIESCH hierin een voorbeeld te zien van het verbruiken van het zich ontwikkelende skelet van het zwakkere individu door dat van het sterkere. Het „te groot" van het skelet had dus dezelfde oorzaak als het „te groot" van den darm.

DRIESCH nu heeft in al deze misvormingen eene streven naar eenheidsvorming willen zien. De vraag is echter in hoever hij daartoe recht had. Wanneer men ziet hoe vaak bij niet versmolten larven de organen van een bepaald oogenblik af in hunne ontwikkeling blijven staan, zelfs bij niet behandelde contrôle-culturen, is het wel weinig waarschijnlijk dat zoo iets bij versmolten individuen nooit zou geschieden. En wanneer in een tweeling zulke defecten eenmaal beginnen op te treden, moet men vormen als de boven beschrevenen als een noodzakelijk resultaat daarvan verwachten. Dat zoo'n tweeling niet direct een geheel ongezond uiterlijk krijgt, zal wel toe te schrijven zijn aan het parasiteeren van de ongezonde op de gezondere helft. Reductie van een der twee darmen heeft ook DRIESCH nooit waargenomen, steeds was het een staan blijven.

Later zal nog aangetoond worden dat DRIESCH ten

onrechte geloofde dat het, door hem aangenomen, tijdstip der versmelting eene groote beteekenis heeft voor het gelukken van dit streven, zoodat de vroegst versmoltenen zich ook het best tot eene eenheid zouden reguleeren. Daar men verder, naar ik meen, voor de ook door mij gevonden reuzeneenheidsvormen eene principieel andere wijze van ontstaan moet aannemen, dan die door het versmeltingsmoment wordt bepaald, bestaat er voor ons geen reden naar overgangen tot de eenheidsvorming te zoeken, die voor DRIESCH eene logische noodzakelijkheid waren. Men zou kunnen zeggen, dat, indien reeds eene tendenz tot eenheidsvorming bewezen was, men eenige dezer vormen misschien als voorbeelden daarvan zou kunnen aanhalen, aan den anderen kant kan hierdoor alleen de sceptische waarnemer nooit tot geloof in het bestaan van zulk eene tendenz gedwongen worden.

Slechts één ding zou misschien nog als bewijs aangevoerd kunnen worden, n.l. het feit dat wel eens versmelting van twee elkaar ontmoetende darmen plaats vindt. Toch bleven bij de vergroeiing meestal de lumina der voordarmen gescheiden (Fig. 10), zelfs wanneer zij zich reeds vroeg tegen elkaar legden (ook bij deze „regulatie" zou eene vroegtijdige vergroeiing meer uitwerking moeten hebben) en was bij beiden eene vrije uitmonding waar te nemen. Enkele malen slechts versmolten werkelijk de voordarmen en hadden dan samen ééne ingangsopening, maar zelfs bij dit (ook door DRIESCH waargenomen) zeker zeer merkwaardige verschijnsel blijft het evenmin noodig naar eene

tendenz in de eene of andere richting te zoeken, als men het bij de versmelting van twee samengedrukte blastulae doet. Wanneer de kiemen zich op eene bepaalde wijze vereenigen, dan moeten de geïnvagineerde darmen elkaar ontmoeten en bij het verder groeien tegen elkaar aandrukken. Onder bepaalde, ons nog onbekende, voorwaarden zullen de beide darmlumina zich vereenigen, in de meeste gevallen daarentegen niet, evenals bij enkele verkleefde blastulae

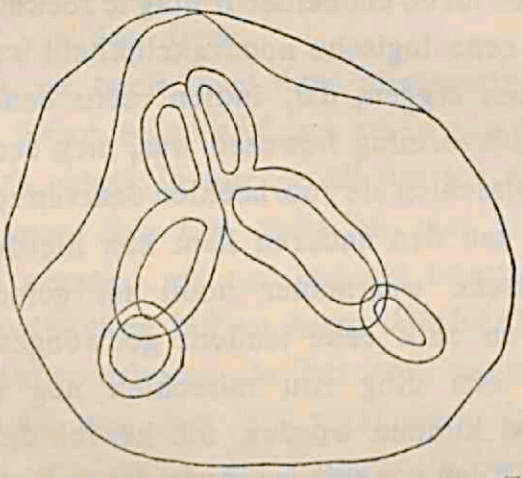


FIG. 10. Sphaerechinus granularis. Tweeling met vergroeide darmen, van onderen gezien. Het skelet is duidelijkheidshalve weggelaten. De darm lumina vereenigden zich niet. Vergrooting 150 ×.

eene blastocoelversmelting tot stand komt, doch de meeste dit niet doen. Moeten we er dan wel het slagen van een streven in zien, wanneer de darmwand zich oplost, en de versmolten dubbeldarm zich in één mond opent?

Darmvergroeiingen, zooals ze MORGAN en DRIESCH bij Sphaerechinus zagen, waarbij twee naast

elkaar loopende darmen over hunne geheele lengte versmolten, heb ik nooit gevonden. Dit zijn zeker zeer merkwaardige gevallen, ook wegens hun skelet. MORGAN beschrijft er een waar het skelet zich ontwikkelde „as though the whole embryo were a single form": uit twee skelet-driestralers werd een enkelvoudig reuzenskelet opgebouwd. In het geval van DRIESCH werden twee skeletten gevormd waarvan één tamelijk rudimentair bleef. Toch geloof ik ook hier niet aan eene regulatie in den zin van DRIESCH; in een later hoofdstuk hoop ik nog eens op deze versmeltingen terug te komen. En in 't bijzonder geloof ik niet dat het zoo duidelijk is, als DRIESCH meent, „dass hier die Verhältnisse ähnlich liegen wie einst bei Asterias". Bij Asterias [DRIESCH, 1897] was n.l. uit één ei door schudden een tweelingsvorm ontstaan, die meestal twee darmen instulpte. Eenige malen kwam het voor dat twee darmen naast elkaar liepen en dan begonnen te versmelten en één dikken darm met ovale doorsnede vormden. Dit kan men zeker als een regulatie opvatten, naar de definitie van DRIESCH [1901, blz. 92] volgens welke de regulatie eene meer of minder gelukte herstelling van den verstoorden normalen toestand is. Maar welke toestand is bij onze versmeltingen verstoord? Hier worden twee normale levensvatbare kiemen op elkaar geënt, en een abnormale tweelingsvorm is het resultaat daarvan. Het ligt dan voor de hand aan te nemen dat eene eventueele regulatie er naar zou moeten streven, eene zoo goed

mogelijke scheiding der vereenigde kiemen te bewerken, zooals het b.v. geschiedt wanneer door enting twee ongelijk gerichte stukken van Hydra met elkaar vergroeid zijn. Het eenige verschijnsel dat bij de kiemversmeltingen aan eene latere scheiding der kiemen doet denken, is het voorkomen der nog te bespreken Haplo- en Diploexogastrulae; ik wil er echter direct den nadruk op leggen, dat ik ook hierin geen geval van regulatie — welke dan ook — zien kan.

* * *

De uitkomsten van zijne proeven met Echinideneieren, o.a. die over de klieving van brokstukken van bevruchte eieren, en die waarbij uit geïsoleerde blastomeren of beschadigde eieren normaal gebouwde kleinere larven zich ontwikkelden, brachten DRIESCH tot de onderstelling dat het Echinidenei geen homogene massa is, maar eene structuur bezit, die in eene onzichtbare polariteit en bilateraliteit der kleinste deeltjes uitgedrukt is [DRIESCH, 1897]. Later vond BOVERI [1901] dat het pigment in het Paracentrotus-ei in een ring gelegen was, en kwam, daar deze pigmentring in vaste betrekking bleek te staan tot den aanleg der eerste organen, tot de onderstelling van eene laagsgewijze ordening der eistoffen, en daarmede tot eene ten minste hier zichtbare polariteit van het ei, die op de blastula overgedragen wordt. We kunnen hier nalaten te onderzoeken, in hoever de ontdekking van BOVERI de hypothese van de polariteit der kleinste deeltjes overbodig maakt, zeker is echter

dat men deze laagvorming ook bij die Echinideneieren mag aannemen waar een pigmentring, die toch slechts een symptoom daarvan is, ontbreekt. Dientengevolge moet men er rekening mee houden dat bij de versmelting van Echinideneieren of -blastulae een evengroot aantal wijzen van vereeniging bestaat, als men combinaties van eias-richtingen denken kan, wanneer men niet de a priori door niets te motiveeren onderstelling maken wil, dat slechts bij bepaald gerichte eiassen twee verkleefde kiemen eene versmelting kunnen vormen.

Het aantal van deze mogelijke combinaties moet tamelijk groot zijn, en de vraag dringt zich op of het misschien mogelijk is, zoo niet in alle, dan toch in eenige gevallen een samenhang tusschen deze onderlinge versmeltingsrichting en het versmeltingsresultaat aan te toonen, of dat men gelooven moet dat dit niet het geval is, daar de assen der beide partners na de vereeniging eene richtende werking op elkaar uitoefenen.

Zooals bekend is heeft BOVERI [1901] het eerste ondersteld, DRIESCH het tweede aangenomen. In zijne eerste publicatie [1900] neemt DRIESCH aan dat de eenheidsvormen [1]) die hij kreeg, en die natuurlijk uit gelijk gerichte deeltjes opgebouwd waren, op een

---

1) Onder „eenheidsvormen" worden voortaan die reuzenvormen verstaan, die van den aanvang af slechst één darm instulpen en uit één mesenchymwoekering één enkelvoudig skelet opbouwen, zoodat een normaal gebouwde, doch grootere, pluteus het gevolg er van is.

zeer vroeg stadium versmolten waren, zoo vroeg, dat die deeltjes daarna nog den noodigen tijd gehad hadden hunne assen evenwijdig te stellen, voordat het oogenblik der orgaanvorming gekomen was. Bij later versmoltenen moet dit gelijk richten der assen dan minder volkomen geslaagd zijn, in elk geval echter is volgens deze voorstelling het resultaat eener versmelting bepaald door het oogenblik waarop de

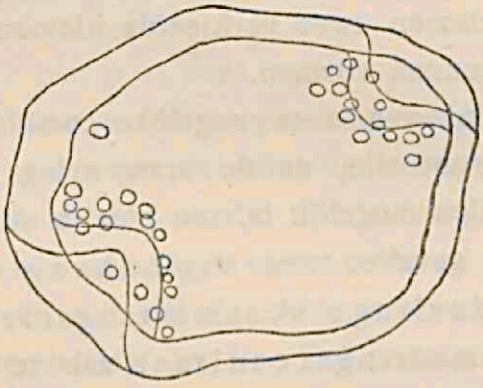


FIG. 11. Parechinus microtuberculatus. Dubbel-blastula, aan de animale pool versmolten, zooals blijkt uit de ligging der darmen en mesenchymcellen. Vergrooting 150 ×.

versmelting plaats vond. BOVERI daarentegen meende dat de eenheidsvormen slechts ontstonden wanneer twee kiemen van den aanvang af met gelijk gerichte assen vereenigd waren, dus meer algemeen: er bestond eene relatie tusschen het versmeltingsresultaat en de versmeltingsrichting. In zijne tweede publicatie [1910] drukt DRIESCH zich wel wat minder beslist uit, maar houdt toch over 't geheel aan zijne oude meening vast. Het is dus nu de vraag, of men aan-

toonen kan dat eene vroege vereeniging der kiemen doorloopend eene andere uitkomst geeft, dan eene latere vereeniging, en of men daarbij misschien iets van eene verplaatsing der assen na de versmelting waarnemen kan, dan wel of men in enkele gevallen een vast verband kan aantoonen tusschen eene bepaalde onderlinge asrichting bij de versmelting en de daaruit zich ontwikkelende tweelings-vorm. In 't bijzonder

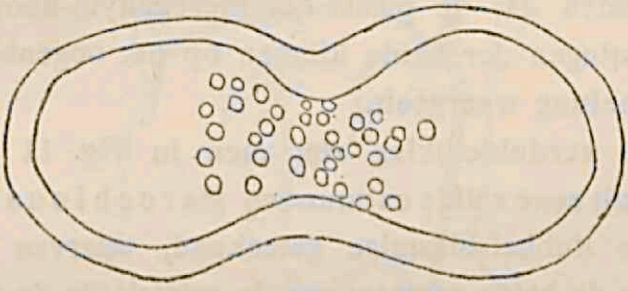


FIG. 12. Parechinus microtuberculatus. Dubbel-blastula, aan de vegetatieve pool versmolten, zooals blijkt uit de ligging der mesenchymcellen. Vergrooting 150 ×.

geldt dit voor die versmeltingen, waaruit de eenheidsreuzen zich ontwikkelen.

Ongelukkigerwijze is bij Paracentrotus de pigmentring niet steeds zoo duidelijk als hij door BOVERI afgebeeld werd, en bij andere species is er in 't geheel niets van te zien. Toch bestaat er ook dan een vrij nauwkeurig middel om reeds op een vroeg blastulastadium de as der larve te herkennen n.l. in de vorming van het primaire mesenchym, welks plaats de vegetatieve pool markeert, waaraan kort daarop de darminstulping begint. Nu zou het natuurlijk mogelijk zijn dat tusschen het oogenblik van de

kiemvereeniging en van de mesenchymvorming de assen onderling draaiden. Dit wordt echter zeer onwaarschijnlijk wanneer men erop let, hoe verschillend op dit stadium die assen gericht zijn; indien ze werkelijk eene richtende werking op elkaar uitoefenden moest in elk geval ook op dit stadium eene tendenz naar evenwijdigheid merkbaar zijn, waarvan werkelijk niets te vinden is. We mogen dus aannemen dat de plaats der mesenchym-hoopen de asrichtingen der beide kiemen op het oogenblik der versmelting weergeeft.

Ter verduidelijking ziet men in Fig. 11 en 12, twee uit eene zelfde cultuur van Parechinus geisoleerde dubbel-blastulae geteekend, waarvan in de eerste de beide partners aan de animale, in de tweede daarentegen aan de vegetatieve pool vereenigd zijn.

De vraag is dus nu geworden, of tusschen de ligging der mesenchym-woekeringen der dubbelblastulae en het eindresultaat der versmeltingen een samenhang aan te toonen is. In 't algemeen zal dit bewijs moeilijk te leveren zijn. Meestal n.l. zullen de kiemassen niet in één vlak liggen. Ten gevolge daarvan nemen dan in de dubbelblastula de mesenchym-cellen twee onderling niet duidelijk gemarkeerde plaatsen in, en men vindt dan steeds een soortgelijk eindresultaat: twee darmen worden onder geheel willekeurigen hoek gevormd, beide vormen secundair mesenchym en skelet, groeien verder, krommen zich, het skelet groeit meer of minder uit en men krijgt vormen zooals bijv. Fig. 13

voor Sphaerechinus aangeeft. Speciaal bij Parechinus kreeg ik dit banale type vaak in zoo grooten getale, dat ik het niet meer isoleerde, en nog slechts naar tweelingen met bijzonder gerichte assen zocht.

Er is echter één geval, waarin de assen op eene

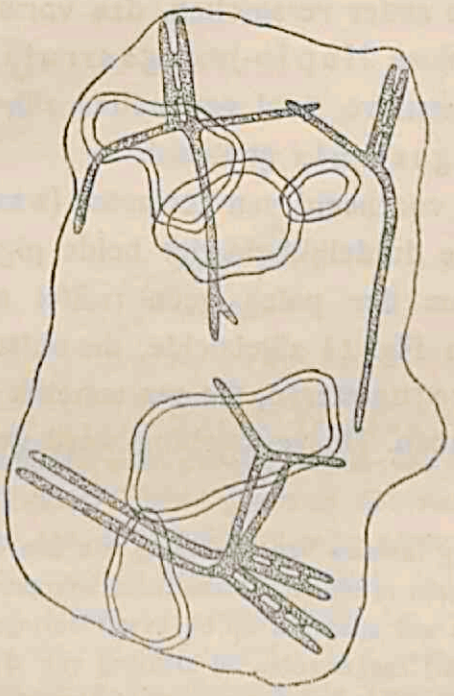


FIG. 13. Sphaerechinus granularis. Tweeling ontstaan uit bewerkte blastulae. Er werden twee elkaar kruisende darmen ingestulpt, en twee skeletten gevormd. Vergrooting 150 ×.

zeer goed te herkennen wijze onderling gericht zijn, n.l. wanneer een der partners, of beiden, aan de vegetatieve pool met den ander versmolten is. Deze wijze van vergroeien nu geeft steeds hetzelfde resultaat: steeds wordt de darm

geëvagineerd in plaats van geïnvagineerd, en er ontstaat een exogastrula, later een exopluteus[1]). Voorbeelden hiervan vond ik bij alle der door mij gebruikte species, en het is mij een raadsel, waarom ze in DRIESCH' culturen nooit voorkwamen[2]). Is slechts één der beide kiemen met zijne vegetatieve pool aan den ander versmolten, dan vormt de eerste eene (zeggen we Haplo-)exogastrula, als beide aan de vegetatieve pool versmolten zijn wordt een Diplo-exogastrula gevormd.

Een goed voorbeeld van het laatste (waarbij bovendien door de duidelijkheid der beide pigmentringen aan de plaats der polen geen twijfel mogelijk is) vormt het in Fig. 14 afgebeelde, dat ontstaan was uit Paracentrotus-eieren, die een tamelijk duidelijken ring vertoonden. De versmelting werd geisoleerd op

---

1) Uitstulping inplaats van instulping van den oerdarm is het eerst door HERBST in zijne lithiumculturen waargenomen [1893*a*]. Ook treden ze wel spontaan op bij bastardeeringen, zoo kreeg MORGAN [1896*a*] exogastrulae bij kruising van Sphaerechinus × Strongylocentrotus, en GARBOWSKI [1905] bij kruising van Strongylocentrotus lividus × Echinus esculentus.

2) Echter heeft DRIESCH [1906] dergelijke vormen in andere omstandigheden ook eens gevonden, n.l. bij de splitsingstweelingen, die hij met verdund zeewater verkregen had. De twee oorspronkelijk opene, half kogelvormige morulae der halfkiemen sloten zich bij het verder groeien elk tot een kogel, hierbij nu werd beiderzijds de as gedraaid, zoodat de twee vegetatieve polen tegen elkaar gelegd werden. Van deze ronde blastulae stulpte dan, evenals bij mij, één of beiden den darm uit.

het stadium van Fig. 14*a*, waar twee ringen zichtbaar zijn die parallel verloopen, terwijl de vereeniging aan den kant der beide kleinere pigmentvrije kappen, dus de vegetatieve zijde, tot stand gekomen was. Beiden stulpten ze hun darm uit, en deze bleven met elkaar vereenigd, hoewel de bewegingen van den

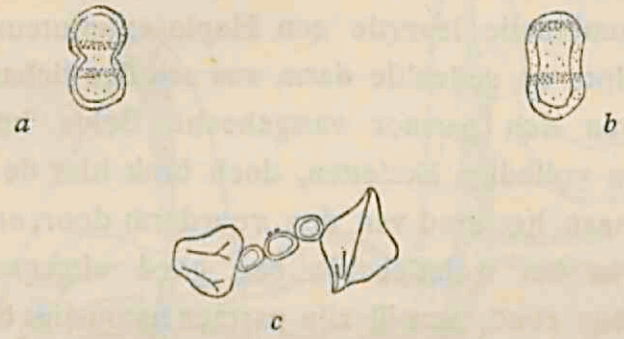


FIG. 14. Paracentrotus lividus. *a*. Tweelingsblastula, waarvan beide partners een duidelijken ring hebben. Uit de plaatsing der ringen blijkt dat ze aan de vegetatieve polen versmolten zijn. *c*. Het resultaat dezer versmelting: een diploexopluteus, echter met weinig skelet. Op de gemeenschappelijke voordarm worden twee coeloomblaasjes afgesnoerd. *b*. Tweelingsblastula, waarvan één met de vegetatieve pool aan de animale pool van den ander versmolten is. Vergrooting 36 ×.

tweeling mij vaak voor eene verbreking der verbinding deden vreezen. Beide darmen deelden zich, waarbij de twee voordarmen te samen eene ronde vorm behielden, en twee kleine coeloomblaasjes snoerden zich af, die nog eenigen tijd te zien waren. Of een mond gevormd werd kon ik in dit geval niet

uitmaken, wel was het aan andere exemplaren te zien. Het skelet bleef zeer onvolledig, zoodat de plutei een meer of minder ronden vorm behielden (Fig. 14*c*). Bij een anderen tweeling van dezelfde cultuur bewezen de ringen, dat een partner met zijne vegetatieve pool aan den ander verbonden was, en diens as met die van den eersten een hoek van circa 120° maakte. Deze combinatie leverde een Haplo-exopluteus, de uitgestulpte en gedeelde darm was aan den lichaamswand van den partner vastgehecht. Beide helften vormden volledige skeletten, doch brak hier de verbinding aan het eind van den voordarm door, en zoo zwom in het isolatiebakje een goed uitgegroeide exopluteus rond, terwijl zijn partner natuurlijk onder de normale plutei niet meer terug te vinden was.

Bij diegenen, waar de ring onduidelijk was, of wier eieren nooit een ring vertoonen, is men natuurlijk niet zóó zeker over de richting der assen georienteerd. Zoo had ik voor de in Fig. 12 afgebeelde tweeling genoteerd: „zal diplo-exogastrula worden". Echter stulpte slechts één zijn darm uit, deze darm was met den darmwand van zijn partner vergroeid. Mijne schatting dat ze aan de vegetatieve polen vereenigd waren, was dus slechts voor één geheel juist geweest, maar bleek ook voor den ander vrij nauwkeurig uit te komen. Daar deze tweeling geen skelet vormde, kwam er geen echte pluteusvorm uit. Geheel hiermede te vergelijken was echter een Paracentrotus-tweeling zonder zichtbare ringen, dien ik wegens zijne mesenchymvorming ook

als toekomstige Diplo-exogastrula aangeteekend had, en ten slotte ook slechts Haplo-exogastrula werd. Hier (Fig. 15) ziet men zeer duidelijk, hoe de uitgestulpte darm van den eenen met den darmwand van den ander vergroeid is.

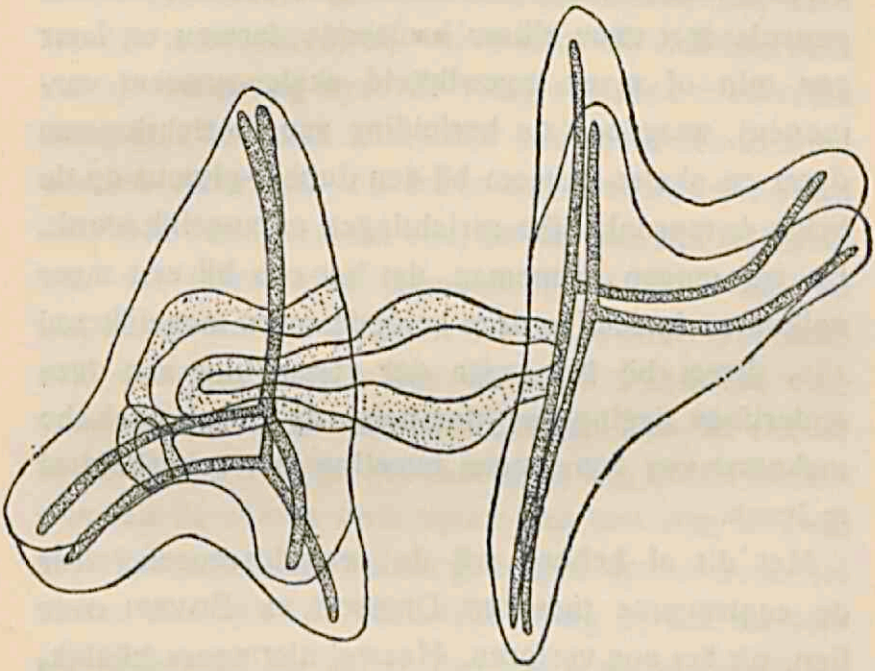


FIG. 15. Paracentrotus lividus. Haplo-exopluteus, ontstaan uit twee blastulae, ongeveer aan de vegetatieve pool versmolten. De uitgestulpte darm is met den darmwand van den ander vergroeid. Vergrooting 150 ×

Het is dus nu zeker, dat er in elk geval ééne bepaalde onderlinge richting der eiassen is, die steeds een bepaald versmeltingsresultaat ten gevolge heeftt. Van eene tendenz naar paralleliteit der eiassen was op een vroeg stadium niets te bemerken, en ook later treedt

deze niet op. Het wordt dus zeer waarschijnlijk dat het in de overgroote meerderheid der gevallen slechts de onduidelijkheid der eiassen is (die hun onderlinge orienteering niet met zekerheid laat vast stellen en niet voldoende laat markeeren), en het weinig karakteristieke van de resultaten (die dan een dubbelgastrula met twee elkaar kruisende darmen en later een min of meer ingewikkeld skelet-systeem vertoonen), waardoor de herleiding van de richting van darm en skelet-systeem bij den dubbel-pluteus op de beide oorspronkelijke asrichtingen onmogelijk wordt. En we mogen aannemen, dat het ons bij een meer volkomen inzicht in deze beide factoren mogelijk zou zijn, direct bij het begin der versmelting aan deze onderlinge ligging der kiempolen de morphologische toekomst van den jongen tweeling met zekerheid af te lezen.

Met dit al hebben wij de eenheidsreuzen, waar de controverse tusschen DRIESCH en BOVERI over liep, uit het oog verloren. Hoewel niet waarschijnlijk, zou het nog mogelijk kunnen zijn, dat hierbij DRIESCH gelijk had, en deze vormen het product van eene zeer vroege kiemvereeniging zouden zijn. Aangezien voor de opvatting van BOVERI nog geen directe bewijzen aan te voeren zijn, zullen we de discussie hierover tot een later hoofdstuk uitstellen, en eerst kort de resultaten bij de verschillende species behandelen.

B. Paracentrotus lividus.

In dezelfde publicatie, waarin hij den teruggevonden pigmentring van Paracentrotus beschrijft, heeft BOVERI de wenschelijkheid uitgesproken, de versmeltingsproeven van DRIESCH aan eieren van deze species te herhalen, bij welke door de zichtbaarheid van de asrichting over de vraag van eene eventueele draaiing dier assen misschien zekerheid zou kunnen worden verkregen. En zeker zou Paracentrotus daarvoor zeer geschikt zijn, als het niet zoo zeldzaam was dat men dezen pigmentring duidelijk zag. In Napels waren wel wijfjes te vinden, waarbij tenminste een deel der eieren een duidelijk zichtbaren ring vertoonden, in Roscoff daarentegen heb ik slechts éénmaal zoo'n wijfje gevonden, bij een dozijn andere was aan de eieren geen spoor van een ring te zien. Ook heb ik wel den indruk gekregen, dat van beiderlei eieren die zonder duidelijken ring eerder tot versmelting geneigd waren dan die met, of misschien juister, dat de aan de versmelting voorafgaande behandeling een verstrooiing van het pigment tengevolge had. In elk geval bleef het eene uitzondering, eene dubbelblastula te vinden, waarbij men zonder twijfel aan de plaatsing der beide ringen de asrichtingen kon herkennen.

Paracentrotus laat zich verder niet zoo gemakkelijk vereenigen als Parechinus, waar men bijna altijd eenige tweelingen krijgt; vaak heb ik bij eieren van een wijfje in 't geheel geen versmeltingen gekregen.

Deze „tegenzin" tegen versmelting bleef dan meestal in latere stadiën bestaan, ook uit de blastulae uit de contrôle-cultuur kon ik in zoo'n geval geen versmeltingen krijgen. Centrifugeeren gedurende ongeveer vijf minuten, terwijl de eieren in kalkvrij zeewater waren, vermeerderde soms wel eenigszins het aantal tweelingen, maar van eene ontwijfelbare verbetering was ook hier geen sprake. Daarbij komt nog het technische bezwaar, dat de bevruchtingsmembraan zoo lastig af te schudden is, en men zoo steeds een zeker aantal eieren behoudt die, door hunne membraan beschermd, zich aan allen drang tot versmelting onttrekken. Ten slotte heeft het kalkvrije zeewater eene veel minder sterke werking op Paracentrotus-blastulae dan op die van Parechinus. Wanneer men blastulae van beide soorten in kalkvrij water mengt, vangt de werking bij Paracentrotus direct aan, bij Parechinus eerst na ongeveer vijf minuten. Daarentegen zijn de blastulae van den laatsten na een kwartier sterk vervormd en liggen op den bodem, terwijl bij Paracentrotus de vorm veel meer behouden blijft.

Relatief het gemakkelijkst gelukten nog de vereenigingen met vrij zwemmende blastulae. Zoo werden eens blastulae van twintig uur, waarvan reeds enkelen door afplatting de komende gastrulatie aankondigden [1]), gecentrifugeerd en 15 tot 25 minuten in alkalisch

---

1) Drie uur later waren de niet gecentrifugeerden reeds in verschillende stadiën der gastrulatie.

kalkvrij zeewater gebracht. Uit de tweede groep kon ik den volgenden morgen negen versmeltingen isoleeren. Eén van deze negen ontwikkelde zich tot haplo-exopluteus, maar verloor later eerst zijn partner en daarna zijn uitgestulpten darm. Een tweede was uit drie blastulae versmolten, en had eene zeer ingewikkelde combinatie van darmen en skeletspangen tot resultaat. Eenige anderen wederom vertoonden het algemeene type met twee darmen en dubbel, hoewel onregelmatig, skelet. Het belangrijkste was echter eene reuzen-blastula, die bij het isoleeren reeds geheel rond was en op dit oogenblik 13 deelstrepen mat, terwijl de normalen er 9 telden. Van den ring was hier geen spoor te zien, evenmin als bij de anderen. Deze reus stulpte een enkelvoudigen darm in, en ontwikkelde zich ten slotte tot de in Fig. 16 geteekende eenheids-reuzenpluteus. Zooals men ziet, is de vorm geheel enkelvoudig, zoowel wat darm [1]) als skelet betreft. Bij dit laatste zijn er wel enkele onregelmatigheden, zoo zijn de anaal-armstaven verdubbeld en zelfs verdriedubbeld en aan den top is een kleine overtollige skeletspang te zien. Deze onregelmatigheden zijn echter niet als rest van een tweede skelet op te vatten, want verdubbeling en overtollige skeletspangen komen bij plutei in culturen meer voor. [2])

---

1) Daar de omtrekken der beide andere darmdeelen zich niet zoo duidelijk afteekenden als de middendarm, werden ze in de figuren weggelaten.

2) Men vergelijke hiermede de figuren van TENNENT [1910].

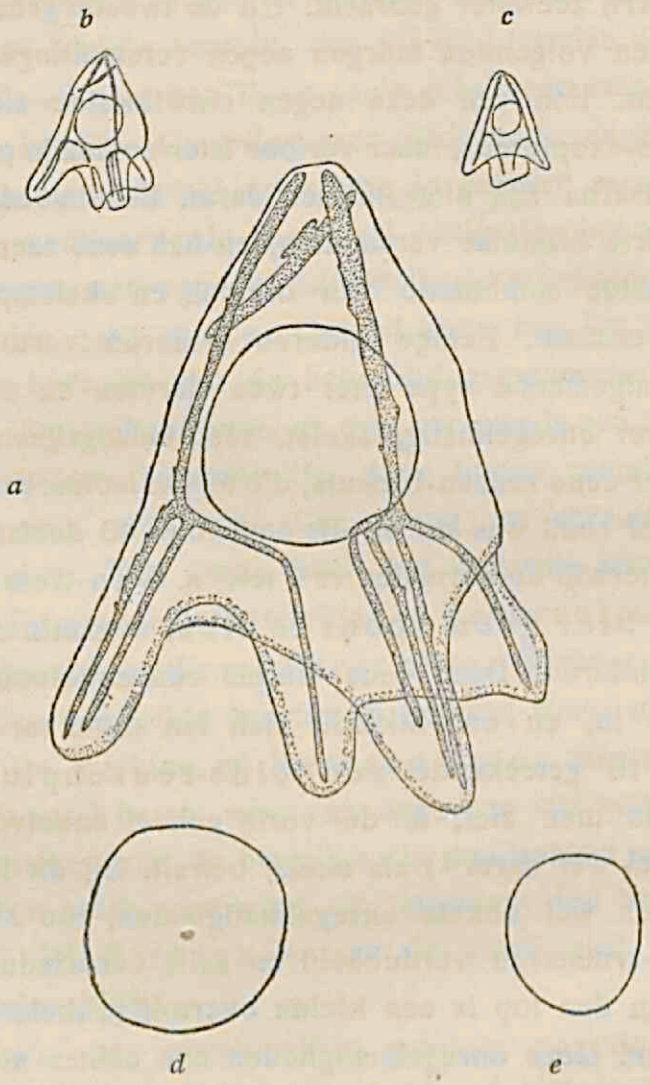


FIG. 16. Paracentrotus lividus. *a*. Eenheidspluteus, ontstaan uit twee versmolten blastulae (vergrooting 150 ×). *b*. Dezelfde, 36 × vergroot, ter vergelijking met *c*, normale pluteus, ook 36 × vergroot. *d* en *e* middendarm respect. van *b* en *c*, vergrooting 150 ×. Voor afmetingen zie tekst.

Slechts in de afmetingen komt dus zijne dubbel-natuur uit. Ter vergelijking zijn in de hoeken van de figuur de reus en een normale pluteus uit dezelfde cultuur bij gelijke vergrooting geteekend, en onderaan ook de middendarmen van deze twee. Meting toonde aan dat (bij ZEISS Obj. A. Oc. 2) de lengte van den top tot het eindpunt der armen respectievelijk 22.5 en 16 deelstrepen bedroeg, en (bij ZEISS Obj. D. Oc. 2) de doorsnede van den middendarm respectievelijk 30.8 en 22 deelstrepen, de breedten der trilhaar-zoomen aan de armen respectievelijk 6 en 4, en de lengten van het toppunt van de skeletstaaf tot het vertakkingspunt respectievelijk 53 en 40. Hier vindt men dus de bovenvermelde en voor versmelting op later stadiën karakteristieke verhouding 1,4 = $\sqrt{2}$ tamelijk nauwkeurig terug, slechts de topstaaf van den reus was relatief iets te kort, wat wel gevolg zijn zal van de vorming van het overtollige skeletstuk.

We hebben hier dus een typische reuzen-eenheidsvorm vóór ons, maar zijn ontstaan geeft aanleiding tot enkele opmerkingen. Volgens DRIESCH immers ontstonden de eenheidsvormen uit vroegtijdig versmolten kiemen, maar hier zijn de kiemen die den eenheidspluteus vormden volstrekt niet vroeg versmolten, integendeel niet vóór het latere blastulastadium. Daarbij komt nog, dat tegelijk met dezen nog acht andere geïsoleerd werden, die allen zich op ongeveer hetzelfde oogenblik hebben moeten vereenigen (in elk geval op hetzelfde ont-

wikkelingsstadium, terwijl versmeltingen uit eieren daartoe meer speelruimte hebben). Slechts één van deze negen werd een enkelvoudige reuzenvorm. En ten slotte heb ik de blastulae waaruit deze eenheidsvorm ontstond uit een contrôlecultuur [1]) genomen, nadat ik uit de hoofdcultuur van hetzelfde experiment reeds versmeltingen had geïsoleerd, waarvan ik wel de in Fig. 18 geteekende Haplo-exopluteus, maar geen eenheidsvorm kreeg.

Op vier gronden dus, n.l. ten eerste, daar eenheidsplutei ontstaan kunnen uit kiemen die in elk geval laat vereenigd zijn, ten tweede omdat van ongeveer gelijktijdig vereenigden slechts één tot eenheidsvorm werd en de anderen niet, ten derde omdat vroeger en veel later versmoltenen dezelfde resultaten geven kunnen (in casu Haplo-exoplutei), en ten vierde daar van twee op verschillende stadiën versmoltenen de latere tot eenheidsvorm zich ontwikkelen kan, terwijl de vroeger versmoltene het niet doet, hebben wij, naar ik meen, het recht DRIESCH' hypothese te verwerpen en voor de eenheidsvormen andere oorzaken dan het versmeltingsmoment aan te nemen.

* * *

1) Hierbij zij nog vermeld dat als contrôlecultuur steeds een deel van de bevruchte eieren genomen werd, die slechts niet van hunne membranen waren beroofd. De contrôlecultuur stamt dus van hetzelfde wijfje, en is van denzelfden leeftijd als de behandelde eieren.

Een tweede eenheidsvorm kreeg ik bij Paracentrotus uit eene cultuur, waarvan de eieren tot het blastulastadium gecentrifugeerd waren. Ik isoleerde een klomp van drie blastulae, waarvan twee met elkaar versmolten, en de derde met deze versmelting verkleefd was. Evenals de enkelvoudige stulpte ook de dubbele slechts één darm in, maar zag er toen reeds troebel uit en bracht het niet tot skeletvorming. In Fig. 17 herkent men zijn dubbelen oorsprong duidelijk aan de grootere afmetingen.

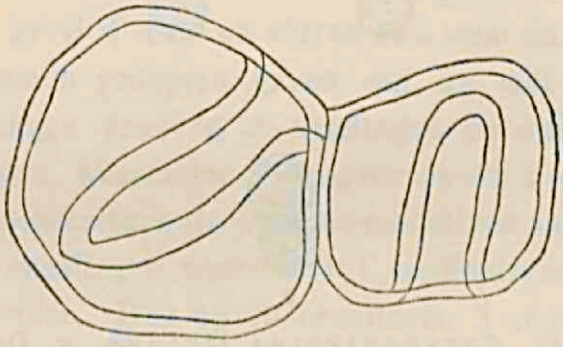


Fig. 17. Paracentrotus lividus. Verkleving van twee gastrulae. Zoowel door oorsprong als afmetingen blijkt de linker een éénheids-dubbelvorm, de rechter een enkelvoudige. Vergrooting 150 ×.

Merkwaardig was bij Paracentrotus het groote aantal der exogastrulae, respectievelijk exoplutei. Zoo even werd reeds de in Fig. 18 geteekende vermeld. Hij ontstond uit bewerkte eieren; slechts één der twee blastulae had een zichtbaren ring die dicht bij de verbindingsopening parallel hiermede verliep. Des namiddags was de verbindingsopening nauwer geworden, het scheen alsof de beide partners tracht-

ten te scheiden, slechts één had een darm ingestulpt. In werkelijkheid was het niet een eenvoudig verbreken der blastocoel-verbinding, maar door het uitgroeien van den anderen darm naar buiten was eene nieuwe, en aanmerkelijk nauwere, verbinding tot stand gekomen. De beide lichaamsholten waren dus nu door het darmlumen verbonden; daar deze uitstulping

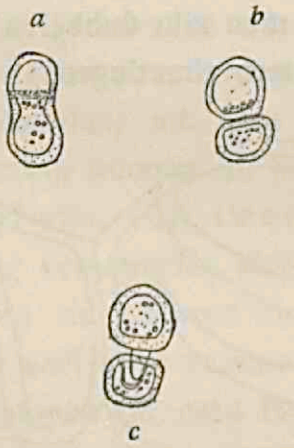


FIG. 18. Paracentrotus lividus. *a.* Dubbelblastula, slechts één vertoont een ring en blijkt aan de vegatieve pool vergroeid te zijn. *b.* Volgend stadium: die met ring begint zijn darm uit te stulpen. *c.* Derde stadium: de uitgestulpte darm van den éénen met de darmwand van den ander vergroeid. Later zagen ze er ongeveer uit als het tweelingspaar van Fig. 15. Vergrooting 36 ×.

zich echter spoedig sloot, werden hierdoor de eens verbondene blastocoelen weer gescheiden. Men zou misschien zoo iets als een streven naar scheiding willen opvatten, indien het optreden dezer exogastrulae niet zoo regelmatig volgde op eene vergroeiing

aan de vegetatieve pool, en daarbij niet zoo goed mechanisch te verklaren was.

In het geheel heb ik 11 malen beproefd Paracentrotus-kiemen onder elkaar en 23 malen ze met kiemen van andere species te vereenigen. Hiervan heb ik 5 respectievelijk 16 maal geen versmeltingen gekregen, of deze waren zoo pathologisch, dat ze het isoleeren niet waard waren. Van de 6 malen waarbij met goed gevolg Paracentrotus-kiemen onder elkaar gecombineerd werden, waren 4 malen de resultaten uit eieren, en 2 maal uit blastulae gewonnen; in het andere geval 4 maal uit eieren en 3 maal uit blastulae. Alles samen genomen gaven mij de met blastulae aangevangen proeven 3 drielingen en ongeveer 40 tweelingen, waaronder 1 exogastrula en 1 eenheidsvorm; daarentegen de proeven met eieren 4 drielingen en 29 tweelingen waaronder 1 eenheidsvorm en 12 exogastrulae. Dus op 70 tweelingen 2 eenheidsvormen en 13 exogastrulae. Dit laatste getal is relatief zeer groot; nu is natuurlijk wegens de geringe absolute grootte der getallen het toeval niet voldoende uitgesloten, doch het schijnt mij dat Paracentrotus een „voorliefde" voor exogastrulae toont, wat eene uitdrukking daarvan zijn kan, dat van de in alle richtingen verkleefde eieren of blastulae zulke de grootste kans op versmelten hebben, waarbij een of beide componenten met de vegetatieve pool aan den ander vastgehecht is.

Maar ook met eene andere mogelijkheid moet rekening gehouden worden. Eenige malen heb ik exo-

gastrulae gekregen uit tweelingen, wier lichaamsholten bij het isoleeren niet vereenigd waren, en die zich van de gewone verklevingen slechts daarin onderscheidden, dat men een soort brug tusschen de

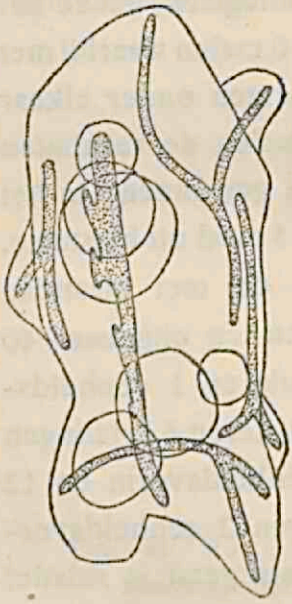


FIG. 19.
Paracentrotus lividus. Tweelingspluteus, ontstaan uit bewerkte blastulae, waarbij twee onvolkomen skeletten, en eene geheel overcomplete skeletspang gevormd zijn. Vergr. 150 ×.

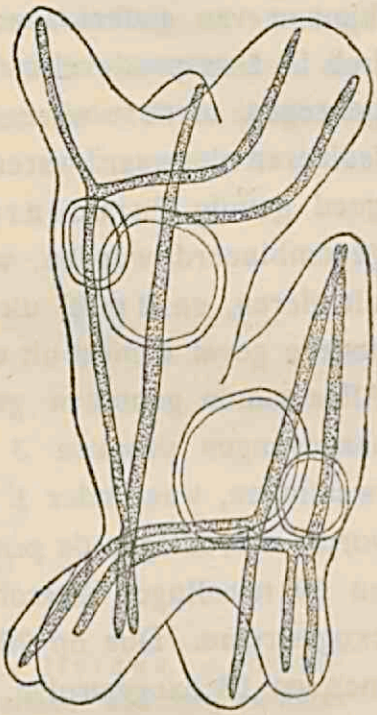


FIG. 20.
Idem. Tweeling uit gecentrifugeerde blastulae ontstaan. Skeletten goed uitgegroeid. Typisch voorbeeld van een tweeling met willekeurig gerichte assen en zonder skeletdefecten. Vergrooting 150 ×.

lichaamswand der beide afgeplatte blastulae waarnemen kon. Later bleek dan dat deze brug de darm van een der twee partners was. Nu is het natuurlijk mogelijk, dat ze wel korten tijd versmolten geweest

waren, en dadelijk daarop door uitstulping van den darm weder hun blastocoel gescheiden hadden. Waarschijnlijker is echter dat haplo- en diplo-exogastrulae ook ontstaan kunnen uit blastulae, die aan

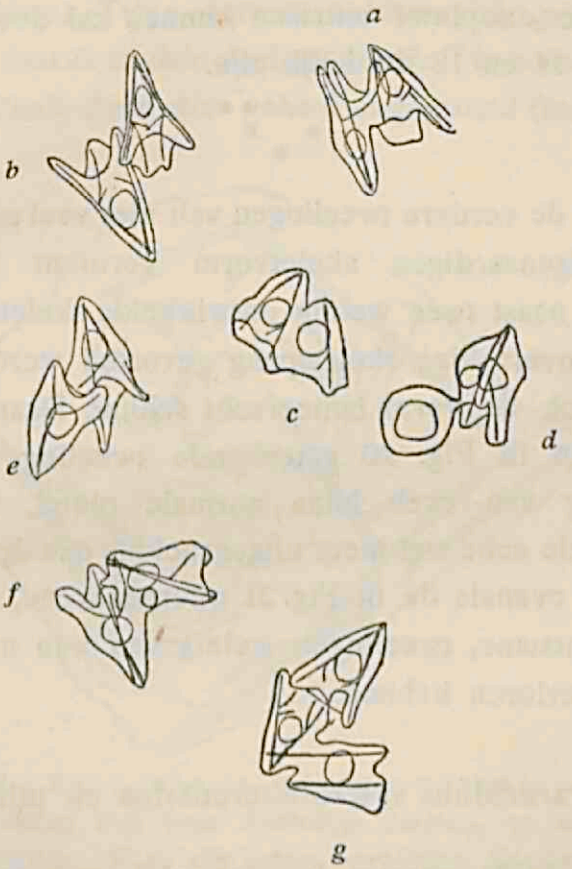


FIG. 21. Paracentrotus lividus. Vergroeiingen uit gecentrifugeerde blastulae, overeenkomend met die van Parechinus van Fig. 6. Lichaamsholten bij enkele gescheiden, verbindingen vaak door smalle ectodermbrug (bijv. *b*, *d*). Vergrooting 36 ×.

de plaats van den oermond slechts verkleefd zijn, welke verkleving daar dan eerder dan elders sterk genoeg wordt om aan de zwembeweging weerstand

te kunnen bieden, en de invaginatie in eene evaginatie te kunnen veranderen. Dat desniettegenstaande echter ook het omgekeerde waar blijft, en uit versmoltene blastulae toch weder van elkaar gescheiden exoplutei ontstaan kunnen zal door mijne figuren 14 en 18 duidelijk zijn.

* * *

Over de verdere tweelingen valt niet veel te zeggen. Een eigenaardigen skeletvorm vertoont Fig. 19, waarbij naast twee weinig ontwikkelde skeletten eene groote overtollige skeletspang gevormd werd, waardoor ook de vorm beheerscht schijnt. Daarentegen toont de in Fig. 20 geteekende tweeling de vereeniging van twee bijna normale plutei, waarvan slechts de eene wat meer uitgegroeid is dan de andere, en die, evenals de in Fig. 21 weergegevene, uit blastulae ontstane, tweelingen weinig van hun normalen vorm verloren hebben.

C. Parechinus microtuberculatus en miliaris.

Deze beide species leenden zich wegens hunne groote doorzichtigheid zeer goed voor mijne proeven, in 't bijzonder de Atlantische vorm door de grootere afmetingen der larven. De bevruchtings-membraan is gemakkelijk af te schudden, en versmeltingen waren zonder bezwaren en vaak in relatief grooten getale te verkrijgen, zoodat ik ten slotte niet meer alles isoleerde, maar die waarbij twee zich kruisende

darmen ingestulpt werden, en die zoodoende het banale type der dubbelvorming vertoonden, meestal niet verder bleef waarnemen.

Van dit banale type moge nog Fig. 22 als voorbeeld dienen. Twee darmen hebben zich geïnvagineerd en daarna in drie deelen geleed. Twee skeletten zijn gevormd, doch niet geheel uitgegroeid (men ziet

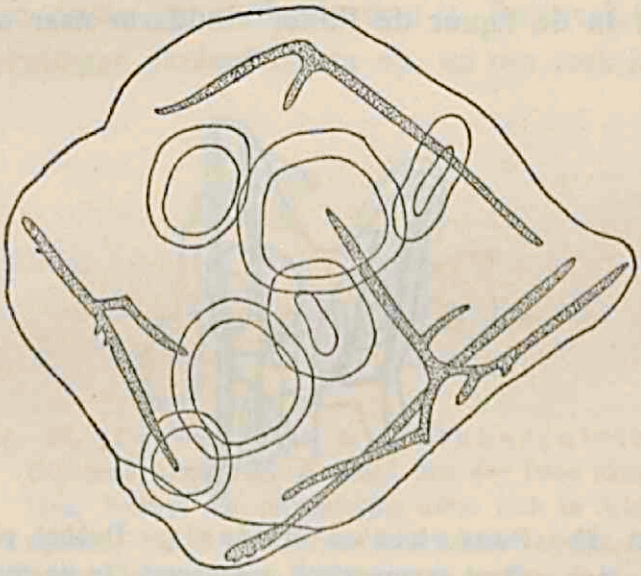


FIG. 22. Parechinus microtuberculatus. Tweeling met twee drieledige darmen, en twee skeletten. Deze zijn echter onvolledig, dientengevolge bleef de vorm vrij rond. Vergrooting 150 ×.

dat beide skeletten in gelijke mate defect zijn; van een verbruiken van het eene skelet door het andere is niets te zien), ook liggen de spangen abnormaal. Dientengevolge zijn dan ook de armen niet uitgegroeid en is de vorm meer of minder rond gebleven. Dergelijke skeletdefecten zijn bij Parechinus bijna

regel. Verder is in Fig. 23 een tweeling geteekend, waarvan de beide partners geheel symmetrisch ten opzichte van elkaar gelegen waren. Ik had hem niet van den aanvang af geobserveerd, maar hij moet uit eene dubbel-gastrula ontstaan zijn, waarbij de darmen in één vlak lagen en een hoek van 180 graden vormden, (zooals de in Fig. 5, bladz. 40 geteekende), en zich later in dezelfde richting ombogen, want terwijl in de figuur de linker einddarm naar onder,



FIG. 23. Parechinus miliaris. Dubbel pluteus, geheel symmetrisch opgebouwd. In de rechterhelft ligt de einddarm boven, in de linker onder. Vergrooting 65 ×.

de rechter naar boven gekeerd is, zijn de beide voordarmen naar dezelfde zijde gekromd.

Haplo- en diplo-exogastrulae traden ook hier op, Fig. 24 geeft er een voorbeeld van. Daar ik, zooals gezegd, niet alles meer isoleerde, kan ik over de relatieve frequentie niets zeggen. Maar ook hier ging de regel op dat, wanneer één of beide

aan de vegetatieve pool met zijn partner vergroeid was, steeds de darm uitgestulpt werd.

Alles samen heb ik van deze beide species circa 120 versmeltingen geïsoleerd, hiervan werden 21 haplo- of diplo-exogastrulae. Van de 100 die geen exogastrulae werden, stulpten 6 tweelingen slechts één enkelvoudigen darm in. Nu kan men met recht vragen, of een tweeling die slechts één darm vormt, daarom reeds een eenheidsvorm is. Zoo vaak treden bij tweelingen skeletdefecten op, en zoo vaak komen

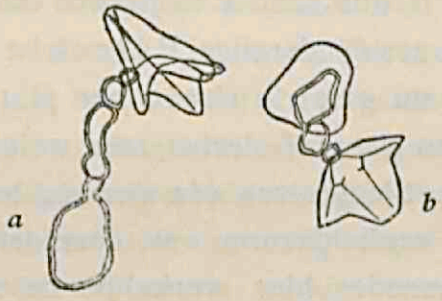


FIG. 24. Parechinus microtuberculatus. Diploexoplutei. Bij *a* bleef een der twee skeletloos, hoewel de uitgestulpte darm zich in drieën deelde. Bij *b* bleef ook een zonder skelet, den ander ziet men van boven.

vrij gebleven kiemen in de culturen niet over het blastulastadium heen, dat men ook met de mogelijkheid rekening houden moet, dat van twee vereenigde blastulae ééne wegens pathologische gesteldheid de darmvorming nalaat. Toch heeft men tenslotte wel eenige kriteriën daarvoor: zulke pathologisch eendarmigen zullen wel nooit zoo'n gezond uiterlijk vertoonen als het b.v. de in Fig. 16 (bladz. 70) afgebeelde Paracentrotus-reus deed. Een zekerder kriterium vindt men

echter in de darmafmetingen: evenmin als in het geval, dat een reeds gevormde darm afsterft, eene compensatie van den gezonden plaats vindt, mag men eene volumenvergrooting hiervan verwachten in het geval dat één der beide blastulae niet tot darmvorming komen kan, en zoo kan men ten slotte aan de grootere afmeting van den eenigen darm, ook wanneer de gastrula zonder skeletvorming sterft, den echten eenheidsvorm van den defecten tweeling onderscheiden. De in Fig. 17 (bladz. 73) afgebeelde Paracentrotus is dus zonder twijfel een eenheidsvorm.

Van mijne zes ééndarmige Parechinus-tweelingen bereikte nu geen enkele het pluteusstadium, allen vormden geen of slechts zeer weinig skelet en bleven rond. Slechts van één der zes ben ik zeker dat het een eenheidsvorm was, daar darmlengte en lichaamsdoorsnede hier werkelijk de verhouding 1,4 : 1 tot die van een normalen vertoonden. Van de anderen heb ik tot mijn spijt nagelaten, bij tijds teekeningen te maken of afmetingen te noteeren, en ik geloof wel aan de mogelijkheid dat eenige „onechte" zich hierbij bevonden.

Dus slechts één onbetwijfelbare eenheidsvorm onder meer dan 120 tweelingen; dit aantal is niet groot. DRIESCH vond in 1900 onder 30 gezonde versmeltingen 4 eenheidsvormen, dus eene veel gunstiger verhouding. Toch geloof ik niet dat men het recht heeft een grooter aantal bij relatief zoo weinige proeven te verwachten.

* * *

Terwijl het in Juni in Roscoff niet bezwaarlijk was, rijpe eieren van Parechinus te krijgen, vond ik aan het eind van deze maand enkele malen wijfjes, die hunne eieren reeds gelegd hadden. Dit was in Juli nog meer het geval, zoodat in de tweede helft van Juli nog slechts bij uitzondering Parechinus-eieren te krijgen waren. In dezen tijd vertoonden de eieren vaak sporen van overrijpheid: soms bleven ze in pakken samenkleven, in plaats van zich gelijkmatig in de cultuurschaal te verdeelen, ook hadden ze wel een langgerekten vorm en waren als tot eisnoeren verkleefd. In dezen tijd kreeg ik ook de op bladz. 19 beschreven eiversmeltingen. Voor de versmelting van latere ontwikkelingsstadien was dit einde der rijpheidsperiode niet gunstig: de eieren en blastulae bleken zeer gevoelig tegen schudden of kalkvrij zeewater, en de weinige versmeltingen die ik kreeg waren meestal zwart en stierven spoedig af. Dit toont dat de onbekende „dispositie" der eieren, die noodig schijnt om versmeltingen te krijgen, niet in direkten samenhang staat met den ouderdom der eieren, zooals men misschien geneigd zou zijn aan te nemen. Integendeel heb ik de meeste tweelingen midden in het seizoen met gezonde eieren verkregen.

D. Arbacia pustulosa.

Arbacia pustulosa bleek voor mijne proeven zeer weinig geschikt. Zooals bekend is, zet zich hier de

bevruchtingsmembraan zeer onduidelijk af, zoodat men later ook geene zekerheid heeft of ze afgeschud is of niet. Daarbij komt nog de donkerroode pigmenteering der eieren en larven, waardoor men versmeltingen amper van verklevingen onderscheiden kan, en in het eerste geval moeilijk zien kan hoeveel darmen ingestulpt zijn, en wat hunne onderlinge ligging is. Ook bleken de blastulae zeer gevoelig voor kalkvrij zeewater. Ik heb daarom slechts weinig met deze species gewerkt; uit eieren heb ik eenige versmeltingen verkregen, die echter niet van groot belang waren.

E. Sphaerechinus granularis.

Sphaerechinus onderscheidt zich van de andere gebruikte soorten voornamelijk door zijne langzamere ontwikkeling. Reeds de eerste klieving vangt later aan dan bij de overigen, twee uren na de bevruchting is Sphaerechinus op het twee-stadium, Paracentrotus daarentegen op het vier-stadium, dat Sphaerechinus na 4 uur bereikt, wanneer Parechinus reeds op het acht-stadium is, enz. Dit onderscheid blijft ook in het larvenleven bestaan: terwijl de Paracentrotus-blastulae na 18 uur hunne bevruchtingsmembraan verbreken, vindt dit bij Sphaerechinus eerst na ongeveer 22 uur plaats, zoodat na 24 uur de Sphaerechinus-blastulae nog langzaam zonder mesenchym rondzwemmen, terwijl de Parechini en Paracentroti reeds een min of meer volledigen darm ingestulpt hebben.

Een gevolg van dit langere volharden op het blastula-stadium is, dat meer dan bij de anderen de ingesnoerde vorm der versmeltingen in een ronden overgaat. Ook op jonge stadiën vindt men reeds ovale en ronde reuzenblastulae, zoodat men aan mag nemen, dat die vereffening der insnoering vrij vroeg aanvangt. Eenige malen isoleerde ik enkele opvallend diep ingesnoerde blastulae, die later echter door hunne afmetingen bleken enkelvoudig te zijn, zoodat men den indruk krijgt dat de, waarschijnlijk door schudden ontstane, insnoering bij een enkel individu minder snel vereffend wordt dan die bij de vereeniging van twee individuen ontstaat.

In de ronde of ovale blastulae worden meestal twee darmen ingestulpt, die geheel willekeurig gelegen zijn, en de Fig. 25 en 13 (bladz. 61) vertoonen voorbeelden, hoe zulke uit twee eieren of blastulae vereenigde tweelingen er uitzien. Vaak worden de beide darmen meerdere uren na elkaar gevormd. De tweede staat dan natuurlijk in het begin in omvang bij den ouderen achter. Meestal echter wordt dit onderscheid bij het verder groeien ingehaald (zelfs eenmaal toen de eene darm eerst ongeveer $1^1/_2$ maal zoo groot was als de andere), soms, als de tweeling weinig levensvatbaarheid vertoont, heeft de jongere geen gelegenheid meer zijn ouderen broeder in te halen, en in zoo'n geval blijft een onderscheid in lengte bestaan. Het tegenovergestelde geval dat van oorspronkelijk gelijke instulpingen de eene in groei uitloopt, zooals

MORGAN beschrijft [1]), heb ik nooit waargenomen. Ook hier geloof ik dat, wanneer men van een oogenblik der versmelting spreken wil, men dit oogenblik in 't algemeen zeer vroeg aannemen moet,

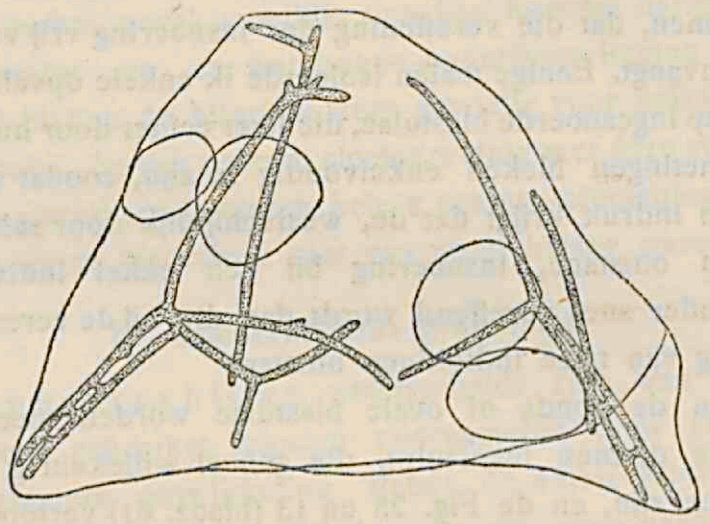


FIG. 25. Spaerechinus granularis. Tweelingspluteus, uit bewerkte eieren ontstaan, met twee evengroote darmen en twee onvolledige skeletten, waarvan één toch meer uitgegroeid is dan het andere en den vorm beheerscht. Vergrooting 150 ×.

want reeds op een vroeg stadium vindt men larven met vereenigde lichaamsholte. Toch heb ik juist bij

---

1) Overigens is MORGAN op dit punt niet zeer duidelijk. In den tekst schrijft hij [1896, blz. 67]: „It is not uncommon to find that at the end of gastrulation one of the two invaginations has far outstripped the other", en „the smaller invagination may cease to grow"; in zijne (Duitsche) samenvatting schrijft hij daartegen „Oft überholt die eine Einwucherung die andere im Wachstum". Ik geloof dat de eerste wijze van uitdrukken neutraler en daarom beter is dan de tweede.

Sphaerechinus enkele malen eene werkelijke vereeniging van twee te voren gescheiden blastocoelen op het latere blastula-stadium waargenomen. Zoo vond ik eens onder blastulae uit bewerkte eieren eene verkleving, die mij opviel door de buitengewone smalheid van den scheidenden tusschenwand (Fig. 26). Na isolatie zag men de tusschenwand op enkele plaatsen nog dunner worden,

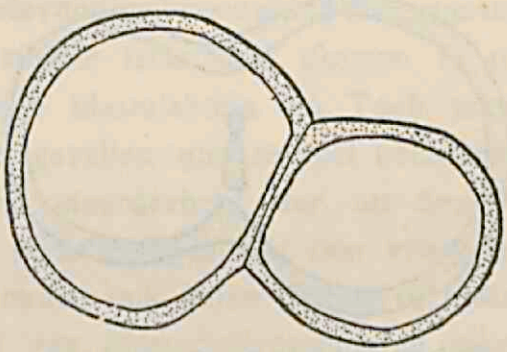


FIG. 26. Sphaerechinus granularis. Twee verkleefde blastulae, die sterk onderling afgeplat zijn. De tusschenwand was opvallend dun. Vergrooting 150 ×.

en ongeveer een uur na het isoleeren had de tweeling den vorm van Fig. 27 aangenomen: in het midden was de tusschenwand nog gedeeltelijk bewaard gebleven, aan beide zijden echter hadden zich openingen gevormd waardoor de beide blastocoelen communiceerden, bovendien was de geheele vorm minder ingesnoerd dan te voren. Was het de vormafronding geweest die den scheidenden wand uitgerekt en ten slotte verscheurd had? Of was de

oplossing van het weefsel het primaire en de afronding het gevolg daarvan? Tot mijn spijt kon ik den verderen levensloop van dezen vorm niet vervolgen, daar ik uit onvoorzichtigheid te veel van de vloeistof op het objectglas liet verdampen en de blastula daardoor aan plasmolyse te gronde ging.

Een ander maal dat ik een dergelijk object vond met nauwen tusschenwand, isoleerde ik het 's morgens

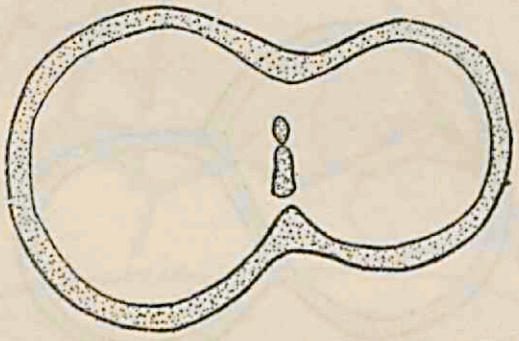


FIG. 27. Sphaerechinus granularis. Zelfde object als in Fig. 26, één uur later geteekend. De insnoering is gedeeltelijk verdwenen, in de tusschenwand zijn openingen ontstaan, waardoor de beide holten communiceeren. Vergrooting 150 ×.

10 uur op een objectglas in eene vochtige kamer. Des namiddags was het nog onveranderd, eerst den volgenden morgen waren werkelijk zijne helften vereenigd, hij was ovaal geworden en mat 14 × 12 deelstrepen, terwijl eene normale blastula, die er mee verkleefd was, 9 × 10 deelstrepen in doorsnede had. Ik bracht hem daarop in een isoleerbakje met zeewater terug, hier echter begon hij op te zwellen en had in den namiddag ongeveer de dubbele doorsnede

van eene normale aangenomen, had dus de afmetingen van een vierling. Door het opnemen van water was echter de wand zóó dun geworden, dat de reus bij het overpipetteeren barstte, en slechts de normale larve met resten van den reus terug te vinden was.

Hoewel van deze twee niets terecht kwam, heb ik ook eens een dubbelvorm geisoleerd waarmee een derde verkleefd was, en die den volgenden morgen in eene drievoudige versmelting overgegaan was. Deze drieling stulpte later drie darmen in de gemeenschappelijke blastulaholte in. Toch mag men aan dergelijke gevallen niet te veel beteekenis hechten. De groote meerderheid der uit bewerkte eieren ontstane versmeltingen zijn zeer vroeg te isoleeren, anders zouden ook zulke directe of indirecte waarnemingen van blastocoelvereeniging vaker mogelijk moeten zijn.

Evenals bij de andere species kwamen ook bij Sphaerechinus exogastrulae voor. Fig. 28 vertoont een drielingsblastula, waar de afsnoering van den rechter partner reeds aangevangen is. De grootere helft stulpte twee darmen in, het rechterdeel daarentegen zijn darm uit. Alles te zamen heb ik 79 Sphaerechinusversmeltingen kunnen isoleeren (eenige zeer slecht uitzienden werden niet geïsoleerd), van deze 79 waren slechts drie uit vrij zwemmende blastulae ontstaan; het vereenigen op verder ontwikkelingsstadium had bij Sphaerechinus zeer weinig effect. Van de 79 versmeltingen werden 7 tot (haplo)-exogastrulae.

Ook eenheidsvormen kwamen bij Sphaerechinus voor. Eén van de drie uit blastulae ontstane tweelingen werd tot de vorm van Fig. 29, zij mat 19 deelstreepen, de normale uit dezelfde cultuur 14. Ook hier had men weer hetzelfde als bij Paracentrotus: slechts één van die versmeltingen uit blastulae werd tot eenheidsvorm, de andere op het zelfde stadium versmoltenen niet. Twee anderen ontstonden uit behandelde eieren, en ontwikkelden

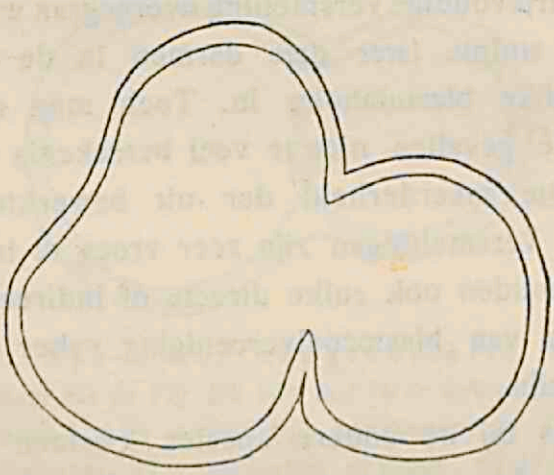


FIG. 28. Sphaerechinus granularis. Drieling, waarvan één (de rechtsche) component zich begint af te snoeren; deze afsnoering is niets anders dan het begin van darmuitstulping, waarvan eene exogastrula het gevolg is. Vergrooting 150 ×.

zich ook tot het pluteusstadium, doch met niet geheel volledig skelet. Eéne eenheidsgastrula vormde heel weinig skelet en ééne in 't geheel geen, zoodat ik te zamen 5 eenheidsvormen op 79 versmeltingen kreeg. Dit getal is niet groot en ook weer aanmerkelijk kleiner dan dat van DRIESCH, die bij

Sphaerechinus bij zijne eerste proeven niet minder dan 26 eenheidslarven op 125 tweelingen kreeg. Het is begrijpelijk dat DRIESCH door dit resultaat geneigd werd eene tendenz tot eenheidsvorming aan te nemen, te meer daar hij bijna uitsluitend met Sphaerechinus werkte. We moeten wel, wanneer

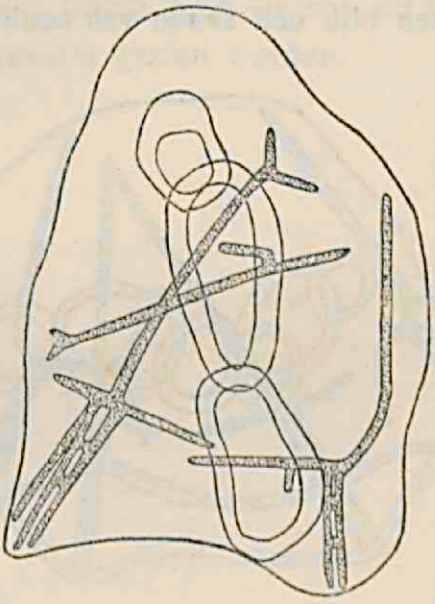


FIG. 29. Sphaerechinus granularis. Eenheidsreuzenpluteus, uit bewerkte blastulae ontstaan. Het skelet is niet volkomen uitgegroeid, daarentegen is er eene overtollige skeletspang. Vergrooting 150 ×.

men niet met BOVERI gelooven wil dat spontane reuzeneieren dit getal vergroot hebben (wat mij niet zeer waarschijnlijk voorkomt) en wanneer al die reuzen werkelijk echte eenheidsvormen waren, aannemen dat een gunstig toeval DRIESCH bij zijne eerste proeven deze uitkomsten gegeven, en daar-

door deze onjuiste gevolgtrekkingen mogelijk maakte. Dit toeval liet hem bij zijne latere proeven in den steek en heeft ook bij mij niet storend gewerkt. Want dat die verschillen in de resultaten aan verschillen in ras tusschen 1900 en 1912 toe te schrijven zijn, is wel niet zeer waarschijnlijk.

Wel heb ik enkele malen vormen gevonden, die op den eersten blik een schijn van eenheid vertoon-

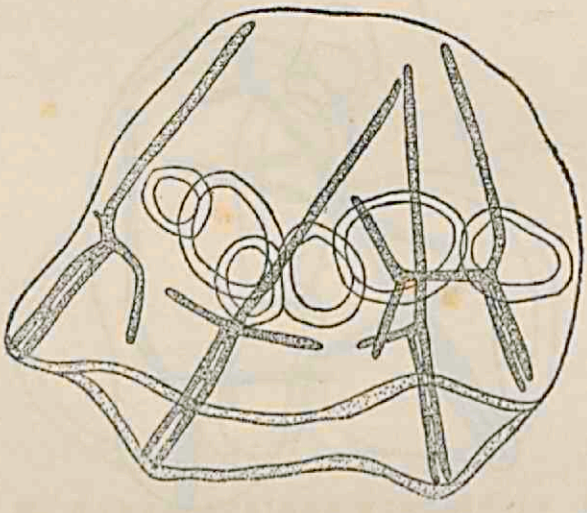


FIG. 30. Sphaerechinus granularis. Tweeling, die op het eerste gezicht een eenheidsvorm lijkt door den evenwijdigen opbouw der skeletten. Darmen vergroeid. Vergrooting 150 ×.

den, daar beide skeletten min of meer parallel opgebouwd waren, waardoor de omtrek in elk geval enkelvoudig werd. Toch ziet men direct aan de twee darmen dat die eenheid in werkelijkheid ontbreekt. Reeds Fig. 25 (blz. 86) toonde zoo iets, beter nog Fig. 30, waar de twee darmen der gastrula in één vlak lagen

en naar elkaar toegroeiden, en tenslotte de voordarmen vergroeid, maar niet versmolten zijn. Indien vormen als deze bij Sphaerechinus misschien meer voorkomen bij anderen, komt het wel daarvan, dat bij de Sphaerechinus-plutei de skeletstukken eene niet zoo karakteristieke uitgroeiing ten gevolge hebben als bij de andere soorten. In elk geval mag ook hierin geen streven tot bereiking van den eenheidsvorm gezien worden.

V. HETEROGENE VERSMELTINGEN.

Zooals in de inleiding gezegd werd, was het hoofddoel van mijne experimenten, zoo mogelijk uit twee kiemen van verschillende soort tweelingen op te bouwen. Het vereenigen van twee zulke ongelijksoortige kiemen gaat echter met zeer veel meer moeilijkheden gepaard, dan het vereenigen van twee kiemen van dezelfde species.

In het begin schudde ik van de eieren van elke soort afzonderlijk de membranen af, en bracht ze daarna in alkalisch kalkvrij zeewater samen. Hieruit kwamen meerdere verklevingen tusschen de beide species, en vooral wanneer ik een van beide gekleurd had, vertoonden deze ophoopingen van gekleurde en ongekleurde eieren een fraaien aanblik. Maar verder dan tot deze verklevingen kwam het niet: na ongeveer 18 uren werden de verschillen tusschen beide blastula-soorten grooter, en begonnen de ongelijke blastulae zich te scheiden, zoodat men weldra eene zekere meerderheid van verklevingen binnen de species opmerkte. Deze scheiding was het gevolg van den verschillenden habitus

der jonge larven, de kleinere meer bewegelijke Paracentrotus-blastulae b.v. raakten door hunne levendigere bewegingen van de groote trage Sphaerechinus-blastulae los. Wel versmolten vaak gelijksoortige blastulae in deze culturen, het grootste gedeelte der bovenbeschreven tweelingen heb ik gewonnen uit proeven, die op heterogene versmeltingen gericht waren.

Ook heb ik het eenige malen met vrij zwemmende blastulae beproefd. Daartoe werden b.v. Sphaerechinus-blastulae (van 22 uur) en Paracentrotus-blastulae (van 19 uur) op de bekende wijze behandeld. Het verschil in leeftijd had tot doel larven van ongeveer gelijke ontwikkelingsstadiën te vereenigen, bij de combinatie Paracentrotus-Parechinus was het niet noodig. De uiterlijke verschillen waren zeer duidelijk: de Sphaerechinus-blastulae waren grooter (9 tot 10 deelstrepen), donker en traag, de anderen kleiner (7 tot 8 deelstrepen), licht gepigmenteerd en zeer beweeglijk. Hoewel bij deze behandeling twee maal moest worden gecentrifugeerd, kwam het ook hier niet verder dan tot heterogene verklevingen, die zich ten slotte weder oplosten.

Na deze negatieve resultaten beproefde ik door kleine verbeteringen in de methode meer te krijgen, maar te vergeefs. Zoo verhoogde b.v. vermenging der eieren voor het afschudden van de membranen wel het aantal heterogene verklevingen, maar gaf geen dergelijke versmeltingen. Ook beproefde ik met eene fijne naald onderling afgeplatte eieren en blastulae

aan de verklevingsplaats te verwonden, maar dit mislukte door de kleinheid der objecten. Ook het overbrengen van reeds verkleefde blastulae in kalkvrij, respectievelijk alkalisch kalkvrij, zeewater zette ze niet in versmeltingen om.

Tenslotte heb ik toch nog enkele resultaten gekregen, door de eieren tot het blastulastadium onder constanten druk samen te persen. Hiertoe werden zij gedurende de klieving in een electrisch centrifugeer-apparaat, zooals er een in Napels ter mijner beschikking stond, [1]) rondgedraaid. Door dezen regelmatigen druk kreeg ik eindelijk versmeltingen, maar zelfs toen nog niet algemeen: tusschen Sphaerechinus en de beide andere genera bleken de verschillen nog te groot. Slechts tusschen Parechinus microtuberculatus en Paracentrotus lividus heb ik zoodoende deze tweelingen gekregen. Na het afschudden der membraan werden de eieren gemengd, en in het alkalisch kalkvrij medium 20 minuten lang met circa 1000 omwentelingen per minuut gecentrifugeerd, dan werd het kunstmatig zeewater door normaal vervangen en de verklevingen met dezelfde snelheid nog eens circa 11 uren lang rondgedraaid, en er eerst uitgenomen

---

1) In Roscoff was er tot mijne teleurstelling eerst geen automatische centrifuge voorhanden, en toen deze door de directie voor mij aangekocht was, kwam zij pas aan, toen de eieren van Parechinus reeds duidelijk eene overrijpheid vertoonden, zoodat zij het centrifugeeren niet meer verdroegen.

nadat in de contrôle-cultuur beiderlei eieren zich tot blastulae ontwikkeld hadden, en zelfs van Parechinus eenige uit de membraan begonnen te komen. De eieren waren aan het eind van het centrifugeerbuisje samengepropt, een gedeelte was niet ontwikkeld en de meeste blastulae, speciaal die zonder bevruchtingsmembraan, waren platgedrukt; ook stond het geheel wat in ontwikkeling achter bij de contrôle-

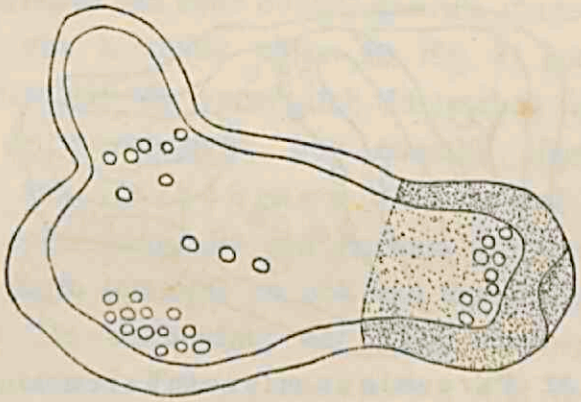


FIG. 31. Parechinus microtuberculatus + Paracentrotus lividus. Door heterogene versmelting ontstane dubbelblastula, duidelijk in eene gepigmenteerde Paracentrotus- en ongepigmenteerde Parechinuszône verdeeld. De Parechinus bestaat uit eene blastula, waarmee eene $^1/_2$-blastula versmolten is. Bij Paracentrotus begint de darminstulping. Vergrooting 150 ×.

cultuur. Toch zwommen spoedig weder eenige blastulae rond en de larven herstelden zich grootendeels tamelijk vlug.

Tusschen meerdere homogene heb ik bij de best gelukte proef tien heterogene versmel-

tingen gekregen, en bij vier andere proeven nog twee. Deze twaalf tweelingen waren allen eenigszins bizar van vorm, vaak diep ingesnoerd, ook waren wel halflingen van Parechinus met Paracentrotus vereenigd. Karakteristiek voor allen was echter het duidelijke onderscheid tusschen beide weefsels: door eene scherpe grens was de kleurlooze Parechinus-helft van de rose gepigmenteerde Paracentrotus-

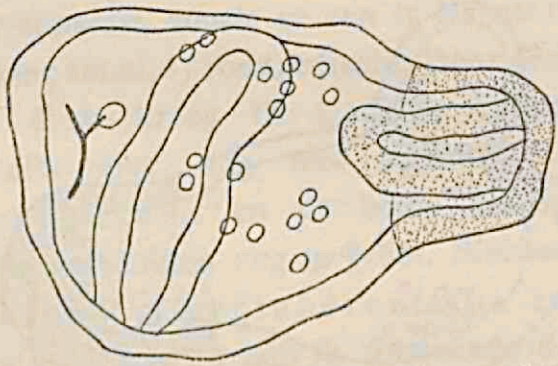


FIG. 32. Parechinus microtuberculatus + Paracentrotus lividus. Dubbelgastrula, uit de blastula van Fig. 31 ontwikkeld. De scherpe afgrenzing bleef bewaard, de Paracentrotus-darm is tot in den anderen sector gegroeid. Vergrooting 150 ×.

helft gescheiden, waardoor de chimaeren-natuur dezer tweelingen, die bij de homogene versmeltingen onzichtbaar blijft, voor den dag komt. Het beste exemplaar heb ik, daar het levendig rondzwom, verdoofd en in Fig. 31 geteekend; zooals de afmetingen toonden was het een $1^1/_2$-ling van Parechinus met een geheelen Paracentrotus vereenigd, die op dit stadum reeds begon zijn darm in te stulpen.

Drie van de tweelingen stierven zonder een darm te vormen, bij één vormde Paracentrotus eene exogastrula, terwijl Parechinus troebel bleef, beiden stierven spoedig. Vier maal stulpten beiden een darm in, waarmee Paracentrotus steeds het eerst begon. Eenige malen werd de darm drieledig en viermaal werd er skelet, hoewel weinig, gevormd. Reeds tamelijk vroeg stond bij allen de ontwikkeling stil. Als voorbeeld van eene dubbel-gastrula moge Fig. 32 dienen, van hetzelfde object als Fig. 31 geteekend. Men ziet dat de vorm zich intusschen afgerond heeft, de aanvankelijk nog tamelijk afgesnoerde halfling van Parechinus werd geheel in den andere opgenomen, die een grooten hier reeds drieledigen darm instulpte en ook een skelet-driestraler vormde. De afscheiding der beide sectoren bleef scherp, hoewel Paracentrotus niet meer zoo donker gepigmenteerd was als te voren. Eene merkwaardigheid is, dat de gepigmenteerde Paracentrotus-darm tot in de Parechinus-zône reikt. Het is moeilijk te zeggen, wat de oorzaak zijn kan van dezen zeker abnormalen groei. Als compensatie kan men het in elk geval niet opvatten, want de andere darm is goed uitgegroeid. Of het bij homogene versmeltingen ook soms voorkomt, is natuurlijk niet te zeggen, daar daar de grens der beide sectoren niet terug te vinden is.

Veel verder heeft zich echter ook deze tweeling niet ontwikkeld. Eenmaal nog kreeg ik eene heterogene verkleving, waarbij beide partners door eene ectoderm-

brug verbonden waren en pluteusachtig werden. In Roscoff vond ik verder eens eene zeer troebele versmelting tusschen Parechinus miliaris en Paracentrotus in eene cultuur, waarbij de eieren gedurende 15 minuten in eene hand-centrifuge gedraaid waren, maar deze bleef slechts kort in leven.

Te vergeefs beproefde ik ook enkele malen heterogene eiversmeltingen tot stand te brengen. Onbevruchte eieren van twee verschillende species werden daartoe gemengd en in alkalisch zeewater gebracht, maar noch eene lage, noch eene hoogere alkaliniteit, zelfs niet het centrifugeeren in deze mediën, gaf een resultaat; steeds cytolyseerden de eieren zonder te versmelten, hoewel ze soms onderling afplatten. Toch houd ik het volstrekt niet voor uitgesloten, dat ook dit, zij het misschien met andere species of aan andere zeekusten, uitgevoerd kan worden. En als het dan gelukt deze heterogene dubbel-eieren tot ontwikkeling te brengen (misschien langs parthenogenetischen weg), dan moet men hier het onderscheid tusschen Philine-type en Ascaris-type terug vinden, en terwijl de op latere stadiën vereenigde kiemen van verschillende species eene sectoriaal-chimaere leveren, mag men hier werkelijke bastaarden verwachten, die echter op andere wijze ontstaan zouden zijn, als de tot nog toe bekenden.

VI. SLOTBESCHOUWINGEN.

Van twee vragen hadden we de bespreking tot dit hoofdstuk uitgesteld. We lieten n.l. voorloopig in het midden waarop de specifieke inwerkingen der twee abnormale factoren berusten, die bij gelijktijdigheid de versmeltingen tot stand brengen (bladz. 36), en stelden ook het antwoord uit op de vraag of we ons de eenheidsreuzen volgens de voorstelling van DRIESCH of volgens die van BOVERI ontstaan moeten denken (bladz. 66). Over beide punten thans nog een enkel woord.

Wat de beide abnormale factoren betreft, de gevolgen van het kalkgebrek zijn tamelijk doorzichtig. In het bijzonder zijn ze dat bij blastulae waar, zooals door HERBST [1900] beschreven werd, het ontbreken van Ca in het zeewater losmakend op den lichaamswand werkt, zoodat de cellen uit hun verband treden en na eenigen tijd de geheele blastula tot een hoop vrij rondzwemmende blastomeren uiteengevallen is. Het begin van deze losmaking van het epitheliaal verband moet natuurlijk eene vereeniging van twee kiemen zeer bevorderen. Van denzelfden aard nu zijn

de gevolgen der kalkloosheid bij ongedeelde eieren. In beide gevallen toch zijn het veranderingen in de verbindingsmembraan, de exoplasmatische laag, die volgens de onderzoekingen van HERBST [1893] en HAMMAR [1896] niet alleen de eieren maar ook de latere klievingsstadiën der Echiniden omgeeft. Deze verbindingsmembraan wordt door kalkgebrek meer of minder vernietigd, bij langere inwerking komen zoodoende de cellen vrij en scheiden zich van elkaar, echter ook reeds bij kortere inwerking, als in mijne proeven, werd deze membraan aangetast, zooals men bijzonder duidelijk bij de breede verbindingsmembraan van Sphaerechinus waarnemen kon. Wordt nu gelijktijdig met de verzwakking van deze membraan een tweede ei tegen het eerste gedrukt, dan vloeien de exoplasmatische lagen samen, en vormen, in normaal zeewater teruggebracht, een nieuwen band die de twee individuen vaster samensnoert. Fig. 33 vertoont deze verbinding bij Sphaerechinus: men ziet hoe het ei-plasma van twee zijden elkaar nadert, hetgeen bewijst dat een zekere druk door de samenhoudende membraan uitgeoefend wordt. Het zal nu van de omstandigheden afhangen, of deze band sterk genoeg is om de twee eieren als twee blastomeren samen te houden, maar het is duidelijk dat samendrukking tijdens de klieving, zij het dat de verkleefde eieren zich te midden van een hoop anderen deelen, zij het dat van buiten af een druk op hen uitgeoefend wordt, deze vereeniging bevorderen moet. Dit inzicht heeft mij bij de heterogene

versmeltingen eindelijk ook aan resultaat geholpen.

Hierbij komt nog iets anders. De verbindingsmembraan bestaat ook bij onbevruchte eieren, is daar echter minder hard en kan door de spermatozoa gemakkelijk doorboord worden. Na de be-

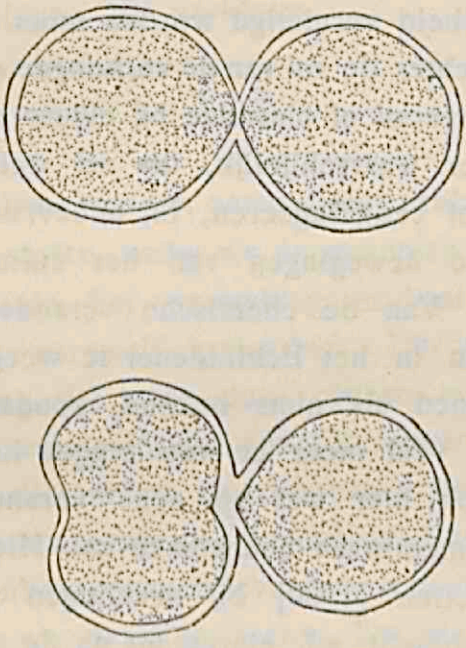


FIG. 33. Sphaerechinus granularis. Verkleefde eieren, zonder bevruchtingsmembraan, maar met breede verbindingsmembraan. Deze is om de eieren samengevloeid, het plasma der eieren is in een punt uitgetrokken. In *b* is één ei in deeling. In geen van beide gevallen kwam er versmelting. Vergrooting 150 ×.

vruchting verandert hare constitutie en ze wordt taaier, zoodat ook na het afschudden van de bevruchtingsmembraan aan het indringen van andere spermatozoa nog een zekere weerstand in den weg

staat. Nu werden onbevruchte eieren tot versmelting gebracht door ze in alkalisch zeewater te laten liggen, bij bevruchte eieren moest gelijktijdig daarbij kalkloosheid inwerken, zoo is het dan wel waarschijnlijk dat het de na de bevruchting ontstane hardheid van die exoplasmatische laag is, die door de kalkloosheid vernietigd worden moet.

Wat is echter de rol van de verhoogde alkaliniteit? Dat zij de eieren of blastulae bij elkaar zou brengen is niet zeer waarschijnlijk, dit zal wel door het schudden of centrifugeeren, bij onbevruchte eieren door kleine bewegingen van het cultuurschaaltje geschieden. Van de chemische veranderingen die het OH-ion in het Echinidenei te weeg brengt is nog zoo goed als niets bekend, zoodat we voorloopig niet veel meer er van zeggen kunnen, dan dat het ook hier wel op eene verandering der verbindingsmembraan neerkomen zal. Hiervoor pleit ook wat LOEB [1909] bij tweelingen uit één ei vond. Hij bracht n.l. eieren tot na de eerste kliéving in een medium, waarin één of meer der drie metaal-ionen Na, K en Ca ontbrak. Dit had het gevolg, dat de verbindingsmembraan opgelost werd, hierdoor kregen de blastomeren gelegenheid uiteen te wijken, en werd een groot procent tweelingen gevormd. Deze tweelingvorming kon hij echter onderdrukken, indien hij het medium door toevoeging van een spoor $NaHCO_3$ of NaOH zwak alkalisch maakte. Waarschijnlijk werd dus daardoor de verbindingsmembraan voor de gevolgen van het ont-

breken der genoemde ionen beschermd. Eene dergelijke bescherming, eventueel herstelling van de verbindingsmembraan zou in ons geval ook mogelijk het gevolg van het OH-ion zijn, maar ik wil er direct bijvoegen dat dit alles zeer hypothetisch is, en ook de noodzakelijk gebleken gelijktijdigheid van beide werkingen niet verklaart.

* * *

Het probleem van het ontstaan der eenheidsvormen lieten we rusten, nadat we aangenomen hadden dat in 't algemeen het versmeltingsresultaat een gevolg is van de versmeltingsrichting. De mogelijkheid bestond nog dat voor deze reuzen toch nog een zeer vroeg versmeltingsoogenblik aansprakelijk was, doch ook dit moeten we verwerpen nadat bij Paracentrotus aangetoond werd dat laat vereenigde kiemen eenheidsvormen leverden, terwijl vroeg versmoltenen uit dezelfde eieren het niet deden (zie bl. 72). De voorstelling van DRIESCH wordt daardoor onverdedigbaar. Nu zegt DRIESCH wel [1901, bl. 431], dat hij niet zeggen wil dat alle vroeg versmoltenen eenheidsvormen moeten geven, daar er nog factoren bij kunnen komen die wij niet overzien; de dadelijk daaropvolgende bewering echter dat „nur sie (die Frühverschmolzenen) solche Bildungen liefern können", is toch in elk geval te verwerpen. In zijne tweede publicatie [1910, blz. 22] drukt DRIESCH zich wel wat minder stellig uit, maar de redenen die hij

er voor aangeeft dat „Gleichsinnigkeit der Achsen der Verschmelzungsobjecte doch wohl nicht als notwendige Voraussetzung der Gross-Einheitsbildungen anzusehen ist," zijn mijns inziens niet overtuigend, daar het bleek, dat we in de defectlarven geen overgang tot eenheidsvormen behoeven te zien.

Zoo kunnen we ons dan nu geheel aansluiten bij de voorstelling van BOVERI, waar hij [1901, blz. 165] schrijft: „Ob aus gemeinsamer Entwicklung zweier Eier eine Einheits- oder eine Doppelbildung resultiert, hängt meines Erachtens ausschliesslich davon ab, wie die beiden Eiachsen bei der Verklebung zueinander gestellt waren. Stehen sie annähernd parallel, sodass die zwei Eier wie zwei primäre Blastomeren zueinander orientiert sind, so entsteht die Einheitslarve, stehen sie in Winkel, die Doppelbildung."

Direct bewezen is dit nog niet, maar het zal ook nooit direct te bewijzen zijn. Want dat uit twee toevallig van den aanvang af met gelijke asrichting versmolten kiemen (wat van tijd tot tijd ook voorkomen moet) eene eenheidslarve zich ontwikkelen zal, geeft DRIESCH zelf toe, slechts de door hem daarbij nog onderstelde verschuiving der assen moeten we in twijfel trekken. En hiervoor vinden we drie bewijzen, ten eerste in het feit dat van zoo'n asverschuiving niets waar te nemen valt, ten tweede in de gebleken onbelangrijkheid van het oogenblik van kiem-vereeniging, en ten derde in het feit dat zijne

„overgangen" tusschen gewone en eenheids-tweelingen in het geheel geene overgangen waren.

Toch moeten bij BOVERI's uitspraak nog twee restricties gemaakt worden. In de eerste plaats is het mogelijk, dat bij vereeniging met twee parallele en gelijk gerichte pigmentringen toch geen eenheidpluteus ontstaat, n.l. wanneer daarbij de eieren achter elkaar geplaatst zijn. Zooals we zagen, ontwikkelt zich hieruit eene haplo-exogastrula. De beide partners moeten naast elkaar liggen, trouwens ook dan slechts heeft men het geval, dat de twee eieren werkelijk „als Blastomeren zu einander orientiert" zijn.

Eene tweede beperking staat in verband met de bilateraliteit van het ei. Tot nog toe hebben we slechts met eene animaal-vegetatieve polariteit rekening gehouden, en van eene tweede loodrecht daarop staande as in de Echininenkiem geheel afgezien. Toch bewezen b.v. DRIESCH' onderzoekingen [1906] dat reeds zeer vroeg eene bilateraliteit bij de zich klievende kiem merkbaar is, die door DRIESCH op de structuur van het ei teruggebracht wordt.

Wanneer nu echter de Echinidenkiemen behalve de polariteit ook nog eene bilaterale symmetrie hebben, moeten we aannemen, dat zelfs dan wanneer twee eieren of blastulae met gelijk gerichte assen naast elkaar vergroeien, men van eene eenheidsvorming niet zeker is. Daarbij is dan nog noodig, dat de twee partners zoo vereenigd zijn dat ze zich ook ten opzichte van het nieuwe symmetrievlak als twee

„blastomeren" gedragen. Wanneer dit niet of niet voldoende het geval is, blijft toch nog het dubbele karakter bewaard, en moet men vormen krijgen die twee parallele darmen instulpen (want de beide vegatieve polen zijn naar denzelfden kant gericht). Deze darmen zullen bij hunne buiging hunne evenwijdigheid meer of minder verliezen, en de skeletten zullen in

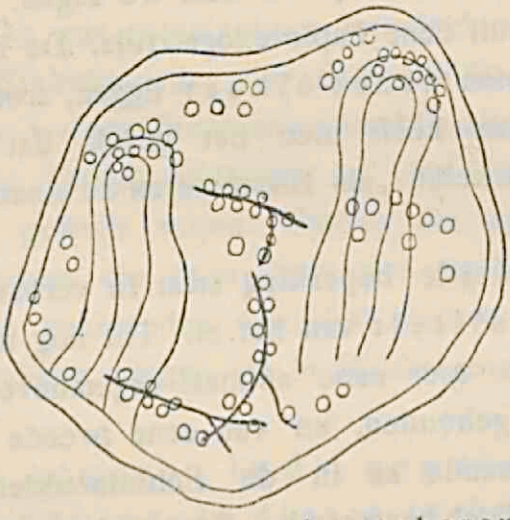


FIG. 34. Parechinus microtuberculatus. Tweeling met twee parellele darmen, waaruit toch geen eenheidsvorm ontstond. Drie skelet-driestralen worden door de mesenchymcellen gevormd. Vergrooting 150 ×.

grootere of geringere mate in dezelfde richting opgebouwd worden.

Werkelijk nu heb ik enkele vormen gevonden die aan deze verwachting beantwoordden, b.v. de in Fig. 34 afgebeelde Parechinus-tweelingsgastrula. Hier werden twee darmen aan dezelfde zijde ingestulpt en liepen eerst geheel evenwijdig. Later ging

bij de buiging der darmen de evenwijdigheid reeds eenigszins verloren, zooals men in Fig. 34 ziet, duidelijker toont dit nog het op Fig. 35 afgebeelde pluteusstadium van hetzelfde object. Dat daarbij de skeletten ook eene zekere evenwijdigheid vertoonen, komt geheel met de verwachting overeen.

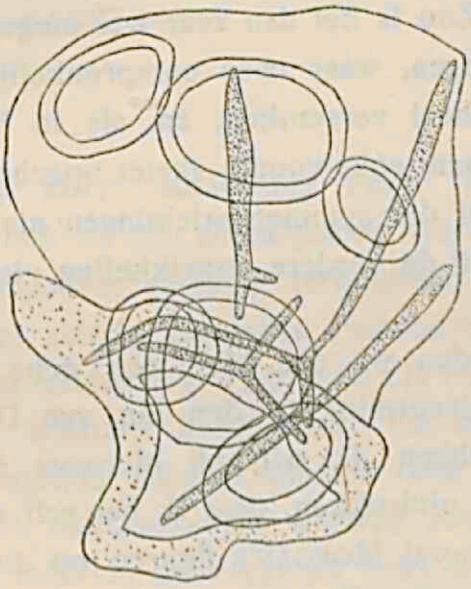


Fig. 35. Parechinus microtuberculatus. Pluteus, die zich uit de gastrula van Fig. 34 ontwikkelde. Door de kromming bleven de darmen wel in eén vlak, maar niet evenwijdig. Skelet betrekkelijk weinig ontwikkeld. Vergrooting 150 ×.

Onwillekeurig denkt men hier weder aan de door Driesch beschreven dubbel-gastrula, waarbij twee geheel parallele darmen secundair over hunne geheele lengte versmolten (zie blz. 55). De assen waren blijkbaar gelijk gericht, de symmetrievlakken waarschijnlijk niet geheel parallel. Nu schijnt de bilate-

raliteit in het Echinidenei niet zoo scherp uitgedrukt te zijn als de polariteit, experimenteel kan men radiair-symmetrische larven verkrijgen, zooals b.v. HERBST [1893] in zijne lithiumculturen. Ook werd in DRIESCH' bovenvermelde proeven met splitsingstweelingen het symmetrievlak van een der beide partners vaak ten opzichte van het oorspronkelijke gedraaid. Zoo is het dan zeer wel mogelijk, dat bij die tweelingen, waar twee oorspronkelijk parallele darmen geheel versmolten, en, als in 't geval van MORGAN, een enkelvoudig skelet opgebouwd werd, het verschil der symmetrierichtingen niet al te groot was, en bij de verdere ontwikkeling uitgewischt is geworden.

Zoo zouden we dan hier toch eene „regulatie" tot eenheidsvorming in den zin van DRIESCH gevonden hebben. Ik wil mij hierover echter zeer voorzichtig uitdrukken, daar ik het zelf nooit gezien heb, en vooral MORGAN'S figuren op dit punt zeer onduidelijk zijn. En dan blijft nog als boven de vraag bestaan of hier werkelijk een verstoorde toestand hersteld wordt, dan wel of het slechts bewijst dat die tweede polariteit in het ei der Echiniden eene weinig starre is.

De polariteit van het ei vinden we in zijn stoffelijken bouw, en in de structuur van zijne kleinste deeltjes uitgedrukt. Of we ons de bilateraliteit van het ei als eene uiting van eene intiemstructuur, dan wel als een stoffelijk verschil moeten denken, is niet zonder meer uit te maken. In elk geval is

de hypothese van DRIESCH volkomen voldoende om het hier beschrevene te verklaren, en we hebben voorloopig geene aanduiding, die de onderstelling van een „rechts-stof" en een „links-stof" (misschien beter een „voor-stof" en „achter-stof", want het symmetrievlak deelt bij de Echiniden het ei in het geen later voor- en achterhelft wordt) bij het Echinidenei noodzakelijk maken zou.

* * *

Nog eene korte opmerking moge hier plaats vinden. Ik heb in het voorafgaande vaak eene van DRIESCH afwijkende meening verkondigd, in zoover dat m.i. niet steeds regulaties bestonden waar hij ze meende te ontdekken. Toch blijft zijn voornaamste theoretische uitkomst onaangetast: het is mogelijk dat onder speciale omstandigheden twee oorspronkelijk geheel onafhankelijke kiemen zich tot één enkelvoudig individu ontwikkelen, zelfs wanneer die kiemen pas als vrij zwemmende blastulae vereenigd werden, een geheel deugt dus ook tot vorming van een half organisme, of, om DRIESCH zelf te citeeren: de prospectieve potentie dier kiemen is grooter dan hunne prospectieve beteekenis.

VII. SAMENVATTING DER RESULTATEN.

I. Bij larven die uit versmolten eieren ontstaan zijn, zij het dat de eiplasmata vóór of na de bevruchting samenvloeiden, blijft — ten minste tot het gastrula-stadium — het volumen evenredig aan de kiemwaarde. Bij op latere stadiën versmolten larven is daarentegen het oppervlak van de geheele larve en der enkele organen aan hunne kiemwaarde evenredig. Hieruit volgt dat beide zich volgens verschillend principe ontwikkelen: in het eerste geval wordt de larve uit het normale aantal dubbel groote cellen, in het tweede geval uit een dubbel aantal normaal groote cellen opgebouwd.

II. Om vrij zwemmende blastulae tot versmelting te brengen, is eene gelijktijdige inwerking van kalkloosheid en verhoogde alkaliniteit noodig. Voor bevruchte eieren is deze gelijktijdige inwerking van beide factoren ook noodig, indien men een eenigszins beteekenend aantal versmeltingen verkrijgen wil. Voor de versmelting van onbevruchte eieren is een verhooging van de alkaliniteit van het zeewater voldoende.

III. De door versmelting ontstane tweelingen vertoonen vaak defecten, vooral in hun skelet. Er is geen reden hierin een streven naar eenheidsvorming te willen zien.

IV. Er is één geval waarbij een duidelijke samenhang tusschen versmeltingsrichting en versmeltingsresultaat aan te toonen is: aan de vegetatieve pool versmoltene blastulae vormen steeds exogastrulae, respectievelijk exopluteï. Men mag aannemen dat het in de andere gevallen slechts de onduidelijkheid der asrichting en het weinig karakteristieke van het resultaat is, die dezen samenhang voor ons onzichtbaar maken. Het versmeltingsresultaat wordt in elk geval niet door het versmeltings-moment beheerscht.

V. Tusschen Parechinus microtuberculatus en Paracentrotus lividus kan men heterogene versmeltingen krijgen, wanneer men de behandelde eieren tot het blastula-stadium te samen aan sterken druk bloot stelt. Deze tweelingen zijn scherp in twee sectoren gescheiden, toch kan soms een darm in den anderen sector binnengroeien.

VI. Eenheidsvormen ontstaan slechts dan, wanneer twee kiemen van den aanvang af geheel als twee blastomeren vereenigd zijn, dat wil zeggen, wanneer ze van den aanvang af naast elkander liggen met gelijk gerichte assen en symmetrievlakken.

LITERATUUR.

[1900] BATAILLON, E. Blastotomie spontanée et larves jumelles chez Petromyzon Planeri.
C. R. Acad. des Sc. de Paris CXXX 1900.

[1897] BORN, G. Ueber Verwachsungsversuche mit Amphibienlarven.
Arch. für Entw. Mech. der Org. IV 1897.

[1901] BOVERI, TH. Ueber die Polarität des Seeigeleies.
Verh. der Phys. Med. Ges. Würzburg
Neue Folge, Bd XXXIV 1901.

[1904] —— Ergebnisse über die Konstitution der chromatischen Substanz des Zellkerns. Jena 1904.

[1905] —— Zellenstudien V. Ueber die Abhängigkeit der Kerngrösse und Zellenzahl der Seeigel-larven von die Chromosomenzahl der Ausgangszellen.
Jena 1905.

[1908] —— Zellenstudien VI. Die Entwickelung dispermer Seeigeleier.
Jen. Zeitschr. für Naturw. XLIII 1908.

[1851] BUSCH, W. Beobachtungen über Anatomie und Entwickelung einiger wirbellosen Seethiere. Berlin 1851.

[1886] CARNOY, J. B. La vésicule germinative et les globules polaires de l'Ascaris megalocephala.
La Cellule II 1886.

1892] DRIESCH, H. Entwicklungsmechanische Studien I—II.
Zeitschr. für wiss. Zool. LIII 1892.

[1893] Driesch, H. Entwicklungsmechanische Studien III—IV. Zeitschr. für wiss. Zool. LV 1893.

[1895] —— Entwicklungsmechanische Studien IX. Mitth. Zool. Station Neapel XI 1895.

[1897] —— Betrachtungen über die Organisation des Eies und ihre Genese. Arch. für Entw. Mech. der Org. IV 1897.

[1897a] —— Ueber einige primäre und secundäre Regulationen in der Entwickelung der Echinodermen. Arch. für Entw. Mech. der Org. IV 1897.

[1900] —— Studien über das Regulationsvermögen der Organismen. IV. Die Verschmelzung der Individualität bei Echinidenkeime. Arch. für Entw. Mech. der Org. X 1900.

[1900a] —— Die isolirten Blastomeren des Echinidenkeimes. Arch. für Entw. Mech. der Org. X 1900.

[1901] —— Die Organischen Regulationen. Vorbereitungen zu einer Theorie des Lebens. Leipzig 1901.

[1902] —— Neue Antworte und neue Fragen. Ergebn. der Anat. und Entw. XI 1902.

[1904] —— Drei Aphorismen zur Entwickelungsphysiologie jüngster Stadien. Arch. für Entw. Mech. der Org. XVII 1904.

[1903] —— Studien zur Entwickelungsphysiologie der Bilateralität. Arch. für Entw. Mech. der Org. XXI 1906.

[1910] —— Neue Versuche über die Entwicklung verschmolzener Echinidenkeime. Arch. für Entw. Mech. der Org. XXX 1910.

[1909] Fernandez, Miguel. Beiträge zur Embryologie der Gürtelthiere. I. Zur Keimblätterinversion und spezifischen Polyembryonie der Mulita (Tatusia hybrida Desm.) Morph. Jahrbuch XXXIX 1909.

[1905] Föhner, H. Pharmakologische Studien an Seeigeleiern. Arch. für Exper. Path. und Pharmak. LII 1905.

[1905] Garbowski, Th. Ueber die Entwickelung von Seeigellarven ohne Entoderm.
Bull. Ac. des Sciences de Cracovie 1905.

[1901] Guiart, J. Contribution à l'Etude des Gastéropodes Opisthobranches et en particulier des Céphalaspides.
Mem. Soc. Zool. de France XIV 1901.

[1869] Haeckel, E. Zur Entwickelungsgeschichte der Siphonophoren.
Utrecht 1869.

[1896] Hammar, J. A. Ueber einen primären Zusammenhang zwischen den Furchungszellen des Seeigeleies.
Arch. für micr. Anat. und Entw. XLVII 1896.

[1893] Herbst, C. Ueber die künstliche Hervorrufung von Dottermembranen an unbefruchteten Seeigeleiern nebst einigen Bemerkungen über die Dotterhautbildung überhaupt.
Biol. Centralblatt XIII 1893.

[1893a] —— Experimentelle Untersuchungen über den Einfluss der veränderten chemischen Zusammensetzung des umgebenden Mediums auf die Entwickelung der Thiere. I. Versuche an Seeigeleiern.
Zeitschr. für wiss. Zool. LV 1893.

[1900] —— Ueber das Auseinandergehen von Furchungs- und Gewebezellen im kalkfreiem Medium.
Arch. für Entw. Mech. der Org. IX 1900.

[1893] Hertwig, O. Ueber den Werth der ersten Furchungszellen für die Organbildung des Embryo.
Arch. für micr. Anat. und Entw. XLII 1893.

[1904] Janssens, F. A. Production artificielle de larves géantes et monstrueuses dans l'Arbacia.
La Cellule XXI 1904.

[1886] von Jhering, H. Ueber „Generationswechsel" bei Säugethiere.
Arch. für Anat. und Physiol., Physiol. Abt. 1886.

[1879] Kleinenberg, N. The development of the Earth-worm Lumbricus trapezoides Dugès.
Quart. Journ. Micr. Sc. XIX 1879.

[1876] Kölliker, A. Entwickelungsgeschichte des Menschen und der höheren Thiere. Leipzig 1876.

[1895] Korschelt, E. Ueber Kerntheilung, Eireifung und Befruchtung bei Ophryotrocha puerilis. Zeitschr. für wiss. Zool. LX 1895.

[1910] Korschelt, E. und Heider, K. Lehrbuch der vergleichende Entwickelungsgeschichte der wirbellosen Thiere. Allg. Theil. IV, 2. Jena 1910.

[1875] de Lacaze—Duthiers, H. Sur la formation des monstres doubles chez les Gastéropodes. Arch. de Zool. Exp. et Gen. IV 1875.

[1902] Lillie, Fr. R. Differentiation without cleavage in the egg of the Annelid Chaetopterus pergamentaceus. Arch. für Entw. Mech. der Org. XIV 1902.

[1910] Loeb, J. Experiments on artificial parthenogenesis in Annelids (Chaetopterus) and the nature of the process of fertilization. Amer. Journ. of Phys. IV. 1901.

[1909] —— Ueber die chemischen Bedingungen für die Entstehung eineiiger Zwillinge beim Seeigel. Arch. für Entw. Mech. der Org. XXVII 1909.

[1904] Marchal, P. Recherches sur la Biologie et le Developpement des Hyménoptères Parasites. I. La Polyembryonie spécifique ou Germinogonie. Arch. Zool. Exp. et Gen. S. IV, T. II 1904.

[1886] Metschnikoff, E. Embryologische Studien an Medusen. Wien 1886.

[1879] Milne Edwards, A. Recherches sur les Enveloppes foetales du Tatou à neuf bandes (Dasypus novemcinctus. Ann. de Sc. Nat. S. VI, T. VIII 1879.

[1896] Morgan, T. H. The formation of one Embryo from two Blastulae. Arch. für Entw. Mech. der Org. II. 1896.

[1896a] —— Experimental Studies of the Blastula- and Gastrula-stages of Echinus. Arch. für Entw. Mech. der Org. II 1896.

[1903] Mortensen, Th. The Danish Ingolf Expedition. IV. 1. Echinoidea. Kopenhagen 1903.

[1888] Roux, W. Ueber die Künstliche Hervorbringung halber Embryonen durch Zerstörung einer der beiden ersten Furchungskugeln, so wie über die Nachentwickelung (Postgeneration) der fehlenden Körperhälfte.
Arch. für path. Anat. und Phys. CXIV 1888.

[1895] Sala, L. Experimentelle Untersuchungen über die Reifung und Befruchtung der Eier bei Ascaris megalocephala.
Arch. für micr. Anat. und Entw. XLIV 1895.

[1910] Tennent, D. H. Variation in Echinoid Plutei. A study of variation under laboratory conditions.
Journ. Exp. Zool. IX 1910.
Overgedrukt in: Bryn Mawr College Monographs Reprint Series IX.

[1910] Tur, J. Sur les pontes anormales chez Philine aperta.
Arch. für Entw. Mech. der Org. XXX 1910.

[1896] Zur Strassen, O. Riesenembryonen bei Ascaris.
Biol. Centralblatt XVI 1896.

[1898] —— Ueber die Riesenbildung bei Ascaris-Eiern.
Arch. für Entw. Mech. der Org. VII 1898.

STELLINGEN.

I.

Uit vereenigde kiemen ontstaan bij Echiniden slechts dan eenheidsvormen, wanneer die kiemen van den aanvang af met gelijk gerichte assen en samenvallende symmetrievlakken vereenigd waren.

II.

Reuzenlarven, die uit versmolten eieren ontstaan zijn, ontwikkelen zich volgens ander principe dan die, welke ontstaan zijn uit vereenigingen van latere klievingsstadiën.

III.

De polariteit van het Echiniden-ei vindt haren grond zoowel in den stoffelijken bouw van dat ei, als in de structuur der kleinste ei-deeltjes.

IV.

Acanthocephalen zijn gereduceerde Gephyreën.

V.

De tegenwoordige Fauna van St. Helena bewijst, dat dit eiland vroeger door eene landbrug met Afrika en Zuid-Amerika verbonden was.

VI.

STEINMANN's theorie, volgens welke de Cetacea direct van mesozoische zeereptielen zouden afstammen, is ook reeds op palaeontologische gronden te verwerpen.

VII.

Periklinaalchimaeren zijn geen bastaarden.

VIII.

HABERLANDT's voorstelling, volgens welke de loofbladen lichtzintuigen zouden bezitten, is te verwerpen.

IX.

Tegen DE CANDOLLE's verklaring der phototropische krommingen zijn nog geene exacte bewijzen aangebracht.

X.

De systematische indeeling der regulaire Echiniden geschiede volgens den vorm der pedicellarien.

XI.

De schubben der Teleostei zijn niet homoloog met de basaalplaten der placoidschubben.

XII.

Kiembladen zijn analoog, niet homoloog.

XIII.

Het is wenschelijk, dat hier te lande spoedig worde overgegaan tot de oprichting van een biologisch proefstation voor experimenteel zoölogisch en botanisch onderzoek, desnoods onafhankelijk van de Universiteit.

Bijvoegsel tot de *Nederlandsche Staatscourant* van Woensdag 18 December 1912, n°. 296.

N°. 90.

VERSLAG van de werkzaamheden, door den heer J. A. Bierens de Haan, phil. docts., aan de werktafel der Nederlandsche Regeering in het Zoölogisch Station te Napels verricht gedurende de maanden Januari tot Mei 1912.

Eenige malen zijn in de natuur gevallen waargenomen, waarbij uit een zeker aantal rijpe eieren niet een evengroot aantal volwassen individuen zich ontwikkelden, doch door onderlinge vereeniging, zij het van eenige dier eieren, zij het van eenige der zich daaruit ontwikkelende klievingsstadien, een kleiner aantal larven opgebouwd werd, dan er oorspronkelijk rijpe eieren aanwezig geweest waren. Van die eierversmeltingen mogen de voornamelijk door Sala en Zur Strassen beschreven tweelingen en reuzen bij den paardenspoelworm Ascaris megalocephala genoemd worden; als voorbeeld van de vereenigingen op latere klievingsstadien kunnen de voor het eerst door de Lacaze-Duthiers beschreven dubbelmonstra van den Gastropode Philine aperta gelden.

Het valt niet te verwonderen, dat men bij den opbloei der experimenteele embryologie in de laatste decenniën de belangrijkheid van deze vergroeiingen voor theoretische beschouwingen is gaan inzien en getracht heeft dergelijke versmeltingen ook bij de klassieke proefobjecten dier wetenschap, het kikvorschen het zeeappel-ei, tot stand te brengen. Bij het eerste is dit nog nooit gelukt, bij de Echiniden echter is men er in geslaagd twee zich klievende kiemen tot één tweeling te vereenigen, en het is de verdienste van Driesch geweest eene methode ontdekt te hebben, waardoor men, wel geen groot, maar toch een vrij zeker aantal van dergelijke versmeltingen verkrijgen kan.

Driesch had met twee in Napels voorkomende zeeappelsoorten

Sphaerechinus granularis en Parechinus microtuberculatus gewerkt, en steeds beproefd tweelingen uit twee eieren van dezelfde soort samen te stellen. Hij had verschillende zulke tweelingen gekregen, die tot het pluteus-stadium opgroeiden, en hiervan was in het bijzonder eene categorie van gewicht: van tijd tot tijd n.l. kreeg hij reuzenplutei, die in hun geheelen bouw er als normale uitzagen, doch in hunne grootere afmetingen hunne bijzondere wijze van ontstaan uitdrukten, terwijl bij de overigen het tweelingskarakter door een dubbelen aanleg der organen (darm en skelet) aan den dag trad. Nu was het al lang door de zgn. heteroplastische transplantaties bewezen, dat het mogelijk is één individu op te bouwen uit twee stukken, die aan individuen van verschillende soorten ontnomen waren; de vraag lag dus voor de hand, of het mogelijk zijn zou ook twee geheele larven van verschillende species te vereenigen en op die wijze de resultaten van Driesch uit te breiden.

Het hoofddoel, dat ik mij voor mijn verblijf aan de Stazione Zoologica te Napels gesteld had, was dan ook te trachten deze ongelijksoortige versmeltingen te verkrijgen.

Het heeft echter zeer lang geduurd voor ik daar in slaagde, daar de gewone methode waarmee men versmeltingen binnen de soort verkrijgt, n.l. de behandeling met alkalisch kalkvrij zeewater, hier zonder succes bleek: eieren en latere stadien der verschillende soorten verkleefden onderling wel, maar lieten steeds later bij het krachtiger rondzwemmen weer los. Pas kort voor mijn vertrek heb ik, na vele mislukte pogingen, hiervoor de juiste methode gevonden: de sterke druk die op de verkleefde eieren uitgeoefend wordt, wanneer ze tot de bereiking van het blastulastadium (dus gedurende ± 11 uren) zonder ophouden in een centrifuge rondgedraaid worden, bewerkt dat beiderlei klievingscellen te zamen één blastula vormen, waarvan de tot de beide soorten behoorende deelen scherp van elkander gescheiden blijven. Door een gering verschil in de kleuring der twee gebruikte soorten (Paracentrotus lividus en Parechinus microtuberculatus) waren de beide zônes duidelijk te herkennen. In elke helft werd één darm ingestulpt; tot pluteus-larven heb ik echter het kleine aantal, dat ik van die versmeltingen kreeg, niet kunnen opkweeken.

Intusschen heb ik mij ook met de bovengenoemde versmeltingen binnen de species bezig gehouden, voornamelijk om de condities te onderzoeken, waarop de bovenvermelde normaal opgebouwde reuzenlarven (eenheidsreuzen) ontstonden. Driesch zelf meende dat dit geschiedde wanneer twee kiemen zeer vroeg versmolten waren en dus tijd gehad hadden hunne deeltjes onderling gelijk te richten. Boveri daarentegen nam aan, dat

zulke eenheidsreuzen slechts dan ontstonden, als twee kiemen zich van den aanvang af met gelijk gerichte assen vereenigd hadden. Ik heb nu kunnen aantoonen dat Driesch hierin ongelijk had. Dit had ik daaraan te danken, dat ik niet (als Driesch) uitsluitend met klievende eieren werkte, maar ook trachtte uit vrij rondzwemmende blastulae tweelingen te maken. Zoo nam ik eenmaal zulke blastulae uit een cultuur, waarvan ik uit de bewerkte eieren al enkele tweelingen had kunnen isoleeren, en kreeg toen uit die blastulae na behandeling de bedoelde eenheidsreuzen. Daarmee was bewezen dat eene vroege versmelting zonder invloed is op het ontstaan dier eenheidsreuzen, immers deze waren hier in elk geval later versmolten dan de tweelingen, die ik al te voren geisoleerd had en waarvan geen enkel tot eenheidslarve werd.

Doordat ik verder (in tegenstelling tot Driesch) ook met Paracentrotus lividus werkte, waarvan de eieren en blastulalarven vaak door een gepigmenteerden ring hunne asrichting duidelijk markeeren, kon ik waarnemen dat één speciaal gerichte vergroeiing, nl. die waarbij een der beide kiemen met zijne vegetatieve pool aan den ander vergroeid was, steeds hetzelfde effect had (steeds ontstond nl. een zgn. exogastrula, d. w. z. een gastrula-larve die den darm niet instulpt doch uitstulpt). Ook deze afhankelijkheid van versmeltingsresultaat en versmeltingsrichting sprak tegen Driesch' opvatting, en daar ik geloof, dat de door hem als overgangen tot eenheidsvorming geduide gevallen beter te interpreteeren zijn als tweelingen die gedeeltelijk pathologisch waren, vervalt daarmede het laatste argument voor Driesch' hypothese en meen ik mij geheel bij de voorstelling van Boveri te kunnen aansluiten.

Verder slaagde ik er in ook ongedeelde eieren tot versmelting en gedeeltelijk tot ontwikkeling te brengen (dus als bij Ascaris in de natuur is waargenomen). Het bleek dat de hieruit ontstane larven op andere wijze opgebouwd waren dan de tweelingen die op latere ontwikkelingsstadien versmolten waren: in het laatste geval zijn de larven waarschijnlijk opgebouwd uit het dubbele aantal normaal-groote cellen, in het eerste uit het normale getal dubbelgroote cellen. Hoewel dit onderscheid te verklaren is door de wet van Hertwig over de vaste verhouding tusschen kerngrootte en celgrootte, blijft toch een principieel verschil tusschen beide wijzen van ontwikkeling bestaan, en is het feit dat bij hetzelfde object deze twee wijzen van opbouw voorkomen een onverwachte bevestiging van die wet en tevens niet zonder belang voor de vraag of reuzen- en dwergvormen uit cellen van gelijke of ongelijke grootte opgebouwd zijn.

Ten slotte trachtte ik eenige nasporingen te doen over de condities waaronder de versmeltingen zelve tot stand komen, en vond dat daartoe kalkloosheid van het omgevende medium en verhoogde alkaliniteit gelijktijdig noodig waren. Over wat de werking van deze beide abnormale factoren is, kunnen voorloopig slechts vermoedens worden geuit.

Meer uitgebreid zullen deze resultaten besproken worden in eene publicatie, die binnen korten tijd in Roux' „Archiv für Entwickelungsmechanik der Organismen" verschijnen zal.

Ik wil dit verslag niet eindigen zonder mijn oprechten dank uit te spreken aan Zijne Excellentie den Minister van Binnenlandsche Zaken, door wiens bemiddeling ik in staat gesteld werd aan de Nederlandsche werktafel aan het Zoölogisch Station te Napels mijne experimenten uit te voeren.

Bijvoegsel tot de *Nederlandsche Staatscourant* van Vrijdag 18 Juli 1913, n°. 166.

N°. 44.

VERSLAG der werkzaamheden, door dr. J. A. Bierens de Haan aan de werktafel der Nederlandsche Regeering in het Zoölogisch Station te Napels verricht gedurende de maanden April en Mei 1913.

Tot arbeidstaak voor mijn verblijf aan het Zoölogisch Station te Napels had ik mij ditmaal gesteld, te trachten twee leemten aan te vullen in mijne onderzoekingen van het vorige jaar, en wel in de eerste plaats de verdere ontwikkeling der heterogene versmeltingen van Zeeappel-kiemen na te gaan, en in de tweede plaats te trachten meer gegevens te vinden voor mijne suppositie, dat de larven, die zich uit reuzeneieren ontwikkelen, op andere wijze opgebouwd zijn dan de tweelingen die zich op latere stadiën vereenigen. Op beide punten bleven mijne proeven niet zonder resultaat.

Wat in de eerste plaats de heterogene versmeltingen betreft, op dezelfde wijze als het vorige jaar kreeg ik ditmaal een 60-tal tweelings-blastulae, die uit één individu van *Parechinus microtuberculatus* en één van *Paracentrotus lividus* samengesteld waren. Een gedeelte van die tweelingen ontwikkelde zich niet of stierf tijdens de ontwikkeling af, maar een tiental ontwikkelde zich tot een dubbelpluteus-stadium, waarbij de beide ongelijksoortige helften, hoewel hunne lichaamsholten in samenhang gebleven waren, onafhankelijk van elkaar waren uitgegroeid en de typische organen hadden gevormd. De scherpe afscheiding tusschen de weefsels van beide partners was bewaard gebleven.

Echter kwamen er ook gevallen voor, waarbij een regulatieverschijnsel in de ontwikkeling optrad, en door dichtgroeien van de blastulae eene volledige scheiding der beide partners veroorzaakt werd. Dit streven naar scheiding was vaak al spoedig te bemerken; van de omstandigheden hing het af in hoever de partners er werkelijk in slaagden hunne verbinding te verbreken, maar in een dozijn gevallen kwam het voor dat de twee

oorspronkelijk vereenigde kiemen ten slotte geheel vrij van elkander rondzwommen.

Voorts kreeg ik één geval waarbij de beide partners op zeer merkwaardige wijze elkaar beïnfluenceerden. Dit geschiedde bij een tweeling, waarvan de Parechinus-helft zich normaal ontwikkelde, maar de Paracentrotus-sector niet uitgroeide en dus langzamerhand slechts een klein deel van het complex innam. Toen nu Parechinus skeletstaven vormde en één daarvan in de richting van den Paracentrotus-sector uitgroeide, vormde deze laatste een wimperzoom, in aansluiting van den wimperzoom die normaal door Parechinus gevormd werd, en dat terwijl hij zelfs niet in staat geweest was een darm in te stulpen. Hier werd dus het Paracentrotus-individu morphologisch geheel ondergeschikt gemaakt aan zijnen partner.

Meer uitgebreid hoop ik dit te bespreken in eene korte verhandeling, die binnenkort in het „Archiv für Entwickelungsmechanik" verschijnen zal.

Bij het onderzoek naar den bouw van de uit versmolten eieren zich ontwikkelende larven, had ik het geluk, dat dit jaar onder de eieren van *Sphaerechinus granularis* in grooteren getale dan anders spontane reuzeneieren voorkwamen, waardoor het niet meer noodig was zelf eieren tot versmelting te brengen. Ik heb toen kunnen nagaan dat deze reuzenlarven ook op het Pluteusstadium nog het dubbele volumen bezitten en dat het met hunne organen evenzoo gesteld is. De mesenchymcellen bleken in normaal aantal en dubbele grootte gevormd te worden. De kernen waren dubbel zoo groot als de normale, het chromosomen-aantal bedroeg ook het dubbele van dat der normale eieren. Door dit alles werd mijn vermoeden bevestigd, dat deze larven opgebouwd waren uit het normale aantal dubbelgroote cellen, terwijl uit de versmeltingen op latere ontwikkelingsstadiën larven opgroeien, die uit het dubbele aantal normaalgroote cellen zijn opgebouwd. Het bleek verder, dat die spontane eiversmelting reeds op een vroeg stadium plaats hebben kan; zoo vond ik b.v. reuzen-oöcyten en reuzen-oöcyten in statu nascendi, d. w. z. met nog twee onversmolten normaalgroote kiemblaasjes of met één groot kiemblaasje, maar nog onversmolten kiemvlekken. Ook hierover hoop ik meer uitvoerig in den „Zool. Anzeiger" te berichten.

Mij rest nog slechts, een woord van dank uit te spreken aan Zijne Excellentie den Minister van Binnenlandsche Zaken, die mij ook ditmaal weder in de gelegenheid stelde gebruik te maken van de schoone arbeidsgelegenheid, die den bioloog aan de Stazione Zoologica te Napels geboden wordt.