

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg.)

# Über die Chemotaxis von Alpengameten.

Von

**Franz Moewus.**

Mit 1 Abbildung im Text.

---

## I. Einleitung.

Die Sexualstoffe von *Chlamydomonas eugametos* und verwandten Arten bestehen aus bestimmten Mischungen von cis- und trans-Crocetindimethylester (MOEWUS, 1938 a, 1939; KUHN-MOEWUS-JERCHEL, 1938). Die Gameten sind kopulationsfähig, wenn sie diese Stoffe ausscheiden. Zellen, die ihre Kopulationsfähigkeit verloren haben, können im Dunkeln in Lösungen der genannten Carotinoide ihre Reaktionsfähigkeit wiedererlangen. Die Kopulationen gehen in der Regel unter Gruppenbildung vor sich. Es wird angenommen, daß chemotaktische Wirkungen im Spiele sind, welche die Gameten zur Gruppenbildung veranlassen. Deshalb erhebt sich die Frage, ob cis- und trans-Crocetindimethylester zugleich als Chemotaktika wirken. Außerdem ist zu untersuchen, ob andere Rassen und Arten denselben „Beweglichkeitsstoff“ ausscheiden wie *Chlamydomonas eugametos* f. *simplex*.

## II. Die Beweglichkeit der *Chlamydomonas*-Zellen.

### a) Die untersuchten Rassen und Arten.

Die Rassen und Arten, die zur *eugametos*-Gruppe gehören, sind bereits beschrieben worden (MOEWUS, 1938 b). Es sind: *Chl. eugametos* f. *typica*, *Chl. eugametos* f. *simplex*, *Chl. eugametos* f. *synoica*, *Chl. eugametos* f. *subheteroica*, *Chl. dresdensis* und *Chl. Braunii*. Diese

Rassen und Arten unterscheiden sich durch morphologische Merkmale, durch die Art der Geschlechtsbestimmung sowie durch die Gametenvalenz (MOEWUS, 1938 b, 1939). Alle Stämme sind auf KNOP-Agar gezüchtet worden. Es handelt sich in allen Fällen um absolute Reinkulturen.

b) Die Wirkung des Lichts auf unbegeißelte Zellen.

Die Zellen aller Rassen und Arten sind, wenn sie auf Agar kultiviert werden, unbegeißelt. Bringt man sie in 0,05 proz. KNOP-Lösung und belichtet sie, dann werden alsbald die Geißeln ausgebildet, und die Zellen werden beweglich. Mit *Chl. eugametos* f. *simplex*, f. *synoica*, f. *subheteroica*, *Chl. dresdensis* und *Chl. Braunii* können diese Versuche auch in destilliertem Wasser ausgeführt werden. *Chl. eugametos* f. *typica* braucht dagegen unbedingt eine bestimmte Menge von Nährsalzen (etwa 0,01 Proz.). Die Wellenlänge des sichtbaren Lichts spielt für das Beweglichwerden keine Rolle. Ich habe die gleichen Lichtquellen verwendet, die in der Sexualstoffarbeit angegeben sind (MOEWUS, 1938 a, p. 766—767, Tab. 5). Die Prüfung erstreckte sich auf Wellenlängen von 4358—6430 Å. Alle Rassen und Arten verhielten sich gleich.

c) Die Wirkung verschiedener Zucker  
auf unbegeißelte Zellen.

Es ist festgestellt worden (MOEWUS, 1938 a), daß unbegeißelte Zellen von *Chl. eugametos* f. *simplex* — im Dunkeln und unter aëroben Bedingungen — in bestimmten Zuckerlösungen beweglich werden. Unter den verwendeten Zuckern erwiesen sich als wirksam: Gentiobiose, d-Glucose, Cellobiose, Cellotriose, Maltose, Lactose, Saccharose, Raffinose. Die für diese Rasse angegebenen Zucker wurden auch an den anderen Rassen und Arten ausprobiert. Die Konzentration der Zucker betrug wieder 1 Proz. Als Zelldichte wurden etwa  $2 \cdot 10^6$  Zellen pro 1 ccm gewählt. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengestellt. Die 4 *eugametos*-Rassen verhalten sich gleich: der wirksamste Zucker ist Gentiobiose, dann folgen d-Glucose, Cellobiose, Cellotriose usw. Der wirksamste Zucker für *Chl. dresdensis* ist Cellobiose, für *Chl. Braunii* Cellotriose. An zweiter Stelle steht bei *Chl. dresdensis* Cellotriose, dann folgt d-Glucose, bei *Chl. Braunii* Cellobiose, dann auch d-Glucose. Jeder Versuch wurde fünfmal mit dem gleichen Ergebnis wiederholt. An der Sicherheit der zeitlichen Unterschiede ist nicht zu zweifeln. In Tab. 1 sind die extremen

Tabelle 1.

Das Beweglichwerden unbegeißelter Zellen unter aëroben Bedingungen im Dunkeln in verschiedenen Zuckerlösungen. Die Zahlen geben an, nach wieviel Minuten die Zellen beweglich sind (5 Versuchsserien). Fett gedruckt sind die kürzesten Zeiten.

	<i>Chl. eugametos</i>				<i>Chl. dresdensis</i>	<i>Chl. Braunii</i>
	f. <i>typica</i>	f. <i>simplex</i>	f. <i>synoica</i>	f. <i>subheteroica</i>		
d-Glucose	21—23	20—22	22—24	21—23	22—24	23—25
Gentiobiose	<b>10—12</b>	<b>10—12</b>	<b>10—12</b>	<b>10—12</b>	30—32	34—36
Cellulose	30—32	30—32	30—32	30—32	<b>10—12</b>	20—22
Maltose	34—36	34—36	34—36	34—36	42—44	40—43
Lactose	46—50	46—50	46—50	46—50	51—54	48—51
Saccharose	52—55	54—56	54—56	54—56	59—63	57—59
Raffinose	85—90	85—90	85—90	85—90	83—88	82—86
Cellotriose	30—32	30—32	30—32	30—32	15—18	<b>11—13</b>
l-Arabinose	—	—	—	—	—	—
d-Ribose	—	—	—	—	—	—
d-Xylose	—	—	—	—	—	—
d-Mannose	—	—	—	—	—	—
d-Galactose	—	—	—	—	—	—
d-Fructose	—	—	—	—	—	—
l-Sorbose	—	—	—	—	—	—

Werte der 5 Versuche angegeben. Für d-Glucose sind die Einzelwerte:

1. *eugametos* f. *typica*: 21', 21', 22', 22', 23';
2. „ f. *simplex*: 20', 21', 21', 21', 22';
3. „ f. *synoica*: 22', 22', 23', 23', 24';
4. „ f. *subheteroica*: 21', 21', 22', 23', 23';
5. *Chl. dresdensis*: 22', 22', 23', 23', 24';
6. *Chl. Braunii*: 23', 23', 24', 24', 25'.

Vollkommen wirkungslos sind l-Arabinose, d-Ribose, d-Xylose, d-Mannose, d-Galactose, d-Fructose und l-Sorbose.

Welche ausschlaggebende Rolle für das Gelingen der Versuche genügende Sauerstoffmengen spielen, zeigen die nächsten 3 Versuche mit 1 Proz. d-Glucoselösungen und unbegeißelten Zellen von *Chl. eugametos* f. *typica*.

1. Überschichtet man nach dem Zugeben unbegeißelter Zellen die Lösung, die sich in Reagenzgläsern befindet, mit Paraffinöl, so bleiben die Zellen unbegeißelt.

2. Man füllt ESMARCH-Schälchen mit d-Glucoselösung, gibt unbegeißelte Zellen hinzu, stellt die Schälchen in einen Exsikkator und evakuiert auf 150 mm Hg-Druck. Dann läßt man absolut O<sub>2</sub>-freien Stickstoff ein- und durchströmen. Die Zellen bleiben unbegeißelt.

3. Man füllt Reagenzgläser mit d-Glucoselösung, bringt unbegeißelte Zellen hinzu und leitet in die Lösung O<sub>2</sub>-freien Stickstoff. Wieder bleiben die Zellen unbegeißelt.

Von Versuchsbeginn an, d. h. nach dem Übersichten mit Paraffinöl bzw. nach Herstellung der Stickstoffatmosphäre herrscht völlige Dunkelheit. Die Zellen assimilieren demnach nicht. Aus diesen Versuchen ist zu entnehmen, daß unter Bedingungen, die praktisch als anaërob anzusehen sind, Begeißelung und Beweglichkeit stets ausbleiben. Wenn im folgenden von anaërob gesprochen wird, so sind darunter, wie in den bereits veröffentlichten Arbeiten, die unter 1.—3. geschilderten Versuchsbedingungen zu verstehen. Aërob bedeutet, daß es sich um luftgesättigte Lösungen handelt.

#### d) Die Wirkung von Crocin auf unbegeißelte Zellen.

Bringt man unbegeißelte Zellen von *Chl. eugametos* f. *simplex* im Dunkeln und unter anaëroben Bedingungen in eine 0,0001proz. Crocinlösung, so werden die Zellen nach 4—5 Minuten beweglich, während Zucker nur in luftgesättigten Lösungen wirksam ist. Wie f. *simplex* verhalten sich auch die anderen 3 *eugametos*-Rassen. Die unbegeißelten Zellen von *Chl. dresdensis* und *Chl. Braunii* zeigen dagegen ein anderes Verhalten (Tab. 2). Die *dresdensis*-Zellen werden erst nach 14—16 Minuten, die *Braunii*-Zellen nach 18—20 Minuten beweglich. Crocin wirkt bei diesen Arten schlechter als Cellobiose bzw. Cellotriose.

Tabelle 2.

Die Wirkung von Crocin, Crocin + Cellobiose, Crocin + Cellotriose, Cellobiose und Cellotriose auf das Beweglichwerden unbegeißelter Zellen.

	0,0001 % Crocin anaërob	0,0001 % Crocin + 1 % Cellobiose anaërob	0,0001 % Crocin + 1 % Cellotriose anaërob	1 % Cellobiose aërob	1 % Cellotriose aërob
<i>Chl. eugametos</i> f. <i>typica</i>	4—5	4—5	4—5	30—32	30—32
<i>Chl. eugametos</i> f. <i>simplex</i>	4—5	4—5	4—5	30—32	30—32
<i>Chl. eugametos</i> f. <i>synoica</i>	4—5	4—5	4—5	30—32	30—32
<i>Chl. eugametos</i> f. <i>subheteroica</i>	4—5	4—5	4—5	30—32	30—32
<i>Chl. dresdensis</i>	14—16	7—8	10—13	10—12	15—18
<i>Chl. Braunii</i>	18—20	10—13	6—8	20—22	11—13

Jetzt wurde den Crocinlösungen Cellobiose und Cellotriose zugegeben. Diese Mischungen wirken auf die *dresdensis*- und *Braunii*-Zellen erheblich besser. Die *dresdensis*-Zellen sind in der Crocin-Cellobiose-Mischung schon nach 7—8 Minuten, die *Braunii*-Zellen in der Crocin-Cellotriose-Mischung nach 6—8 Minuten beweglich. Diese Mischungen wirken auch ohne Sauerstoff und sind besser wirksam als die Zucker allein

e) Die Wirkung von Beweglichkeitsstoff-Filtraten auf unbegeißelte Zellen.

Algen in wässriger Suspension wurden 3 Stunden lang an einer künstlichen Sonne belichtet. Dann wurden die Zellen abfiltriert. In die Filtrate wurden — im Dunkeln und unter Sauerstoffabschluß — unbegeißelte Zellen gebracht. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zu-

Tabelle 3.

Die Wirkung von Beweglichkeitsstoff-Filtraten auf unbegeißelte Zellen.

Filtrat aus beweglichen Zellen von	Beweglichwerden unbegeißelter Zellen von					
	<i>Chl. eugametos</i>				<i>Chl. dresdensis</i>	<i>Chl. Braunii</i>
	f. <i>typica</i>	f. <i>simplex</i>	f. <i>synoica</i>	f. <i>subheteroica</i>		
<i>Chl. eugametos</i> f. <i>typica</i>	4—5	4—5	4—5	4—5	14—16	18—20
<i>Chl. eugametos</i> f. <i>simplex</i>	4—5	4—5	4—5	4—5	14—16	18—20
<i>Chl. eugametos</i> f. <i>synoica</i>	4—5	4—5	4—5	4—5	14—16	18—20
<i>Chl. eugametos</i> f. <i>subheteroica</i>	4—5	4—5	4—5	4—5	14—16	18—20
<i>Chl. dresdensis</i>	17—19	17—19	17—19	17—19	4—5	16—17
<i>Chl. Braunii</i>	21—23	21—23	21—23	21—23	13—15	4—5

sammengestellt. Alle *eugametos*-Zellen werden in den *eugametos*-Filtraten nach 4—5 Minuten beweglich, im *dresdensis*-Filtrat dagegen erst nach 17—19 Minuten, im *Braunii*-Filtrat nach 21—23 Minuten. Die *dresdensis*-Zellen erlangen im *dresdensis*-Filtrat nach 4—5 Minuten ihre Beweglichkeit, im *Braunii*-Filtrat nach 13—15 Minuten, in den *eugametos*-Filtraten nach 14—16 Minuten. Die *Braunii*-Zellen werden im *Braunii*-Filtrat nach 4—5 Minuten beweglich, im *dresdensis*-Filtrat nach 16—17 Minuten, in den *eugametos*-Filtraten nach 18—20 Minuten. Die arteigenen Filtrate wirken also am günstigsten!

## f) Unwirksame Verbindungen.

Außer den in Tab. 1 angegebenen, nicht wirkenden Zuckern erwiesen sich folgende Verbindungen als unwirksam: Methylalkohol, Äthylalkohol, n-Propylalkohol, Isopropylalkohol, n-Butylalkohol, tert. Butylalkohol, Isoamylalkohol, tert. Amylalkohol, Allylalkohol, Glycerin, Dulcit, Mannit, Benzylalkohol, Formaldehyd, Acetaldehyd, Aceton, Äthyläther, Natriumformiat, Essigsäure, Natriumazetat, Natriumpropionat, Oxalsäure, Natriumoxalat, Malonsäure, Kaliumsuccinat, Äpfelsäure, Zitronensäure, tert. Natriumzitrat, Milchsäure, Natriumlactat, Glykokoll, d,l- $\alpha$ -Alanin, Asparagin, Formamid, Acetamid, Glyoxal, Chloralhydrat, Phenol, Hydrochinon, Kresol, Pikrinsäure, Salizylsäure, ferner gesättigte wässrige Lösungen von Benzol, Toluol, Xylol. Je nach dem Grad der Schädlichkeit betrug die Konzentration dieser Verbindungen 0,001—1 Proz. Brenztraubensäure wirkte noch in einer 0,001proz. Lösung auf die Zellen aller Rassen und Arten tödlich, eine 0,0001proz. Lösung war unwirksam. Außerdem waren folgende Carotinoide ohne jede Wirkung: Crocetin, cis-Crocetindimethylester, trans-Crocetindimethylester, trans-Bixin, cis-Bixin, Azafrin, Azafrinmethylester, Decapentaen-1.10-dicarbonensäure-dimethylester, 1.4.8-Trimethyloctatetraen-dicarbonensäure-dimethylester, Octatetraen-dicarbonensäure, Oxalo-tetradeca-hexaensäure-diäthylester, ferner autoxydiertes Lutein, Violaxanthin,  $\beta$ -Carotin und Carotin „aus Mutterlaugen“.

Auch eine Reihe anorganischer Salze wurde geprüft: NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NaHSO<sub>4</sub>, NaNO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KCl, KNO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>OH, NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MgCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, CaSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>. Alle diese Salze waren in den verschiedensten, physiologisch in Betracht kommenden Konzentrationen auf die Beweglichkeit der Zellen aller Rassen und Arten ohne Einfluß.

## g) Die Wirksamkeit des Crocins.

Crocine wirkt auf die unbegeißelten Zellen von *Chl. eugametos f. simplex* noch in einer Verdünnung von 1:250 Billionen (MOEWUS 1938 a, p. 765—766). Da diese Versuche von grundsätzlicher Bedeutung sind, sollen sie an dieser Stelle ausführlich geschildert werden.

## 1. Kulturen und Zelldichte.

Die unbegeißelten Zellen stammen von Agarkulturen, die besonders sorgfältig vorzubereiten sind. 3—4 Wochen vorher wird

KNOP-Agar (Agarkonzentration 5 Proz.) in PETRI-Schalen ausgegossen. 3 Tage vor Beginn des Versuchs werden zentrifugierte, bewegliche Zellen in einer gleichmäßig grünen Schicht auf die Agaroberfläche gebracht. Nach einigen Stunden ist bereits das Wasser in den Agar eingedrungen. Die Zellen liegen jetzt recht gleichmäßig auf der Agaroberfläche verteilt. Die Kulturen bleiben 3 Tage unter einer künstlichen Sonne bei 20—21° C. Die Zellen sind dann am Versuchstag ohne Geißeln, wie stets vorgenommene Stichproben ergaben.

Am Versuchstag kommt nun in jedes Reagenzglas, das mit 5 ccm der zu prüfenden Crocinlösung gefüllt ist, ein ungefähr 1 qcm großes Stück der grünen Fläche, das mit einem Spatel vorsichtig abgehoben wird. Beschießt man z. B. 20 Reagenzgläser auf diese Weise mit Zellen und bestimmt man nach kräftigem Schütteln mit einer ZEISSschen Blutzählkammer die Zelldichte, so erhält man folgende Werte:  $2,14 \cdot 10^6$ — $1,59 \cdot 10^6$ — $1,77 \cdot 10^6$ — $2,05 \cdot 10^6$ — $2,11 \cdot 10^6$ — $2,41 \cdot 10^6$ — $2,59 \cdot 10^6$ — $3,20 \cdot 10^6$ — $1,46 \cdot 10^6$ — $1,99 \cdot 10^6$ — $2,02 \cdot 10^6$ — $1,88 \cdot 10^6$ — $1,44 \cdot 10^6$ — $2,19 \cdot 10^6$ — $1,95 \cdot 10^6$ — $2,33 \cdot 10^6$ — $2,47 \cdot 10^6$ — $2,09 \cdot 10^6$ — $1,39 \cdot 10^6$ — $1,80 \cdot 10^6$  Zellen in 1 ccm. Es ergibt sich aus diesen Bestimmungen ein Mittelwert von ca.  $2 \cdot 10^6$  Zellen in 1ccm.

Seit Jahren hat sich die Verwendung einer bestimmten Zelldichte als außerordentlich günstig für ungestörte Beweglichkeit, normale Vermehrung und normale Kopulationsfähigkeit erwiesen, nämlich  $2 \cdot 10^6$  Zellen in 1 ccm. Die Lösungen von dieser Zelldichte haben eine hellgrüne Farbe; eine Zelle hat das 500—800fache ihres Volumens an Wasser zur Verfügung. Diese Zelldichte kann man nach der oben beschriebenen Methode ohne allzu große Schwierigkeiten erreichen. Unter 20 Reagenzgläsern sind naturgemäß die Schwankungen erheblich: von  $1,39 \cdot 10^6$ — $3,20 \cdot 10^6$ . In der Arbeit von KUHN-MOEWUS-JERCHEL (1938, p. 1545) und MOEWUS (1938 a, p. 765) waren die Fehlergrenzen bei der Zelldichtebestimmung noch recht groß. In der Tabelle p. 1545 waren drei Versuche für jede Verdünnungsstufe angegeben, d. h. es wurden nur solche Versuche ausgewertet, und zwar nur die ersten drei, bei denen die Zelldichte gerade  $2 \cdot 10^6$  Zellen in 1 ccm war. Höhere oder niedrigere Zelldichten wurden nicht ausgewertet. In später ausgeführten Versuchen, die im folgenden geschildert werden sollen, wurden aber alle Zelldichten berücksichtigt. Die neuen Bestimmungen der Zelldichte konnten soweit verfeinert werden, daß der mittlere Fehler der Durchschnittswerte nur noch 3 Proz. betrug.

## 2. Crocinmenge, Verdünnungsreihen und Reihenversuche.

0,4 mg Crocin werden in 100 ccm doppeltdestilliertem Wasser gelöst. Diese Lösung enthält  $2,47 \cdot 10^{15}$  Molekeln in 1 ccm. Mit doppeltdestilliertem Wasser werden dann folgende Verdünnungen hergestellt:  $2,47 \cdot 10^{14}$ — $2,47 \cdot 10^{13}$ — $2,47 \cdot 10^{12}$ — . . .  $2,47 \cdot 10^6$ — $2,47 \cdot 10^5$ — $2,47 \cdot 10^4$ — $2,47 \cdot 10^3$  Molekeln in 1 ccm. Alle diese Lösungen müssen im Dunkeln aufbewahrt werden. Es hat sich gezeigt, daß konzentrierte, gefärbte Lösungen sich am Licht recht bald entfärben und an Wirksamkeit verlieren (vgl. KUHN-MOEWUS-JERCHFL 1938, p. 1544). Eine Lösung, die z. B.  $2,47 \cdot 10^6$  Molekeln in 1 ccm enthält, ist stets farblos; sie läßt sich mit dem Auge von destilliertem Wasser nicht unterscheiden. Die Versuche müssen in völliger Dunkelheit ausgeführt werden, sobald man in die Crocinlösung die unbegeißelten Zellen gebracht hat. Die Bestimmungen der Zelldichte können erst nach Beendigung des Versuchs vorgenommen werden. Man ist daher gezwungen, jede Verdünnungsstufe mehrmals zu prüfen, da man ja nie weiß, ob die Zelldichte der Standardeinheit entsprechen wird. Aus diesem Grunde wurde jede Verdünnungsstufe mit 20 Reagenzgläsern ausgeführt. Solch eine Versuchsreihe nenne ich einen Reihenversuch. Ein Reihenversuch mit  $2,47 \cdot 10^6$  Molekeln in 1 ccm soll jetzt geschildert werden.

8<sup>50 h</sup> 20 Reagenzgläser mit je 5 ccm Crocinlösung gefüllt.

9<sup>00 h</sup> Zellen von Agar in das erste Glas, im Dunkeln zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen kräftig geschüttelt und eine geeichte Pipette bereit gelegt.

9<sup>05 h</sup> Probe mit einer Pipette entnommen. Menge sofort am Licht abgelesen: 1,4 ccm. Ein Teil der Probe sofort lebend unter das Mikroskop, anderer Teil mit  $O_3O_4$ -Dämpfen fixiert. Der erste Teil darauf sofort mikroskopisch auf Beweglichkeit gemustert: alle Zellen sind beweglich; unbewegliche Zellen nicht festgestellt. (Einzelne unbewegliche Zellen müssen auffallen, wie folgender Kontrollversuch lehrt: einem Tropfen beweglicher Zellen werden etwa 50 unbegeißelte Zellen zugefügt, man kann dann mikroskopisch einwandfrei feststellen, daß unbewegliche Zellen darunter sind.)

9<sup>10 h</sup> zweites Reagenzglas mit unbegeißelten Zellen beschickt. Abgetötete Zellen der zweiten Probe des ersten Glases eingehend mikroskopisch auf Begeißelung gemustert: Alle Zellen begeißelt. Die restlichen 3,6 ccm des ersten Glases werden jetzt mit 3,6 ccm 100proz. Alkohol fixiert. Das Glas wird

fest verschlossen. Versuch beendet, da Zelldichte später bestimmt wird.

9<sup>15</sup> h dem zweiten Glas mit geeichter Pipette Probe entnommen: 1,3 ccm usw.

9<sup>20</sup> h Ansetzen des dritten Glases usw.

9<sup>25</sup> h Probe entnommen: 1,9 ccm usw.

12<sup>10</sup> h Ansetzen des 20. Glases usw.

12<sup>15</sup> h Probe entnommen: 2,1 ccm usw.

Damit ist der Reihenversuch beendet. Die Bestimmung der Zelldichte wird nachmittags vorgenommen oder, fall am Nachmittag ein weiterer Reihenversuch ausgeführt werden soll, an einem späteren Tage. Es ist begreiflicherweise nicht möglich, die ganze, mit Alkohol fixierte Zellösung auf begeißelte Zellen zu prüfen. In der Regel wurden 0,6—1 ccm untersucht (Kreuztisch, Deckgläser von 50×22 mm Größe mit etwa 0,3 ccm Lösung mit Paraffin eingeschlossen. Da die Paraffinschicht sehr dünn gewählt wurde, konnten auch die Randpartien einwandfrei untersucht werden).

Im folgenden sind die Werte des eben beschriebenen Reihenversuchs wiedergegeben (Tabelle 4).

Tabelle 4.

	Zellen in 1 ccm	Molekeln pro Zelle	% beweg- liche Zellen
1	1,95	1,27	100
2	1,82	1,36	100
3	1,70	1,45	100
4	2,56	0,97	15,3
5	2,03	1,22	100
6	2,19	1,13	61,2
7	1,77	1,40	100
8	1,41	1,75	100
9	1,58	1,56	100
10	1,97	1,25	100
11	2,05	1,21	100
12	2,37	1,04	30,2
13	2,41	1,03	28,3
14	2,63	0,94	10,9
15	2,81	0,90	6,8
16	2,22	1,11	44,1
17	2,01	1,23	100
18	2,52	0,98	14
19	2,41	1,03	31,7
20	1,65	1,50	100

Auf die Ergebnisse soll erst später eingegangen werden. Mit den Verdünnungsstufen  $2,47 \cdot 10^{15}$ ;  $2,47 \cdot 10^{14}$ ;  $2,47 \cdot 10^{13}$ ;  $2,47 \cdot 10^{12}$ ;  $2,47 \cdot 10^{11}$ ;  $2,47 \cdot 10^{10}$ ;  $2,47 \cdot 10^8$ ,  $2,47 \cdot 10^7$  Molekeln in 1 ccm wurden

je zwei Reihenversuche ausgeführt, alle mit dem gleichen Ergebnis: alle Zellen erhalten in diesen Lösungen ihre Geißeln und werden beweglich. Mit der folgenden Verdünnungsstufe  $2,47 \cdot 10^6$  Molekeln in 1 ccm wurden drei Reihenversuche ausgeführt. Es lagen also dann 60 Einzelwerte vor. Die Prüfung der folgenden Verdünnungsstufe mit  $2,47 \cdot 10^5$  Molekeln in 1 ccm wurde in sieben Reihenversuchen vorgenommen, also zusammen 140 Einzelwerte. Endlich wurde ein Reihenversuch mit  $1,235 \cdot 10^6$  Molekeln in 1 ccm ausgeführt. Außerdem wurde je ein Reihenversuch mit  $2,47 \cdot 10^4$  und  $2,47 \cdot 10^3$  Molekeln in 1 ccm ausgeführt, mit dem Ergebnis, daß alle Zellen unbegeißelt blieben. Das war zwar zu erwarten, aber auf Grund der Ergebnisse in den kritischen Bereichen von  $2,47 \cdot 10^6$ — $2,47 \cdot 10^5$  wurden die Versuche doch ausgeführt. In der folgenden Tab. 5 ist eine Übersicht über alle Versuche gegeben:

Tabelle 5.

Molekeln in 1 ccm	Zahl der Reihenversuche	Zahl der Einzelwerte	Ergebnisse
$2,47 \cdot 10^{15}$	2	40	} alle Zellen begeißelt
$\cdot 10^{14}$	2	40	
$\cdot 10^{13}$	2	40	
$\cdot 10^{12}$	2	40	
$\cdot 10^{11}$	2	40	
$\cdot 10^{10}$	2	40	
$\cdot 10^9$	2	40	
$\cdot 10^8$	2	40	
$\cdot 10^7$	2	40	
$\cdot 10^6$	3	60	
$\cdot 10^5$	7	140	
$\cdot 10^4$	1	20	} alle Zellen unbegeißelt
$\cdot 10^3$	1	20	
$1,235 \cdot 10^6$	1	20	} besondere Besprechung

Wir kommen jetzt zur Besprechung der Ergebnisse von den drei kritischen Verdünnungsstufen  $2,47 \cdot 10^6$ ;  $1,235 \cdot 10^6$ ;  $2,47 \cdot 10^5$  Molekeln in 1 ccm.

(1)  $2,47 \cdot 10^6$  Molekeln in 1 ccm.

Aus drei Reihenversuchen liegen 60 Einzelwerte vor. 20 Einzelwerte sind bereits oben wiedergegeben worden. Daraus können wir entnehmen, daß nur dann 100 Proz. Begeißelung erreicht wird, wenn mindestens 1,21 Moleküle auf jede Zelle kommen. Bei dem zweiten Reihenversuch wurde 100 Proz. Begeißelung noch bei 1,19 Molekülen pro Zelle erhalten. Sowie aber der Molekel/Zelle-Wert auf 1,17 und darunter gesunken ist, werden nicht mehr alle Zellen begeißelt. Das ist sehr eigenartig. Molekel/Zelle-Werte von 1,17 und weniger

liegen insgesamt 45 vor. Die Zahl der begeißelten Zellen ist in Abb. 1 eingetragen. Wir sehen, daß von 1,17 ab die Zahl der begeißelten Zellen sehr schnell absinkt, so daß bei 1,00 nur noch

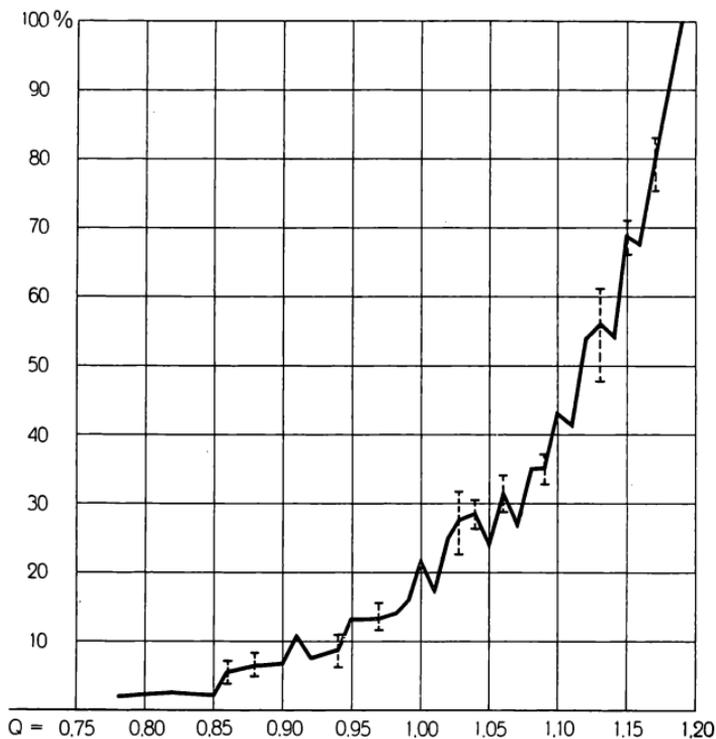


Abb. 1.

21,5 Proz. der Zellen begeißelt sind. Bei 0,86 Molekel/Zelle werden nur noch 8,3 Proz. Zellen begeißelt.

(2)  $1,235 \cdot 10^6$  Molekeln in 1 ccm.

Tabelle 6.

Molekeln/Zelle	% begeißelte Zellen	Molekeln/Zelle	% begeißelte Zellen
0,77	1,71	0,53	0,11
0,73	1,84	0,53	0,08
0,71	1,00	0,51	0,16
0,66	0,99	0,48	0,14
0,62	0,52	0,47	0,03
0,61	0,42	0,44	0,07
0,61	0,81	0,42	0,009
0,58	0,09	0,39	0,06
0,57	0,19	0,31	0,02
0,55	0,25	0,31	0,005

Bei dem Wert 0,31 Molekeln/Zelle werden nur 0,02 bzw. 0,005 Proz Zellen begeißelt.

(3)  $2,47 \cdot 10^5$  Molekeln in 1 ccm.

Die 140 Einzelwerte sind in der folgenden Tab. 7 eingetragen.

Nimmt man an, daß jede Zelle zur Begeißelung eine einzige Crocin-Molekel benötigt, dann wäre zu erwarten, daß bei einem Molekel/Zelle-Wert von  $Q = 1,0100$  Proz., bei  $Q = 0,2$  noch 20 Proz. der Zellen begeißelt werden. Bei  $Q = 1,0$  liegt der gefundene Prozentsatz an begeißelten Zellen aber nur bei 21,5 Proz., während er bei  $Q = 0,2$  nur 0,005 Proz. beträgt; bei  $Q = 0,1$  (Erwartung 10 Proz.) waren von zwölf beobachteten Werten  $10 = 0$  Proz.;  $1 = 0,0013$  Proz.;  $1 = 0,0001$  Proz. Worauf dieser steile Abfall der Kurve (Abb. 1) beruht, läßt sich zur Zeit nicht sagen.

Das Ergebnis der jetzt vorliegenden eingehenden Untersuchung lautet also: nur wenn 119 und mehr Molekeln Crocin auf 100 Zellen vorhanden sind, erhalten 100 Proz. der Zellen Geißeln. Trotzdem können wir nach wie vor sagen: jede Zelle benötigt zur Begeißelung nur eine einzige Crocin-Molekel, denn auf fünf Zellen sind nur sechs Molekeln erforderlich. In den ersten, 1938 veröffentlichten Versuchen, wurden nur solche Lösungen berücksichtigt, die  $2 \cdot 10^6$  Zellen in 1 ccm enthielten. 100 Proz. Begeißelung erfolgte, wenn auf vier Zellen fünf Molekeln trafen. Versuche mit abweichenden Zelldichten wurden damals nicht ausgewertet.

Der erste Verdünnungsversuch, der von KUHN-MOEWUS-JERCHEL (1938) angegeben ist, wurde wie folgt ausgeführt. Ich erhielt eine mir unbekannte, von einer Laborantin abgewogene Menge Crocin (x) und stellte damit verschiedene Verdünnungsstufen her, die folgende Mengen enthielten:  $x/100$ ,  $x/1000$ ,  $x/10\,000$  usw. Die nachträgliche Berechnung von Professor R. KUHN ergab dann, da  $x = 0,4$  mg war, daß die noch wirksame Konzentration bei  $2,4 \cdot 10^6$  Molekeln Crocin in 1 ccm lag.

In Tab. 8 sind vergleichende Untersuchungen mit den vier eugametos-Rassen, *Chl. dresdensis* und *Chl. Braunii* wiedergegeben. Für *f. simplex*, *f. typica* und *f. subheteroica* ist nur eine Crocin-Molekel zur Begeißelung erforderlich, *f. synoica* benötigt dagegen 100 Molekeln, *Chl. dresdensis* 100 000, *Chl. Braunii* sogar 1 000 000 Molekeln Crocin je Zelle. Hier kommt wieder die geringe Wirksamkeit des Crocins auf *dresdensis*- und *Braunii*-Zellen deutlich zum Ausdruck. Während die in II d geschilderten Versuche unter anaeroben Bedingungen durchgeführt wurden, hatte bei den Crocin-Verdünnungsversuchen Luft Zutritt.



Tabelle 8.

Das Beweglichwerden in verschiedenen Crocin-Verdünnungen ( $\times = 100\%$  bewegliche Zellen,  $\times!$  vgl. Abb. 1,  $-! = < 0,01\%$  bewegliche Zellen,  $- =$  keine beweglichen Zellen festgestellt).

0,4 mg Crocin in 1 ccm Wasser	Zahl der Zellen in 1 ccm	Zahl der Moleküle in 1 ccm	<i>Chl. eugametos</i>				<i>Chl. dres- densis</i>	<i>Braunii</i>
			<i>f. simplex</i>	<i>f. typica</i>	<i>f. sub- heteroica</i>	<i>f. synoica</i>		
10 <sup>1</sup>	2·10 <sup>6</sup>	2,4·10 <sup>16</sup>	×	×	×	×	×	×
10 <sup>2</sup>	2·10 <sup>6</sup>	2,4·10 <sup>15</sup>	×	×	×	×	×	×
10 <sup>3</sup>	2·10 <sup>6</sup>	2,4·10 <sup>14</sup>	×	×	×	×	×	×
10 <sup>4</sup>	2·10 <sup>6</sup>	2,4·10 <sup>13</sup>	×	×	×	×	×	×
10 <sup>5</sup>	2·10 <sup>6</sup>	2,4·10 <sup>12</sup>	×	×	×	×	×	×
10 <sup>6</sup>	2·10 <sup>6</sup>	2,4·10 <sup>11</sup>	×	×	×	×	×	—!
10 <sup>7</sup>	2·10 <sup>6</sup>	2,4·10 <sup>10</sup>	×	×	×	×	—!	—
10 <sup>8</sup>	2·10 <sup>6</sup>	2,4·10 <sup>9</sup>	×	×	×	×	—	—
10 <sup>9</sup>	2·10 <sup>6</sup>	2,4·10 <sup>8</sup>	×	×	×	×	—	—
10 <sup>10</sup>	2·10 <sup>6</sup>	2,4·10 <sup>7</sup>	×	×	×	—!	—	—
10 <sup>11</sup>	2·10 <sup>6</sup>	2,4·10 <sup>6</sup>	×	×	×	—	—	—
10 <sup>12</sup>	2·10 <sup>6</sup>	2,4·10 <sup>5</sup>	—!	—!	—!	—	—	—
10 <sup>13</sup>	2·10 <sup>6</sup>	2,4·10 <sup>4</sup>	—	—	—	—	—	—

Alle diese Ergebnisse sprechen dafür, daß *Chl. eugametos*, *Chl. dresdensis* und *Chl. Braunii* verschiedene Beweglichkeitsstoffe ausscheiden und benötigen. Wir wissen für *Chl. eugametos*, daß der Beweglichkeitsstoff Crocin ist (= Digentiobioseester des Crocetins). Deshalb ist offenbar auch Gentiobiose der wirksamste Zucker. Die Beweglichkeitsstoffe von *Chl. dresdensis* und *Chl. Braunii* müssen wohl andere Zuckerester des Crocetins sein; vielleicht ist es bei *dresdensis* ein Cellobioseester, bei *Braunii* ein Cellotrioseester, weil diese beiden Zucker am wirksamsten sind. Auf keinen Fall kann der Beweglichkeitsstoff von *eugametos* mit dem dieser beiden Arten identisch sein. Sonst dürften sich nicht die großen Unterschiede bei der Zucker- und Crocinwirkung ergeben. Die *dresdensis*- und *Braunii*-Zellen haben aber die Fähigkeit, aus Crocin den ihnen eigenen Zuckerester zu bilden. Eine genauere Prüfung ist erst dann möglich, wenn wir verschiedene Zuckerester des Crocetins kennen. Bisher liegt nur der Digentiobioseester chemisch dargestellt vor. Die Ergebnisse weisen aber darauf hin, daß es noch andere Zuckerester geben wird.

### III. Die Chemotaxis der Gameten.

#### a) Methodik.

Die Versuche wurden mit absoluten Reinkulturen ausgeführt. Alle Rassen und Arten wurden auf KNOP-Agar gezüchtet. Die Reinheit der Kulturen wurde stets durch Überimpfen in Bakterien-

bouillon geprüft. Die Agarkonzentration betrug 5 Proz. Dadurch war es möglich, die Zellen vom Agar abzuheben, ohne störende größere Agarreste mit zu übertragen. Alle Kulturen, mit denen Chemotaxisversuche ausgeführt wurden, waren eine Woche alt.

Die Glaskapillaren von etwa 0,08—0,1 mm Dicke, in welche das Chemotaktikum kommen sollte, wurden vorher sorgfältig gereinigt und mehrmals mit doppeltdestilliertem Wasser ausgekocht. Das eine Ende wurde zugeschmolzen. Die Kapillaren wurden dann im Vakuum getrocknet und darin auch aufbewahrt.

Die Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt. Auf einen hohlgeschliffenen Objektträger kommt eine bestimmte, für jeden Versuch stets gleiche Menge Kulturlösung (geeichte Kapillarpipetten). Dann wird das offene Ende der mit dem Chemotaktikum gefüllten Kapillare von einer Seite her (links) in den Tropfen gebracht. Unmittelbar darauf bringt man eine bestimmte Algenmenge in die rechte Randzone. Die Algendichte wurde so gewählt, daß ungefähr  $2 \cdot 10^6$  Zellen in 1 ccm enthalten sind. Aerotaxis wurde nicht beobachtet.

Die Versuche mußten zum Teil vollkommen im Dunkeln ausgeführt werden. Denn im roten Licht bilden die Zellen cis-Crocetindimethylester und Crocin, im blauen und violetten Licht cis- und trans-Crocetindimethylester und Crocin. Die Ausscheidung dieser Substanzen sollte aber gerade vermieden werden. Wir müssen daher so vorgehen, daß fast gleichzeitig bei jedem Versuch eine ganze Reihe von Objektträgern angesetzt wird, etwa 15—20. Sowie die Algen dem Tropfen zugefügt sind, muß völlige Dunkelheit herrschen. Das läßt sich praktisch dadurch erreichen, daß alle Objektträger auf schwarzem Papier stehen und sofort nach dem Zugeben der Algen ein Deckel einer Zigarettenschachtel übergedeckt wird. Die Lichtquelle — dunkles rotes Licht — befindet sich in 2 m Entfernung. In bestimmten Zeitabständen werden nun die Objektträger geprüft. Jeder untersuchte Objektträger scheidet aus, da die Algen dabei Mikroskopierlicht bekommen haben. Die Mikroskopbeleuchtung ist so abgeschirmt, daß kein Licht in die Dunkelkammer fällt. Das Ziel dieser Versuche war, festzustellen, ob und wann eine chemotaktische Anlockung eingetreten ist. Man spricht von deutlicher positiver Reaktion, wenn eine große Menge der Algenzellen um das Kapillarende angesammelt und in die Kapillare eingedrungen ist. Alle Versuche wurden dreimal ausgeführt, d. h. an 3 verschiedenen Tagen wurden 15—20 Objektträger dazu angesetzt. Denn eine negative Reaktion, d. h. keine Ansammlung am Kapillarende, könnte

dadurch zustande gekommen sein, daß man den Augenblick der Ansammlung „verpaßt“ hat, da mit der Zeit das Chemotaktikum in die Kulturlösung diffundiert. Eine positive Reaktion könnte dadurch vorgetäuscht sein, daß der Kapillare chemotaktisch wirksame Unsauberkeiten ungehaftet haben. Jede einzelne positive oder negative Reaktion, die in den folgenden Tabellen beschrieben wird, gründet sich also auf 45—60 Einzelbeobachtungen! Man ist nie im Zweifel, ob eine chemotaktische Anlockung vorliegt oder nicht. Bei nicht wirksamen Substanzen ist die Algenverteilung ganz gleichmäßig im Tropfen, bei den wirksamen ist stets eine deutliche Ansammlung zu beobachten.

b) Über die Wasserlöslichkeit  
von cis- und trans-Crocetindimethylester.

Die beiden Crocetindimethylester werden bisher als wasserunlöslich beschrieben. Nach KUHN und WINTERSTEIN (1933) sind sie u. a. in Methanol löslich, und zwar beträgt die Löslichkeit des cis-Crocetindimethylesters 1:5000, die des trans-Esters 1:100000. Eine gewisse, wenn auch geringe Löslichkeit in Wasser müssen aber beide Ester besitzen, denn sonst wäre ja der biologische Nachweis ihrer Wirkung nicht möglich gewesen. In mehrfachen Versuchen ist die Grenze ihrer biologischen Wirksamkeit festgestellt worden. Die Verdünnungen wurden so hergestellt, daß zunächst 0,3 mg cis-Crocetindimethylester in Methanol, 0,3 mg trans-Crocetindimethylester in einer Mischung aus Methanol und Chloroform gelöst wurden. Dabei ging alle Substanz in Lösung. Die weiteren Verdünnungen wurden dann mit Wasser vorgenommen. Es stellte sich heraus, daß die Grenze der biologischen Wirksamkeit für beide Ester bei  $3 \cdot 10^{-5} \gamma$  in 1 ccm Wasser liegt.  $2 \cdot 10^{-5} \gamma$  in 1 ccm sind bereits unwirksam. Die Wirksamkeitsgrenze ist also  $\leq 1:33\,000\,000\,000$  und  $> 1:49\,500\,000\,000$ . Es ist nun möglich, mit Hilfe dieses Wertes und der biologischen Testmethode die Wasserlöslichkeit von cis- und trans-Crocetindimethylester zu bestimmen. 1 bzw. 5 mg cis- und trans-Crocetindimethylester wurden bei  $20^\circ$  in je 100 ccm Wasser gebracht, wobei anscheinend nichts in Lösung ging. Das Wasser blieb ungefärbt. Stellen wir jetzt aus den Lösungen bestimmte cis/trans-Mischungen her (3:1 bzw. 1:3), dann finden wir, daß sie weibliche bzw. männliche Wirksamkeit besitzen (Tab. 9). Es ist dabei gleichgültig, ob 1 oder 5 mg Ester in 100 ccm Wasser gebracht wurden. Daraus müssen wir schließen, daß alle 4 Lösungen in Tab. 9 gleich viel Substanz gelöst enthalten, d. h. gesättigt sind.

Tabelle 9.

Die Wirksamkeit verschiedener cis/trans-Mischungen.

	Crocetin-dimethylester	mg in 100 ccm H <sub>2</sub> O	Hergestellte Mischungen	Biologische Wirksamkeit
1.	cis	1	} 3 ccm (1) + 1 ccm (2) } 1 " (1) + 3 " (2) } 3 " (3) + 1 " (4) } 1 " (3) + 3 " (4)	weiblich
2.	trans	5		männlich
3.	cis	5		weiblich
4.	trans	1		männlich

Wir wollen annehmen, in 1 ccm dieser Lösungen seien  $x \gamma$  gelöst. Wenn wir jetzt diese Lösungen verdünnen, können wir prüfen, wann die Grenze der Wirksamkeit erreicht ist. Diese Bestimmungen sind in Tab. 10 wiedergegeben. Alle 4 Lösungen ergeben denselben Grenzwert:  $x \cdot 10^{-2} \gamma$ . Der oben angegebene Grenzwert der biologischen Wirksamkeit liegt zwischen  $3 \cdot 10^5 \gamma$  und  $2 \cdot 10^{-5} \gamma$ . Für  $x$  ergibt sich daher  $\leq 3 \cdot 10^{-3} \gamma$  und  $> 2 \cdot 10^{-3}$ . In 1 ccm Wasser sind also  $3 \cdot 10^{-3}$  bis  $2 \cdot 10^{-3} \gamma$  cis- und trans-Crocetindimethylester löslich. Die Wasserlöslichkeit beträgt demnach 1 : 333 000 000 bis 1 : 495 000 000. Es ist damit gelungen, auf biologischem Wege die Wasserlöslichkeit praktisch wasserunlöslicher Verbindungen zu bestimmen.

Tabelle 10.

Die Wirksamkeitsgrenzen der 4 in Tabelle 9 angegebenen Lösungen.

	Verdünnung	1 ccm enthält	Biologische Wirksamkeit
Lösung 1 (Tab. 9)	I + 9 ccm Wasser	$x \gamma = I$	+
	II + 9 " "	$x \cdot 10^{-1} \gamma = II$	+
	III + 9 " "	$x \cdot 10^{-2} \gamma = III$	+
Lösung 2 (Tab. 9)	I + 9 " "	$x \cdot 10^{-3} \gamma = IV$	—
	II + 9 " "	$x \gamma = I$	+
	III + 9 " "	$x \cdot 10^{-1} \gamma = II$	+
Lösung 3 (Tab. 9)	I + 9 " "	$x \cdot 10^{-2} \gamma = III$	+
	II + 9 " "	$x \cdot 10^{-3} \gamma = IV$	—
	III + 9 " "	$x \gamma = I$	+
Lösung 4 (Tab. 9)	I + 9 " "	$x \cdot 10^{-1} \gamma = II$	+
	II + 9 " "	$x \cdot 10^{-2} \gamma = III$	+
	III + 9 " "	$x \cdot 10^{-3} \gamma = IV$	—

Aus diesen Ergebnissen lassen sich außerdem noch Schlüsse auf die Konzentration der von den Algen ausgeschiedenen Sexualstoffe ziehen. Die biologischen Versuche haben ergeben, daß die Algenzellen unter bestimmten Bedingungen (monochromatisches rotes

Licht) eine Sexualstoffvorstufe V bilden. Diese V-Stufe entspricht dem cis-Crocetindimethylester. Aus der V-Stufe, aus dem cis-Ester, aus den weiblichen und männlichen Gametenfiltraten wie aus den bestimmten, wirksamen cis/trans-Mischungen erhält man nach Bestrahlung mit monochromatischem blauen und violetten Licht eine an sich unwirksame Endstufe  $K_0$ . Diese  $K_0$ -Stufe entspricht dem trans-Crocetindimethylester. Wir können also statt der bestimmten cis/trans-Mischungen auch V/ $K_0$ -Mischungen herstellen und deren Wirksamkeit prüfen. V wird durch Filtration von Rotlichtzellen gewonnen,  $K_0$  z. B. durch Bestrahlung eines männlichen Gametenfiltrates mit blauem und violettem Licht. Folgende Mischungen besaßen weibliche Wirksamkeit: 3 Vol. Teile V + 1 Vol. Teil  $K_0$ , 3 cis-Ester + 1  $K_0$ , 3 V + 1 trans-Ester, 3 cis- und 1 trans-Ester. Männlich wirksam waren: 1 Vol. Teil V + 3 Vol. Teile  $K_0$ , 1 cis-Ester + 3  $K_0$ , 1 V + 3 trans-Ester, 1 cis- und 3 trans-Ester. Bei den Estern handelt es sich um gesättigte wässrige Lösungen ( $20^\circ \text{C}$ ), d. h. in 1 ccm sind  $3 \cdot 10^{-3}$ — $2 \cdot 10^{-3} \gamma$  Substanz enthalten. Aus diesen Mischungsversuchen ist der Schluß zu ziehen, daß die V- und  $K_0$ -Filtrate, die auf biologischem Wege gewonnen wurden, die gleiche Konzentration wie die Esterlösungen haben müssen. Denn sonst könnten die oben angegebenen 3:1- bzw. 1:3-Mischungen nicht die gleiche Wirksamkeit besitzen. Mischt man z. B. cis- und trans-Crocetindimethylester-Lösungen von verschiedener Konzentration, so sind, wie Tab. 11 zeigt, die 3:1- bzw. die 1:3-Mischungen

Tabelle 11.

Wirksamkeit von cis/trans-Gemischen verschiedener Konzentration.

cis-Crocetindimethylester $3 \cdot 10^{-4} \gamma$ in ccm	trans-Crocetindimethylester $3 \cdot 10^{-3} \gamma$ in 1 ccm	cis/trans-Mengenverhältnis	Biologische Wirksamkeit
3 ccm mit $9 \cdot 10^{-4} \gamma$	+ 1 ccm mit $3 \cdot 10^{-3} \gamma$	3:10	—
10 " " $3 \cdot 10^{-3} \gamma$	+ 1 " " $3 \cdot 10^{-3} \gamma$	1:1	—
30 " " $9 \cdot 10^{-3} \gamma$	+ 1 " " $3 \cdot 10^{-3} \gamma$	3:1	weiblich
1 " " $3 \cdot 10^{-4} \gamma$	+ 3 " " $9 \cdot 10^{-3} \gamma$	1:30	—
10 " " $3 \cdot 10^{-3} \gamma$	+ 3 " " $9 \cdot 10^{-3} \gamma$	1:3	männlich

unwirksam. Tab. 12 zeigt einen ähnlichen Versuch mit einer cis/ $K_0$ -Mischung, bei der die Lösung des cis-Crocetindimethylesters verdünnter ist als die des  $K_0$ -Filtrates. Gleichzeitig bringen diese Ergebnisse einen erneuten Beweis für die Richtigkeit der Konzentrationsbestimmungen. Die Konzentration der Sexualstoffe beträgt also  $3 \cdot 10^{-3} \gamma$ — $2 \cdot 10^{-3} \gamma$  in 1 ccm, es liegen gesättigte wäßrige Lösungen vor.

Tabelle 12.

Wirksamkeit von cis/K<sub>0</sub>-Gemischen verschiedener Konzentration.

cis-Crocetindimethyl- ester 3·10 <sup>-4</sup> γ in 1 ccm	K <sub>0</sub> -Filtrat	Biologische Wirksamkeit
3 ccm	+ 1 ccm	—
10 "	+ 1 "	—
30 "	+ 1 "	weiblich
1 "	+ 3 "	—
10 "	+ 3 "	männlich

## c) Chemotaxis reaktionsloser Dunkelzellen.

## 1. Zucker.

Es sollen die in Tab. 1 angegebenen Zucker auf ihre chemotaktische Wirksamkeit geprüft werden. Zunächst wurden sämtliche Zucker in 1proz. Lösung verwendet. Die Zellen befanden sich in einer 0,0001proz. Crocinlösung. Deutlich chemotaktisch waren bei *Chl. eugametos*, *Chl. dresdensis* und *Chl. Braunii*: d-Glucose, Gentiobiose, Cellobiose, Maltose, Lactose, Saccharose, Raffinose, Cellotriose. Unwirksam waren l-Arabinose, d-Ribose, d-Xylose, d-Mannose, d-Galactose, d-Fructose und l-Sorbose. Also gerade die Zucker sind in 1proz. Lösung wirkungslos, die keinen Einfluß auf die Beweglichkeit haben. Dagegen sind die Zucker, in deren Lösungen die Zellen im Dunkeln beweglich werden, deutlich chemotaktisch wirksam. Ob andere Konzentrationen der chemotaktisch unwirksamen Zucker wirksam sein können, ist noch nicht untersucht worden. PRINGSHEIM und MAINX (1926) prüften an *Polytoma uvella* Glucose, Galactose, Fructose und Saccharose auf ihre chemotaktische Wirkung. Diese Zucker waren jedoch wirkungslos.

Um den Schwellenwert der wirksamen Zucker festzustellen, wurden molare Lösungen hergestellt und daraus dann m/10 = 10<sup>-1</sup> m, m/100 = 10<sup>-2</sup> m, m/1000 = 10<sup>-3</sup> m usw. Die Ergebnisse sind in Tab. 13 zusammengestellt. Als Schwellenwert wird die Konzentration angegeben, bei der noch chemotaktische Ansammlung zu beobachten ist. Bei der nächst niederen Konzentration ist keine Chemotaxis mehr festzustellen. Der eigentliche Schwellenwert wird daher zwischen diesen beiden Werten liegen. Auf seine genauere Bestimmung wurde verzichtet. Alle 3 Arten verhalten sich gegen d-Glucose gleich. Der Schwellenwert liegt bei 10<sup>-3</sup> m. Für Saccharose liegt der Schwellenwert bei 1 m. Saccharose und d-Glucose haben also bei allen 3 Arten deutlich verschiedene Schwellenwerte.

Tabelle 13.

Chemotaktische Wirkung verschieden molarer Zuckerlösungen auf *Crocindunkelzellen*.

		<i>Chl. eugametos f. simplex</i>		<i>Chl. dresdensis</i>	<i>Chl. Braunii</i>	
		♀	♂		♀	♂
d-Glucose	10 <sup>-1</sup> m	x	x	x	x	x
	10 <sup>-2</sup> m	x	x	x	x	x
	10 <sup>-3</sup> m	x	x	x	x	x
	10 <sup>-4</sup> m	o	o	o	o	o
	10 <sup>-5</sup> m	o	o	o	o	o
Gentiobiose	10 <sup>-2</sup> m	x	x	o	o	o
	10 <sup>-3</sup> m	x	x	o	o	o
	10 <sup>-4</sup> m	x	x	o	o	o
	10 <sup>-5</sup> m	o	o	o	o	o
	10 <sup>-1</sup> m	x	x	x	x	x
Cellobiose	10 <sup>-2</sup> m	o	o	x	x	x
	10 <sup>-3</sup> m	o	o	x	o	o
	10 <sup>-4</sup> m	o	o	x	o	o
	10 <sup>-5</sup> m	o	o	o	o	o
	10 <sup>-1</sup> m	x	x	x	x	x
Cellotriose	10 <sup>-2</sup> m	o	o	x	x	x
	10 <sup>-3</sup> m	o	o	o	x	x
	10 <sup>-4</sup> m	o	o	o	x	x
	10 <sup>-5</sup> m	o	o	o	o	o
	m	x	x	x	x	x
Saccharose	10 <sup>-1</sup> m	o	o	o	o	o
	10 <sup>-2</sup> m	o	o	o	o	o
	10 <sup>-3</sup> m	o	o	o	o	o

Gentiobiose, Cellobiose und Cellotriose verhalten sich anders. Für *eugametos* liegen die Schwellenwerte der 3 Zucker bei 10<sup>-4</sup> m, 10<sup>-1</sup> m, 10<sup>-1</sup> m. Gentiobiose ist also der wirksamste Zucker. Bei *dresdensis* sind die 3 Werte: 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-2</sup> m. Hier ist Cellobiose der wirksamste Zucker, dann folgen Cellotriose und Gentiobiose. Die Werte für *Braunii* sind: 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup> m. Die Cellotriose ist am wirksamsten. Die in stärkster molarer Verdünnung chemotaktisch wirkenden Zucker sind bei den verschiedenen Chlamydomonasarten in jedem Falle identisch mit denjenigen, die in kürzester Zeit die Beweglichkeit der betreffenden Zellen bedingen (vgl. Tab. 1): für *eugametos* Gentiobiose, für *dresdensis* Cellobiose, für *Braunii* Cellotriose. Die für die Beweglichkeit günstigsten Zucker nehmen also auch bei den Chemotaxis-Versuchen eine Sonderstellung ein.

Daß molare Lösungen (z. B. von Saccharose) wirksam sein können, haben PRINGSHEIM und MAINX (1926) an *Polytoma uvella* festgestellt. Sie fanden, daß für Methylalkohol der Schwellenwert bei der molaren Lösung liegt. Außerdem geben PRINGSHEIM und MAINX an, daß z. B. 20 Proz. Saccharose- oder gesättigte NaCl-

Lösungen, die als Anlockungsmittel 1/10 mol. Natriumacetat enthalten, positive Chemotaxis hervorrufen. Da bei *Chlamydomonas* bestimmte Zucker als Chemotaktikum wirken, ist es nicht verwunderlich, daß selbst molare Lösungen wirksam sind. Osmotaxis konnte auch ich nicht beobachten. Die von PRINGSHEIM und MAINX an *Polytoma* gemachten Beobachtungen gelten also auch für *Chlamydomonas*.

## 2. Crocin.

Es war von Interesse, die chemotaktische Wirkung des Crocins selbst festzustellen. Bringt man unbegeißelte Zellen in Crocinlösungen, so werden die Zellen der Lösung eine gewisse Zahl von Crocinmolekeln entziehen, um beweglich zu werden. Wie hoch nachher die Zahl der Molekeln in der die Zellen umgebenden Lösung noch ist, können wir nicht sagen. Bringen wir Zellen in eine 0,0001proz. Crocinlösung und füllen wir die Kapillaren mit einer Crocinlösung der gleichen Konzentration, so stellen wir fest, daß die Zellen nicht chemotaktisch angelockt werden. Erhöhen wir die Konzentration in den Kapillaren, so wird bei einer bestimmten Konzentration eine chemotaktische Anlockung nachweisbar sein. Diesen Schwellenwert gilt es festzustellen.

Tabelle 14.

Die chemotaktische Wirkung von Crocinlösungen auf Crocindunkelzellen.

Außenlösung enthält 0,4 mg Crocin in ccm Wasser	Schwellenwerte gegen 0,4 mg Crocin in Kubikzentimeter Wasser			
	<i>Chl. eugametos</i> f. <i>simplex</i>	<i>Chl. f. synoica</i>	<i>Chl. dresdensis</i>	<i>Chl. Braunii</i>
10 <sup>11</sup>	10 <sup>7</sup>	(unbeweglich)	(unbeweglich)	(unbeweglich)
10 <sup>10</sup>	10 <sup>6</sup>			
10 <sup>9</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	"	"
10 <sup>8</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	"	"
10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	"
10 <sup>6</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>2</sup>	10	"
10 <sup>5</sup>	10	10	1	1
10 <sup>4</sup>	1	1	—	—
10 <sup>3</sup>	—	—	—	—
10 <sup>2</sup>	—	—	—	—

Bei den in Tab. 14 wiedergegebenen Versuchen wurden die Zellen in verschiedene Crocinlösungen gebracht und zwar wurde ausgegangen von einer Lösung, die 0,4 mg Crocin in 100 ccm Wasser enthielt. Dann wurde auf 0,4 mg in 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup>, 10<sup>10</sup>, 10<sup>11</sup> ccm Wasser verdünnt. Es standen also Crocin-Dunkelzellen zur Verfügung, die sich in 10 Lösungen von fallendem Crocin-gehalt befanden. Diese dienten als Außenlösungen. Als Chemo-

taktika wurden ebenfalls 10 verschiedene Crocinlösungen verwendet, bei denen 0,4 mg Crocin in  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$  ccm Wasser gelöst waren. Das Ergebnis mit *eugametos*-Zellen war: eine chemotaktische Anlockung erfolgt erst dann, wenn der Konzentrationsunterschied zwischen Chemotaktikum und Außenlösung 4 Zehnerpotenzen beträgt. Sind z. B. die Zellen in einer Lösung von 0,4 mg Crocin in  $10^{11}$  ccm Wasser, dann muß das Chemotaktikum 0,4 mg Crocin in  $10^7$  ccm Wasser enthalten. Enthält es nur 0,4 mg in  $10^8$  ccm Wasser, so erfolgt keine Anlockung. Bei *dresdensis* muß der Konzentrationsunterschied zwischen Kapillare und Außenlösung 5 und bei *Braunii* sogar 6 Zehnerpotenzen betragen.

Diese Unterschiedsschwellen von 10000, 100000 und 1000000 erscheinen bemerkenswert hoch. PRINGSHEIM und MAINX (1926) fanden Werte von 5—6 bei *Polytoma uvella*.

### 3. Sonstige Verbindungen.

Es wurden die in Abschnitt II f angeführten organischen Verbindungen auf ihre chemotaktische Wirksamkeit geprüft. Diese Versuche sind noch nicht abgeschlossen, da noch eine Reihe weiterer Verbindungen zu prüfen ist. Es sollen hier nur die wirksamen und unwirksamen Verbindungen gegenübergestellt werden (ohne Angabe der Schwellenwerte). Chemotaktisch wirksam sind: Methylalkohol, Äthylalkohol, n-Propylalkohol, Isopropylalkohol, n-Butylalkohol, tert. Butylalkohol, Isoamylalkohol, tert. Amylalkohol, Acetaldehyd, Aceton, Äthyläther, Essigsäure, Natriumacetat, Natriumpropionat, Milchsäure, Natriumlactat, d, l- $\alpha$ -Alanin, Acetamid, Kresol, Benzol, Toluol, Xylol, cis-Bixin, trans-Bixin, Azafrin, Azafrinmethylester. Chemotaktisch ohne Wirkung sind: Allylalkohol, Glycerin, Dulcit, Mannit, Benzylalkohol, Formaldehyd, Natriumformiat, Oxalsäure, Natriumoxalat, Malonsäure, Kaliumsuccinat, Äpfelsäure, Zitronensäure, tert. Natriumzitat, Glykokoll, Asparagin, Formamid, Glyoxal, Chloralhydrat, Phenol, Hydrochinon, Pikrinsäure, Chloroform, ferner die in Abschnitt II f angeführten anorganischen Salze.

### 4. cis- und trans-Crocetindimethylester.

Die Zellen, die sich im Dunkeln in einer 0,0001proz. Crocinlösung befinden, sind beweglich; sie vermögen aber nicht zu kopulieren, da sie weder cis- noch trans-Crocetindimethylester ausscheiden. Es war zu prüfen, welche chemotaktische Wirkung cis- und trans-Crocetindimethylester und deren Mischungen haben. Untersucht wurden Zellen von *Chl. eugametos* f. *simplex*, *Chl. dresdensis* und *Chl.*

*Braunii*. Die Ergebnisse sind in Tab. 15 wiedergegeben. Die Zellen aller 3 Arten sind gegen alle cis/trans-Mischungen deutlich chemotaktisch. Es ist gleichgültig, ob es sich um

Tabelle 15.

Chemotaktische Wirkung verschiedener Mischungen von cis- und trans-Crocetin-dimethylester auf Crocindunkelzellen.

cis/trans-Mischung		<i>Chl. eugametos f. simplex</i>		<i>Chl. dresdensis</i>	<i>Chl. Braunii</i>	
cis	trans	♀	♂		♀	♂
100	0	x	x	x	x	x
95	5	x	x	x	x	x
90	10	x	x	x	x	x
85	15	x	x	x	x	x
80	20	x	x	x	x	x
75	25	x	x	x	x	x
70	30	x	x	x	x	x
65	35	x	x	x	x	x
60	40	x	x	x	x	x
55	45	x	x	x	x	x
50	50	x	x	x	x	x
45	55	x	x	x	x	x
40	60	x	x	x	x	x
35	65	x	x	x	x	x
30	70	x	x	x	x	x
25	75	x	x	x	x	x
20	80	x	x	x	x	x
15	85	x	x	x	x	x
10	90	x	x	x	x	x
5	95	x	x	x	x	x
0	100	x	x	x	x	x

weibliche oder männliche Dunkelzellen handelt. Jeder Versuch ist dreimal ausgeführt worden, d. h. er gründet sich auf 45—60 Einzelbeobachtungen, wie aus Tab. 16 für 100/0, 50/50 und 0/100 zu ent-

Tabelle 16.

+ = positive Chemotaxis, ± = nur schwache Ansammlungen, — = keine Ansammlungen vor und in der Kapillare.

	100/0	50/50	0/100		100/0	50/50	0/100
1	+	±	+	11	+	+	+
2	+	±	+	12	+	+	+
3	±	+	+	13	+	+	+
4	+	+	+	14	—	+	+
5	+	+	+	15	+	+	+
6	+	+	+	16	+	+	—
7	+	+	+	17	+	+	+
8	±	+	—	18	+	+	+
9	+	+	+	19	+	+	+
10	+	+	+	20	+	+	+

nehmen ist. Die beiden Ester wurden als gesättigte wässrige Lösungen (vgl. Abschnitt III b) angewandt. Die Berechnung ergibt, daß es sich um etwa  $10^{-8}$  molare Lösungen handelt.

Um den Schwellenwert von cis- und trans-Crocetindimethylester zu bestimmen, wurden von der  $10^{-8}$  molaren Lösung weitere Verdünnungen hergestellt und diese als Chemotaktikum gegen Crocin-dunkelzellen verwendet. Wie aus Tab. 17 hervorgeht, liegt der

Tabelle 17.

Chemo- taktikum	<i>Chl. eugametos</i>				<i>Chl.</i>	
	<i>f. typica</i>	<i>f. simplex</i>	<i>f. synoica</i>	<i>f. subheteroica</i>	<i>dresdensis</i>	<i>Braunii</i>
$10^{-8}$ m	×	×	×	×	×	×
$10^{-9}$ m	×	×	×	×	×	×
$10^{-10}$ m	×	×	×	×	×	×
$10^{-11}$ m	×	×	×	×	×	×
$10^{-12}$ m	×	×	×	×	×	×
$10^{-13}$ m	×	×	×	×	×	×
$10^{-14}$ m	×	×	×	×	×	×
$10^{-15}$ m	—	—	—	—	—	—
$10^{-16}$ m	—	—	—	—	—	—

Schwellenwert bei  $10^{-14}$  Mol/Liter. Cis- und trans-Crocetindimethylester haben also eine außerordentliche Wirkung. PRINGSHEIM und MAINX (1926) fanden für *Polytoma uvella* Triolein als wirksamste Verbindung. Noch in  $10^{-9}$  molarer Lösung war sie chemotaktisch wirksam. Bei *Chlamydomonas* liegt der Schwellenwert der wirksamsten Verbindung 5 Zehnerpotenzen niedriger:  $10^{-14}$  mol. Das ist eine Konzentration, die nicht mehr die Kopulationsfähigkeit reaktionsloser Zellen bedingt.

### 5. Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Crocindunkelzellen sind gegen alle diejenigen Zucker chemotaktisch, die im Dunkeln und unter aeroben Bedingungen Beweglichkeit bewirken. Die auf die Beweglichkeit am günstigsten wirkenden Zucker haben den niedrigsten Schwellenwert.

2. Crocindunkelzellen sind gegen sämtliche Mischungen von cis- und trans-Crocetindimethylester deutlich chemotaktisch. Die Schwellenwerte für beide Ester liegen bei  $10^{-14}$  mol.

3. Crocindunkelzellen sind auch gegen Crocinlösungen chemotaktisch. Dabei muß das Chemotaktikum bei *Chl. eugametos* 10 000 mal, bei *Chl. dresdensis* 100 000 mal, bei *Chl. Braunii* 1 000 000 mal konzentrierter sein als die Außenlösung, in der sich die Zellen befinden.



## d) Die Chemotaxis der reaktionsfähigen Gameten.

## 1. Die untersuchten Rassen und Arten.

In der Arbeit über relative Sexualität (MOEWUS, 1939) ist gezeigt worden, daß die Gameten der einzelnen Rassen und Arten nur bei bestimmten cis/trans-Mischungen kopulationsfähig werden, und daß die Gametenfiltrate auch aus diesen bestimmten Mischungen zusammengesetzt sind. In Tab. 19 sind die untersuchten Rassen und Arten mit ihren bestimmten cis/trans-Mischungen zusammengestellt.

Tabelle 19.

Übersicht über die 8 heterözischen Gametensorten (vgl. MOEWUS 1938 b).

Art bzw. Rasse	Gametenvalenz	cis/trans-Zusammensetzung der Sexualstoffe	Realisatoren
<i>Chl. Braunii</i>	4	95/5	F <sup>4</sup>
	4	5/95	M <sup>4</sup>
<i>Chl. eugametos f. typica</i>	3	85/15	F <sup>3</sup>
	3	15/85	M <sup>3</sup>
<i>Chl. eugametos f. simplex</i>	2	75/25	F <sup>2</sup>
	2	25/75	M <sup>2</sup>
Neuzüchtung	1	65/35	F <sup>1</sup>
Neuzüchtung	1	35/65	M <sup>1</sup>

## 2. Die Chemotaxis der Gameten gegen verschiedene cis/trans-Mischungen.

Crocindunkelzellen werden im Dunkeln mit den bestimmten cis/trans-Mischungen behandelt. Nach etwa 10 Minuten wird festgestellt, ob die Zellen kopulationsfähig geworden sind. Ist das der Fall, dann können Chemotaxisversuche ausgeführt werden. Diese müssen im Dunkeln vorgenommen werden. Denn bei Bestrahlung mit blauem und violetter Licht wird cis- in trans-Crocetindimethylester umgewandelt. Das muß aber gerade vermieden werden. Bei rotem Licht wird cis-Crocetindimethylester gebildet. Auch das könnte die Ergebnisse beeinträchtigen. Es mußten also, wie in der Methodik angegeben, auch hier zahlreiche Objektträger zum Versuch angesetzt werden. Die Ergebnisse sind in Tab. 20 wiedergegeben. Die ♀<sup>4</sup>-Gameten in 95/5 cis/trans-Mischung sind chemotaktisch gegen 76/24—0/100 cis/trans-Mischungen, die ♀<sup>3</sup>-Gameten in 85/15 gegen 66/34—0/100, die ♀<sup>2</sup>-Gameten in 75/25 gegen 100/0—94/6 und 56/44—0/100, die ♀<sup>1</sup>-Gameten in 65/35 gegen 100—84/16 und 46/54—0/100, die ♂<sup>1</sup>-Gameten in 35/65 gegen 100/0—54/46 und 16/84—0/100, die ♂<sup>2</sup>-Gameten in 25/75 gegen 100/0—44/56 und 6/94—0/100, die ♂<sup>3</sup>-Gameten in 18/85 gegen 100/0—34/66, die ♂<sup>4</sup>-

Tabelle 20.

Die chemotaktische Wirkung verschiedener cis/trans-Mischungen auf reaktionsfähige Gameten.

cis	trans	♀ <sup>4</sup> 95/5	♀ <sup>3</sup> 85/15	♀ <sup>2</sup> 75/25	♀ <sup>1</sup> 65/35	♂ <sup>1</sup> 35/65	♂ <sup>2</sup> 25/75	♂ <sup>3</sup> 15/85	♂ <sup>4</sup> 5/95
100	0	—	—	—	×	×	×	×	×
99	1	—	—	—	×	×	×	×	×
98	2	—	—	—	×	×	×	×	×
97	3	—	—	—	×	×	×	×	×
96	4	—	—	—	×	×	×	×	×
95	5	—	—	—	×	×	×	×	×
94	6	—	—	—	×	×	×	×	×
93	7	—	—	—	×	×	×	×	×
92	8	—	—	—	×	×	×	×	×
91	9	—	—	—	×	×	×	×	×
90	10	—	—	—	×	×	×	×	×
89	11	—	—	—	×	×	×	×	×
88	12	—	—	—	×	×	×	×	×
87	13	—	—	—	×	×	×	×	×
86	14	—	—	—	×	×	×	×	×
85	15	—	—	—	×	×	×	×	×
84	16	—	—	—	×	×	×	×	×
83	17	—	—	—	—	×	×	×	×
82	18	—	—	—	—	×	×	×	×
81	19	—	—	—	—	×	×	×	×
80	20	—	—	—	—	×	×	×	×
79	21	—	—	—	—	×	×	×	×
78	22	—	—	—	—	×	×	×	×
77	23	—	—	—	—	×	×	×	×
76	24	×	—	—	—	×	×	×	×
75	25	×	—	—	—	×	×	×	×
74	26	×	—	—	—	×	×	×	×
73	27	×	—	—	—	×	×	×	×
72	28	×	—	—	—	×	×	×	×
71	29	×	—	—	—	×	×	×	×
70	30	×	—	—	—	×	×	×	×
69	31	×	—	—	—	×	×	×	×
68	32	×	—	—	—	×	×	×	×
67	33	×	—	—	—	×	×	×	×
66	34	×	×	—	—	×	×	×	×
65	35	×	×	—	—	×	×	×	×
64	36	×	×	—	—	×	×	×	×
63	37	×	×	—	—	×	×	×	×
62	38	×	×	—	—	×	×	×	×
61	39	×	×	—	—	×	×	×	×
60	40	×	×	—	—	×	×	×	×
59	41	×	×	—	—	×	×	×	×
58	42	×	×	—	—	×	×	×	×
57	43	×	×	—	—	×	×	×	×
56	44	×	×	×	—	×	×	×	×
55	45	×	×	×	—	×	×	×	×
54	46	×	×	×	—	×	×	×	×
53	47	×	×	×	—	—	×	×	×
52	48	×	×	×	—	—	×	×	×
51	49	×	×	×	—	—	×	×	×
50	50	×	×	×	—	—	×	×	×
49	51	×	×	×	—	—	×	×	×

Tabelle 20 (Fortsetzung).

cis	trans	♀ <sup>4</sup> 95/5	♀ <sup>3</sup> 85/15	♀ <sup>2</sup> 75/25	♀ <sup>1</sup> 65/35	♂ <sup>1</sup> 35/65	♂ <sup>2</sup> 25/75	♂ <sup>3</sup> 15/85	♂ <sup>4</sup> 5/95
48	52	×	×	×	—	—	×	×	×
47	53	×	×	×	—	—	×	×	×
46	54	×	×	×	×	—	×	×	×
45	55	×	×	×	×	—	×	×	×
44	56	×	×	×	×	—	×	×	×
43	57	×	×	×	×	—	×	×	×
42	58	×	×	×	×	—	×	×	×
41	59	×	×	×	×	—	×	×	×
40	60	×	×	×	×	—	×	×	×
39	61	×	×	×	×	—	×	×	×
38	62	×	×	×	×	—	×	×	×
37	63	×	×	×	×	—	×	×	×
36	64	×	×	×	×	—	×	×	×
35	65	×	×	×	×	—	×	×	×
34	66	×	×	×	×	—	×	×	×
33	67	×	×	×	×	—	×	×	×
32	68	×	×	×	×	—	×	×	×
31	69	×	×	×	×	—	×	×	×
30	70	×	×	×	×	—	×	×	×
29	71	×	×	×	×	—	×	×	×
28	72	×	×	×	×	—	×	×	×
27	73	×	×	×	×	—	×	×	×
26	74	×	×	×	×	—	×	×	×
25	75	×	×	×	×	—	×	×	×
24	76	×	×	×	×	—	×	×	×
23	77	×	×	×	×	—	×	×	—
22	78	×	×	×	×	—	×	×	—
21	79	×	×	×	×	—	×	×	—
20	80	×	×	×	×	—	×	×	—
19	81	×	×	×	×	—	×	×	—
18	82	×	×	×	×	—	×	×	—
17	83	×	×	×	×	—	×	×	—
16	84	×	×	×	×	×	×	×	—
15	85	×	×	×	×	×	×	×	—
14	86	×	×	×	×	×	×	×	—
13	87	×	×	×	×	×	×	×	—
12	88	×	×	×	×	×	×	×	—
11	89	×	×	×	×	×	×	×	—
10	90	×	×	×	×	×	×	×	—
9	91	×	×	×	×	×	×	×	—
8	92	×	×	×	×	×	×	×	—
7	93	×	×	×	×	×	×	×	—
6	94	×	×	×	×	×	×	×	—
5	95	×	×	×	×	×	×	×	—
4	96	×	×	×	×	×	×	×	—
3	97	×	×	×	×	×	×	×	—
2	98	×	×	×	×	×	×	×	—
1	99	×	×	×	×	×	×	×	—
0	100	×	×	×	×	×	×	×	—

Gameten gegen 100/0—24/76. Das heißt also: beträgt der cis/trans-Unterschied 18/18 oder ist er kleiner als 18/18, dann findet keine chemotaktische Anlockung statt. Wird er 19/19 und größer, dann

erfolgt eine chemotaktische Reaktion. In Tab. 21 sind die Ergebnisse übersichtlich zusammengestellt. Auf die Bedeutung wird später näher eingegangen werden.

Tabelle 21.

Zusammenfassung aus Tabelle 20. Die wirksamen und unwirksamen Mischungen sowie die Differenzen.

1	2	3	4	5	6
Gamet	Außenlösung	Chemotaktisch unwirksame Mischungen	Unterschiede der cis/trans-Mischungen von Spalte 2 u. 3	Chemotaktisch wirksame Mischungen	Unterschiede der cis/trans-Mischungen von Spalte 2 u. 5
$\begin{matrix} \text{O}^4 \\ \text{O}^3 \\ \text{O}^2 \\ \text{O}^1 \\ \text{O}^0 \\ \text{O}^1 \\ \text{O}^2 \\ \text{O}^3 \\ \text{O}^4 \end{matrix}$	95/5	100/0—77/23	5/5—0 0—18/18	76/24—0/100	19/19—95/95
	85/15	100/0—67/33	15/15—0 0—18/18	66/34—0/100	19/19—85/85
	75/25	93/7—57/23	18/18—0 0—18/18	100/0—94/6 56/24—0/100	25/25—19/19 19/19—75/75
	65/35	83/17—47/43	18/18—0 0—18/18	100/0—84/16 46/54—0/100	35/35—19/19 19/19—65/65
	35/65	53/47—17/83	18/18—0 0—18/18	100/0—54/46 16/84—0/100	65/65—19/19 19/19—35/35
	25/75	43/57—7/93	18/18—0 0—18/18	100/0—44/56 6/94—0/100	75/75—19/19 19/19—25/25
	15/85	33/67—0/100	18/18—0 0—15/15	100/0—34/66	85/85—19/19
	5/95	23/77—0/100	18/18—0 0—5/5	100/0—24/76	95/95—19/19

### 3. Die Chemotaxis der Gameten gegen verschiedene Gametenfiltrate.

Wenn die reaktionsfähigen Gameten gegen cis/trans-Mischungen der Crocetin-dimethylester chemotaktisch sind, dann müssen auch Gametenfiltrate eine chemotaktische Wirkung haben. Früher ist angegeben worden (Moëwus, 1933, p. 490), daß Chemotaxisversuche mit Kapillaren keinen Erfolg gehabt haben. Damals war die starke Lichtempfindlichkeit der Sexualstoffe nicht beachtet worden. Führt man die Versuche am Licht aus, dann wird ja dauernd cis-Ester in trans-Ester umgewandelt. Die jetzt im Dunkeln ausgeführten Versuche zeigten dagegen positive Effekte. Die Ergebnisse sind in Tab. 22 zu sehen. Sind die Unterschiede 0/0 oder 10/10, dann erfolgt keine chemotaktische Anlockung. Sind die Unterschiede

Tabelle 22.

Die chemotaktische Wirksamkeit von Gametenfiltraten gegen reaktionsfähige Gameten.

Filtrat aus	cis/trans	♀ <sup>4</sup> Diff.	♀ <sup>3</sup> Diff.	♀ <sup>2</sup> Diff.	♀ <sup>1</sup> Diff.	♂ <sup>1</sup> Diff.	♂ <sup>2</sup> Diff.	♂ <sup>3</sup> Diff.	♂ <sup>4</sup> Diff.
♀ <sup>4</sup>	95/5	— 0/0	— 10/10	x 20/20	x 30/30	x 60/60	x 70/70	x 80/80	x 90/90
♀ <sup>3</sup>	85/15	— 10/10	— 0/0	— 10/10	x 20/20	x 50/50	x 60/60	x 70/70	x 80/80
♀ <sup>2</sup>	75/25	x 20/20	— 10/10	— 0/0	— 10/10	x 40/40	x 50/50	x 60/60	x 70/70
♀ <sup>1</sup>	65/35	x 30/30	x 20/20	— 10/10	— 0/0	x 30/30	x 40/40	x 50/50	x 60/60
♂ <sup>1</sup>	35/65	x 60/60	x 50/50	x 40/40	x 30/30	— 0/0	— 10/10	x 20/20	x 30/30
♂ <sup>2</sup>	25/75	x 70/70	x 60/60	x 50/50	x 40/40	— 10/10	— 0/0	— 10/10	x 20/20
♂ <sup>3</sup>	15/85	x 80/80	x 70/70	x 60/60	x 50/50	x 20/20	— 10/10	— 0/0	— 10/10
♂ <sup>4</sup>	5/95	x 90/90	x 80/80	x 70/70	x 60/60	x 30/30	x 20/20	— 10/10	— 0/0

20/20, 30/30, 40/40, 50/50, 60/60, 70/70, 80/80, 90/90, dann beobachten wir stets eine deutliche chemotaktische Anlockung. Auf die große Bedeutung dieser Ergebnisse wird später näher eingegangen werden.

#### 4. Die Geschwindigkeit der chemotaktischen Reaktion.

Es wurde geprüft, ob Unterschiede in der Geschwindigkeit der chemotaktischen Reaktion bei den verschiedenen cis/trans-Unterschieden von 20/20—90/90 festzustellen sind. Hierzu müssen wir etwas näher auf den Verlauf der chemotaktischen Reaktion eingehen. Wie schon im Abschnitt IIIa ausgeführt worden ist, befindet sich die Glaskapillare mit dem Chemotaktikum am linken Rand des Tropfens auf dem hohlgeschliffenen Objektträger. Die Gameten werden auf der rechten Seite vom Rande her zugegeben und zwar so vorsichtig, daß durch das Zugeben die Gameten nicht über die Mitte des Tropfens geraten. Sie bewegen sich nun nach allen Richtungen weiter, zunächst rein zufallsgemäß. Gelangt nun ein Gamet in die Nähe des Kapillarenrandes, so wird er angezogen. Es stellte sich heraus, daß sich bei stärksten cis/trans-Unterschieden in kürzester Zeit eine große Zahl von Gameten an der Kapillarenöffnung ansammelt. Ist aber der cis/trans-Unterschied nur 20/20, dann schwimmt häufig ein Gamet, der sich in der Nähe der Kapillarenöffnung befindet, wieder fort. Es dauert dann sehr lange, bis etwa 20 Zellen vor der Öffnung angesammelt sind. Wir können nun feststellen, nach welcher Zeit eine bestimmte Zellzahl, die wir ein für allemal festsetzen, vor der Kapillarenöffnung versammelt ist. Als Einheit werden 18—22 Zellen angenommen. Bei diesen Versuchen waren folgende Vorbedingungen erfüllt: Alle Kulturen waren gleich alt; die Zellen wurden von Agar in destilliertes Wasser übertragen und dann mit blauem und violetter Licht (Quecksilberhochdrucklampe, Hg-Linien 4358 und 4961 Å) bestrahlt; der Abstand von der Lampe betrug 30 cm. Nach dreistündiger Belichtung wurden aus den Lösungen Gametenfiltrate hergestellt. Der Tropfen, den die Algen zu durchschwimmen hatten, war stets gleich groß. Gleich groß waren außerdem: die Weite der Kapillaren, in die das Chemotaktikum kam und die zugesetzte Gametenmenge. Die Versuche wurden im Dunkeln ausgeführt. Dazu war es notwendig, zu jedem Versuch eine größere Zahl von Objektträgern anzusetzen. In bestimmten Zeitabständen, die in Vorversuchen festgestellt waren, wurden die Objektträger gemustert. Es sind folgende drei Fälle möglich: 1. die Ansammlung beträgt noch nicht 18 Zellen, 2. sie besteht aus 18—22 Zellen, 3. die Zahl ist größer als 22 Zellen.

Für die Bestimmungen der Zeiten kamen nur die zweiten Beobachtungen in Frage. In den Vorversuchen wurde nach einer bestimmten Zeit, z. B. 30 Sekunden, der erste Objektträger gemustert: 12 Zellen hatten sich angesammelt. Der zweite Objektträger wurde nach 1 Minute durchgesehen: über 25 Zellen waren vorhanden. Der dritte Objektträger wurde daher nach 45 Sekunden beobachtet; die Zellzahl betrug 19 usw. Auf diese Weise können wir die Zeit einigermaßen genau bestimmen, nach der vor der Kapillarenöffnung etwa 20, d. h. 18—22 Zellen angesammelt sind. Sie wird für diese Versuchsserie zwischen 40—55 Sekunden schwanken. Genauere Bestimmungen sind nicht möglich. Im Hauptversuch, der am gleichen Tage ausgeführt wurde, wurden im ganzen 20 Objektträger angesetzt. Wir wissen jetzt ungefähr, nach welcher Zeit die gewünschte Zelldichte vor der Kapillarenöffnung erreicht ist. Natürlich kommt es vor, daß nach 40 Sekunden nur 15 Zellen, nach 55 Sekunden 25 Zellen vorhanden sind. Diese Fälle scheidet aus. Wir erhalten schließlich 10—15 Einzelwerte und bilden daraus den Mittelwert. Die gefundenen Werte können naturgemäß nicht genau sein und sind mehr oder weniger großen Schwankungen unterworfen. Das zeigen die Ergebnisse eines Versuchs mit ♀<sup>4</sup>-Gameten (Tab. 23).

Tabelle 23.

Bestimmung der Geschwindigkeit der chemotaktischen Reaktion von ♀<sup>4</sup>-Gameten (in 95/5-Mischung) gegen folgende cis-trans-Mischungen: 5/95 (Unterschied 90/90), 15/85 (Unterschied 80/80), 25/75 (Unterschied 70/70), 35/65 (Unterschied 60/60), 45/55 (Unterschied 50/50), 55/45 (Unterschied 40/40), 65/35 (Unterschied 30/30), 75/25 (Unterschied 20/20).

cis/trans-Unterschied	Zeit, nach der vor der Kapillarenöffnung 18—22 Gameten angesammelt sind in Sekunden (Einzelversuche)	Mittelwert in Sekunden
90/90	25—25—30—30—30—30—30—35—35—35—35	31
80/80	30—30—35—35—35—35—40—40—40—40	36
70/70	30—35—35—35—40—40—40—40—45—45—45	39
60/60	40—40—45—45—45—45—45—50—50—50—55—55	47
50/50	60—60—60—60—60—65—65—65—70—70—70—75—75	66
40/40	80—85—90—90—90—90—95—100—105—105	93
30/30	140—150—155—155—160—160—160—175—175—180	161
20/20	200—210—210—210—220—230—240—240—240—240—240	227

Ob die ersten drei Mittelwerte von 31, 36 und 39 Sekunden gesichert sind, sei dahingestellt. Die letzten Werte mit 93, 161 und 227 Sekunden sind aber deutlich verschieden, sowohl untereinander als auch gegen die ersten Werte. Wir können aus den Ergebnissen schließen: je geringer der cis/trans-Unterschied ist, desto länger

Geschwindigkeit der chemotaktischen Reaktion. Angegeben sind die Mittel

cis/trans- Unterschied	♀ <sup>4</sup>		♀ <sup>3</sup>		♀ <sup>2</sup>		♀ <sup>1</sup>	
	Sekunden	n	Sekunden	n	Sekunden	n	Sekunden	n
90/90	31 $\begin{smallmatrix} +6 \\ -4 \end{smallmatrix}$	11	— —		— —		— —	
80/80	36 $\begin{smallmatrix} +6 \\ -4 \end{smallmatrix}$	10	34 $\begin{smallmatrix} +5 \\ -5 \end{smallmatrix}$	12	— —		— —	
70/70	39 $\begin{smallmatrix} +9 \\ -6 \end{smallmatrix}$	12	41 $\begin{smallmatrix} +8 \\ -6 \end{smallmatrix}$	14	42 $\begin{smallmatrix} +7 \\ -9 \end{smallmatrix}$	11	— —	
60/60	47 $\begin{smallmatrix} +7 \\ -8 \end{smallmatrix}$	14	49 $\begin{smallmatrix} +5 \\ -4 \end{smallmatrix}$	10	51 $\begin{smallmatrix} +7 \\ -3 \end{smallmatrix}$	11	48 $\begin{smallmatrix} +4 \\ -8 \end{smallmatrix}$	12
50/50	66 $\begin{smallmatrix} +6 \\ -9 \end{smallmatrix}$	15	70 $\begin{smallmatrix} +5 \\ -8 \end{smallmatrix}$	11	65 $\begin{smallmatrix} +6 \\ -8 \end{smallmatrix}$	12	71 $\begin{smallmatrix} +4 \\ -9 \end{smallmatrix}$	14
40/40	93 $\begin{smallmatrix} +13 \\ -12 \end{smallmatrix}$	11	97 $\begin{smallmatrix} +10 \\ -8 \end{smallmatrix}$	12	95 $\begin{smallmatrix} +7 \\ -9 \end{smallmatrix}$	15	94 $\begin{smallmatrix} +12 \\ -14 \end{smallmatrix}$	14
30/30	161 $\begin{smallmatrix} +21 \\ -19 \end{smallmatrix}$	10	170 $\begin{smallmatrix} +15 \\ -8 \end{smallmatrix}$	12	165 $\begin{smallmatrix} +16 \\ -10 \end{smallmatrix}$	10	160 $\begin{smallmatrix} +15 \\ -14 \end{smallmatrix}$	10
20/20	227 $\begin{smallmatrix} +27 \\ -13 \end{smallmatrix}$	12	235 $\begin{smallmatrix} +19 \\ -14 \end{smallmatrix}$	12	230 $\begin{smallmatrix} +18 \\ -10 \end{smallmatrix}$	11	238 $\begin{smallmatrix} +16 \\ -12 \end{smallmatrix}$	13

dauert es, bis 18—22 Zellen vor der Kapillarenöffnung angesammelt sind. In Tab. 24 sind die Ergebnisse, die mit allen acht Gameten-sorten erhalten worden sind, wiedergegeben, in Tab. 25 die Zusammenfassung der einzelnen Mittelwerte. Wir sehen, daß die letzten drei Werte mit den cis/trans-Unterschieden 40/40, 30/30 und 20/20 deutlich verschieden sind. Die Variationsbreiten grenzen sich

Tabelle 25.

Zusammenfassung der Ergebnisse aus Tabelle 24.

cis/trans- Unterschied	Zahl der Versuche	Mittelwert in Sek.	Schwankungs- breite (Sek.)
90/90	26	30	22— 37
80/80	48	35	29— 42
70/70	76	40	30— 51
60/60	96	50	40— 57
50/50	97	68	59— 80
40/40	95	96	80—109
30/30	92	167	140—180
20/20	99	233	200—254

deutlich voneinander ab. Auf diese drei Werte kommt es aber gerade an, wenn wir die Erscheinungen der relativen Sexualität erklären wollen. Darauf wird im nächsten Abschnitt näher eingegangen werden. Allgemein können wir sagen: je geringer die cis/trans-Unterschiede sind, desto langsamer geht die chemotaktische Anlockung vor sich. Dieser Satz gilt wenigstens für die cis/trans-Unterschiede 20/20, 30/30 und 40/40.

belle 24.

werte in Sekunden, die größten  $\pm$ -Abweichungen. n = Zahl der Einzelversuche.

$\sigma^1$		$\sigma^2$		$\sigma^3$		$\sigma^4$	
Sekunden	n	Sekunden	n	Sekunden	n	Sekunden	n
— —		— —		— —		29 $\frac{+7}{-8}$	15
— —		— —		35 $\frac{+3}{-4}$	11	34 $\frac{+5}{-8}$	15
— —		38 $\frac{+7}{-8}$	15	40 $\frac{+5}{-7}$	12	41 $\frac{+5}{-9}$	12
50 $\frac{+5}{-5}$	15	51 $\frac{+8}{-4}$	13	49 $\frac{+7}{-6}$	11	50 $\frac{+8}{-7}$	10
70 $\frac{+8}{-7}$	13	68 $\frac{+5}{-7}$	10	68 $\frac{+6}{-4}$	10	69 $\frac{+3}{-5}$	12
98 $\frac{+7}{-9}$	12	97 $\frac{+10}{-12}$	12	95 $\frac{+8}{-7}$	10	96 $\frac{+6}{-9}$	9
170 $\frac{+14}{-10}$	13	168 $\frac{+11}{-9}$	15	171 $\frac{+14}{-8}$	12	170 $\frac{+6}{-6}$	10
236 $\frac{+7}{-18}$	10	229 $\frac{+20}{-14}$	15	238 $\frac{+21}{-13}$	16	232 $\frac{+12}{-19}$	10

#### IV. Besprechung der Ergebnisse.

##### a) Das Chemotaxis-Problem.

Chemotaxis nennt man die Beeinflussung der Bewegungsrichtung frei beweglicher Organismen durch chemische Verbindungen. Die Methodik der Chemotaxisversuche geht auf die grundlegenden Untersuchungen von PFEFFER (1884, 1888) zurück. Er verwendete dünne Kapillaren, die mit dem Chemotaktikum gefüllt werden. Diese Kapillarmethode ist bisher fast ausschließlich benutzt worden (vgl. jedoch KUSANO, 1909). Die Konzentration des Chemotaktikums wird in der Regel in mol angegeben. Man kann nun durch Herstellung und Prüfung verschiedener Verdünnungsstufen die untere Grenzkonzentration feststellen, bei der noch eine deutliche Reaktion zu beobachten ist. Diese untere Grenzkonzentration bezeichnet man als Reizschwelle oder Schwellenwert. PRINGSHEIM und MAINX (1926) fanden für *Polytoma wella* Schwellenwerte, die bei verschiedenen Verbindungen zwischen  $1-10^{-9}$  mol. lagen. Cis- und trans-Crocetin-dimethylester wirken auf *Chlamydomonas*-Zellen sogar noch in einer Verdünnung von  $10^{-14}$  mol. Über das Zustandekommen der chemotaktischen Reaktion wissen wir recht wenig. So schreibt JOST im Handwörterbuch der Naturwissenschaften (1933, Bd. 8, p. 370): „Die Suszeption bei der Chemotaxis dürfte wohl allgemein an ein Eindringen des Chemotaktikums in das Protoplasma und chemische Einwirkungsmöglichkeit daselbst gebunden sein. Näheres ist aber nicht bekannt.“ METZNER (1923) betrachtet die Geißeln als reizaufnehmendes Organ und versucht die topische Reaktionsweise der Farnspermato-

zoiden zu erklären. Auch über die Gültigkeit des sog. WEBER-FECHNERSchen Gesetzes sind die Ansichten sehr geteilt (vgl. HARTMANN, 1933, p. 686). JOST (1933, p. 366) schreibt: „Es ist klar, daß das WEBERSche Gesetz nur eine beschränkte Gültigkeit haben kann; es dürfte weder bei ganz hohen noch bei ganz niederen Konzentrationen zutreffen.“ Die ungeklärte Lage des Chemotaxisproblems kommt auch in dieser Arbeit zum Ausdruck. Die vorliegenden Untersuchungen hatten als Ziel, festzustellen, ob die bei der Kopulation bestehenden cis/trans-Unterschiede auch für die chemotaktische Anlockung der Gameten verantwortlich zu machen sind. Die angeführten Versuche beweisen es eindeutig. Vielleicht sind gerade die *Chlamydomonas*-Arten geeignet, die noch offenen Fragen der Chemotaxis zu klären.

#### b) Die cis/trans-Chemotaxis.

Crocin-Dunkelzellen, die sich in einer Crocinlösung befinden, sind gegen wässrige Lösungen von cis- und trans-Crocetin-dimethylester sowie gegen alle möglichen Mischungen beider Ester chemotaktisch. Vorstufengameten, die sich in einer Lösung von Crocin und cis-Crocetindimethylester befinden, sind gegen eine wässrige Lösung von trans-Ester chemotaktisch. Außerdem bewirken cis/trans-Gemische von 80/20—5/95 deutliche Anlockung. Die kopulationsfähigen Gameten befinden sich je nach der Rasse in einer Außenlösung von 95/5, 85/15, 75/25, 65/35, 35/65, 25/75, 15/85, 5/95 cis/trans. Verwendet man als Chemotaktika verschiedene cis/trans-Gemische von 100/0—0/100, dann beobachtet man eine chemotaktische Reaktion nur dann, wenn der cis/trans-Unterschied zwischen Chemotaktikum und Außenlösung mindestens 19/19 beträgt. Ist der Unterschied nur 18/18, dann unterbleibt die Reaktion.

Dient z. B. als Chemotaktikum ein 95/5-Gemisch und befinden sich die Gameten in einer 75/25-Außenlösung, dann tritt eine chemotaktische Reaktion ein. Bei dem cis-Ester besteht zwischen Außenlösung und Kapillare ein ansteigendes Gefälle, bei dem trans-Ester ein absteigendes Gefälle. Wir haben zwei Gefälle verschiedener Richtung, die nicht zu Interferenz führen. Zu beachten ist, daß die Unterschiedsschwelle nur 1:1,27 beträgt und daß überhaupt kein Gefälle des osmotischen Drucks besteht!

Es ist daher nur möglich das verschiedene cis/trans-Verhältnis auf beiden Seiten für das Zustandekommen der chemotaktischen Reaktion verantwortlich zu machen. Wir befinden uns hier in

einem Gebiet, das bisher auch theoretisch noch nicht untersucht worden ist. Wir können nur die Aussage machen, daß im chemotaktischen Versuch, obwohl schon zu Beginn auf beiden Seiten die gleiche Farbstoffkonzentration (cis + trans) und damit gleicher osmotischer Druck herrscht, die Diffusion zum Ausgleich der Konzentrationen des cis- und des trans-Esters im Gesamtsystem treiben muß. Es herrscht also das Bestreben zur Erreichung eines Zustandes von höherer Wahrscheinlichkeit (Zunahme der Entropie) und dieses Bestreben ist sehr wahrscheinlich für die treibende Kraft der chemotaktischen Bewegung entscheidend.

### c) Sexualstoffe und Gruppenbildung.

Die einzelnen Gametensorten von *Chl. eugametos*, *Chl. dresdensis* und *Chl. Braunii* haben eine verschiedene Stärke oder Valenz. Auf Grund des Reaktionsverhaltens (Gruppenbildung) bei der Kombination der Gametensorten lassen sich überstarke, starke, mittelstarke und schwache weibliche sowie männliche Gameten unterscheiden. Die genetische Analyse hat ergeben, daß diese Unterschiede erblich sind und durch die Wirkung der Realisatoren F und M zustande kommen. Jede Gametensorte scheidet ein bestimmtes Gemisch von cis- und trans-Crocoetindimethylester aus. In Tab. 26 sind diese Ergebnisse

Tabelle 26.

Die Reaktion zwischen den 8 Gametensorten (vgl. Text).

	♀ <sup>4</sup>	♀ <sup>3</sup>	♀ <sup>2</sup>	♀ <sup>1</sup>	♂ <sup>1</sup>	♂ <sup>2</sup>	♂ <sup>3</sup>	♂ <sup>4</sup>
♀ <sup>4</sup>	—	10/10	20/20	30/30	60/60	70/70	80/80	90/90
♀ <sup>3</sup>	0	—	10/10	20/20	50/50	60/60	70/70	80/80
♀ <sup>2</sup>	1	0	—	10/10	40/40	50/50	60/60	70/70
♀ <sup>1</sup>	2	1	0	—	30/30	40/40	50/50	60/60
♂ <sup>1</sup>	3	3	3	2	—	10/10	20/20	30/30
♂ <sup>2</sup>	3	3	3	3	0	—	10/10	20/20
♂ <sup>3</sup>	3	3	3	3	1	0	—	10/10
♂ <sup>4</sup>	3	3	3	3	2	1	0	—

zusammengestellt. Die 3 Reaktionsstärken bei der Kombination der verschiedenen Gametensorten werden mit 1, 2 und 3 bezeichnet. Bei der Stärke 1 werden nur Kopulationspaare gebildet; es dauert in der Regel 4—5 Minuten, bis eine große Zahl von Kopulationspaaren zu beobachten ist. Bei der Stärke 2 werden kleine Gruppen gebildet, die aus 10—20 Zellen bestehen; maximale Gruppenbildung ist erst nach 1—2 Minuten deutlich erkennbar. Bei

der Stärke 3 endlich entstehen fast unmittelbar nach dem Zusammengeben der Gameten große Gruppen, die aus 100 und mehr Zellen zusammengesetzt sind. In Tab. 26 sind diese Reaktionsstärken eingetragen, außerdem auch die cis/trans-Unterschiede. Es ergibt sich daraus, daß bei einem cis/trans-Unterschied von 0/0 und 10/10 überhaupt keine Reaktion eintritt, bei einem Unterschied von 20/20 die Reaktionsstärke 1, bei 30/30 die Stärke 2, bei den übrigen Unterschieden von 40/40—90/90 die Stärke 3. Bisher ist angenommen worden (MOEWUS 1938 b, 1939), daß die Gruppenbildung, d. h. das Sichaufsuchen der Gameten zur Kopulation durch chemotaktische Anlockung bedingt ist. Die Chemotaxisversuche haben gezeigt, daß Anlockung nur stattfindet, wenn der cis/trans-Unterschied zwischen Chemotaktikum und Gameten (Außenlösung) mindestens 19/19 beträgt. Bei einem Unterschied von 0/0—18/18 erfolgt keine chemotaktische Reaktion. Das steht mit den in Tab. 25 wiedergegebenen Ergebnissen in Einklang. Die Chemotaxis-Zeit-Versuche haben aber außerdem ergeben, daß eine bestimmte Stärke der chemotaktischen Reaktion bei einem cis/trans-Unterschied von 20/20 erst in 200 bis 254 Sekunden erreicht wird, bei 30/30 schon nach 140—180 Sekunden, bei 40/40—90/90 bereits nach 22—109 Sekunden. Ähnliche zeitliche Unterschiede treten bei den verschiedenen Reaktionsstärken auch zu Tage, wie aus Tab. 27 hervorgeht.

Tabelle 27.

Die Reaktionsart bei der Kopulation (0 = keine Reaktion, 1 = Entstehung von Kopulationspaaren, nach 4—5 Minuten in genügender Zahl, 2 = kleine Gruppen, die nach 2—3 Minuten maximal zu beobachten sind, 3 = große Gruppen, die unmittelbar nach der Kombination entstehen) und die Zeit, in der eine bestimmte chemotaktische Reaktion erhalten wird (Tab. 25).

cis/trans-Unterschied	Reaktionsart bei der Kopulation	Zeit der chemotaktischen Reaktion (Tab. 25)
0,0	0	—
10/10	0	—
20/20	1	200—254 Sek.
30/30	2	140—180 „
40/40—90/90	3	22—109 „

Im vorstehenden haben wir eine Verknüpfung der cis/trans-Chemotaxis mit den Erscheinungen der Gruppenbildung versucht. Es hat sich dabei eine gewisse Parallelität ergeben. Man muß jedoch berücksichtigen, daß bei der Gruppenbildung beide Gametenarten in Bewegung sind, während ja bei den Chemotaxisversuchen

nur eine Gametensorte vorhanden ist. Eine eingehende Analyse der Gruppenbildung wäre noch auszuführen.

PRINGSHEIM und ONDRAČEK bringen in ihrer 1939 veröffentlichten Arbeit p. 125—126 und 132—137 Erörterungen über Sexualstoffe, Gruppenbildung und chemotaktische Anlockung. Sie beziehen sich vor allem auf die ersten, 1933 erschienenen Arbeiten über die Sexualstoffe von *Chlamydomonas eugametos*. Den beiden Autoren sind bei der Abfassung ihrer Arbeit die im Juli 1938 veröffentlichten Ergebnisse anscheinend noch unbekannt gewesen. Daher erübrigt es sich eigentlich, auf die Einwendungen der beiden Autoren gegen die von M. HARTMANN und von mir entwickelten Vorstellungen näher einzugehen. Nur einige Punkte sollten kurz besprochen werden. PRINGSHEIM und ONDRACEK verneinen die Frage, ob bei Isogametrie aus theoretischen Gründen zweierlei „Geschlechtsstoffe“ angenommen werden müssen. Nun ist jedoch 1933 von mir gezeigt worden, daß die weiblichen und männlichen Sexualstoffe bei Isogametrie nicht identisch sein können. Der grundlegende und beweiskräftige Versuch war folgender: Weibliche reaktionslose Dunkelzellen werden nur durch ein Filtrat aus weiblichen Gameten kopulationsfähig, männliche reaktionslose Dunkelzellen nur durch ein Filtrat aus männlichen Gameten. Niemals werden weibliche reaktionslose Dunkelzellen durch ein männliches Filtrat, männliche reaktionslose Dunkelzellen durch ein weibliches Filtrat kopulationsfähig. Es handelt sich hier also nicht um die Annahme von zwei Sexualstoffen, sondern um einen exakten biologischen Nachweis, daß tatsächlich weibliche und männliche Sexualstoffe verschieden sind. PRINGSHEIM und ONDRACEK ziehen dann die Angaben von JENNINGS heran, daß die Atmungskohlensäure bei *Paramaecium* und *Chilomonas* zu Gruppenbildungen führt. Diese Zusammenrottungen sind „als eine Art von ‚Atmungsfiguren‘ aufzufassen, die durch die Gegenwart von Bakterien verstärkt oder hervorgerufen werden.“ Ähnliche Ansammlungen mit Hilfe von Bakterien habe ich 1933 beschrieben. Jedoch hat sich dabei ergeben, daß Bakterien, die mit einem weiblichen Filtrat behandelt sind, immer nur auf männliche Gameten anlockend wirken, während Bakterien, die sich in einem männlichen Filtrat befinden, stets nur auf weibliche Gameten anlockend wirken. Filtrat-behandelte Bakterien wirken auf Gameten des gleichen Geschlechts niemals chemotaktisch. Daraus wurde dann gefolgert, daß weibliche und männliche Filtrate verschieden sein müssen. Es muß zugegeben werden, daß diese Bakterienversuche noch verschiedenartig gedeutet werden können; den Hauptbeweis für das Verhandensein von zwei

Sexualstoffen bildeten die oben geschilderten Versuche mit reaktionslosen Dunkelzellen. Chemotaxisversuche mit Kapillaren waren damals erfolglos, da die Versuche bei Tageslicht ausgeführt wurden. PRINGSHEIM und ONDRACEK schreiben dann u. a. „Wenn die beiden Geschlechtsstoffe sich gegenseitig binden und unwirksam machen, wie eine Säure und Base, wie kann dann eine gegenseitige Anlockung der zweierlei Gameten zustande kommen?“ In meiner Arbeit 1933, p. 513 heißt es aber nur: „Durch Vermischung geschlechtsverschiedener artgleicher Filtrate werden diese unwirksam.“ Das können wir heute ganz einfach erklären: Mischen wir eine 75/25 (weibliche) mit einer 25/75 (männliche) cis/trans-Mischung, dann erhalten wir eine unwirksame 50/50 Lösung. PRINGSHEIM und ONDRACEK gehen dann auf die relative Sexualität ein und erblicken in der Annahme relativer Sexualität und der Annahme nur zweier Geschlechter und Reizstoffe einen Widerspruch. Auch dieser ist jetzt restlos beseitigt. Es gibt eben eine Reihe von verschiedenen Mischungen der beiden Sexualstoffe mit ganz spezifischer Wirkung. Gerade hierbei zeigt sich aber, daß die HARTMANNsche Sexualitätstheorie, die anfangs nur auf wenige Experimente gestützt war und die so sehr angegriffen wurde, sich als äußerst fruchtbar erwiesen hat. Für die zunächst überwiegend theoretischen Anschauungen HARTMANNs konnte an den *Chlamydomonas*-Arten durch planmäßige Versuchsanstellung ein Tatsachenmaterial zusammengetragen werden, wie es in solcher Vollständigkeit nur wenige Theorien der Biologie aufweisen können.

#### d) Über die Beständigkeit der cis/trans-Gemische.

Man kann die Frage aufwerfen, wie jede Gametensorte immer in der Außenlösung das charakteristische cis/trans-System aufrecht erhält. In einer Gametensuspension wird ja im Lichte dauernd cis-Ester in trans-Ester umgewandelt, so daß sich die Zusammensetzung der Außenlösung dauernd ändern sollte. I. HAUSSER (1939) untersuchte nun die Quantenausbeute der cis/trans-Umwandlung von Crocetin dimethylester bei Einstrahlung der Wellenlängen 366, 435, 467  $\mu\mu$ . Es ergab sich, daß „erst für etwa 120 absorbierte Quanten eine cis/trans-Umlagerung eintritt. Innerhalb des Absorptionsspektrums war dieses Ergebnis unabhängig von der eingestrahlten Wellenlänge.“ Die Gametensuspensionen, die  $2 \cdot 10^6$  Zellen in 1 ccm enthalten, sind tiefgrün gefärbt. Da die Zellen viel Licht absorbieren, steht für die cis/trans-Umlagerung nur wenig Energie zur

Verfügung. Auf diese Weise kann das genetisch bedingte cis/trans-System ohne allzu große Steuerungsvorgänge der Zellen bzw. der Realisatoren konstant gehalten werden.

#### e) Über die Chemotaxis von Geschlechtszellen.

Die Chlamydomonasgameten sind nicht nur gegen cis- und trans-Crocetindimethylester chemotaktisch. Es hat sich ergeben, daß außer verschiedenen Zuckern und Crocin zahlreiche organische Verbindungen chemotaktisch wirksam sind. Alle diese Verbindungen haben aber keinerlei Einfluß auf den Kopulationsvorgang. Die Zucker und Crocin haben Bedeutung für die Beweglichkeit der Zellen. Da wir bei diesen Algen die Sexualstoffe kennen, konnten wir ihre Bedeutung für die Kopulation als spezifische Chemotaktika einwandfrei nachweisen. Dieser Nachweis ist bei den bisherigen Chemotaxisversuchen von Geschlechtszellen nicht erbracht worden. Die ersten grundlegenden Untersuchungen führte PFEFFER (1884) aus. Er fand, daß Farnspermatozoiden gegen Äpfelsäure chemotaktisch sind. Das Gleiche ist der Fall bei den Spermatozoiden von *Salvinia*, *Equisetum*, *Isoetes* und *Selaginella*, während die von *Lycopodium* nach BRUCHMANN (1909) gegen Zitronensäure chemotaktisch sind. Die späteren Untersuchungen von BULLER (1900), LIDFORSS (1905 a), SHIBATA (1905 a, b, c, d, 1911) haben ergeben, daß auch zahlreiche andere Verbindungen chemotaktisch wirken, auf die Farnspermatozoiden z. B. Maleinsäure, Zitronensäure, K- und Rb-Salze, auf die von *Salvinia* Malein- und Zitronensäure, Ca- und Sr-Salze, auf die von *Isoetes* Fumarsäure, Mesakonsäure, Isokampfersäure, Bernsteinsäure, d-Weinsäure, Traubensäure usw. Die Laubmoos-spermatozoiden sind nach PFEFFER gegen Rohrzucker chemotaktisch. LIDFORSS (1905 b) und ÅCKERMAN (1910) geben für *Marchantia*-Spermatozoiden Proteinstoffe und K-, Rb-, Cs-Ionen als Chemotaktika an. LIDFORSS konnte zeigen, daß Extrakte aus weiblichen Hüten von *Marchantia* vorzügliche Chemotaktika waren. Diese Untersuchungen haben ergeben, daß die Spermatozoiden der Laubmoose, der Lebermoose und der Farne chemotaktisch sein können. Welches aber die wirksame Verbindung ist, welche von den Archegonien zur Anlockung der Spermatozoiden ausgeschieden wird, ist nach wie vor gänzlich unbekannt. An den einzelligen *Chlamydomonas*-Arten konnte zum ersten Male mit Sicherheit entschieden werden, welche Substanzen die chemotaktische Anlockung der Gameten bewirken. Durch diese Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß die Carotinoide eine wichtige physiologische Bedeutung für grüne Zellen haben.

## V. Zusammenfassung.

1. Die unter aëroben Bedingungen für das Beweglichwerden günstigsten Zucker sind für *Chl. eugametos* Gentiobiose, für *Chl. dresdensis* Cellobiose, für *Chl. Braunii* Cellotriöse.

2. Versuche über die Beweglichkeit der Zellen haben ergeben, daß *Chl. eugametos*, *Chl. dresdensis* und *Chl. Braunii* verschiedene Beweglichkeitsstoffe bilden und ausscheiden. Der Beweglichkeitsstoff für *Chl. eugametos* ist Crocin, bei den anderen Arten sind es höchstwahrscheinlich mit Crocin verwandte, aber nicht mit Gentiobiose veresterte Derivate von cis- und trans-Crocetin.

3. Um eine *eugametos*-Zelle beweglich zu machen, ist eine Crocinmolekel notwendig, eine *dresdensis*-Zelle benötigt 100 000, eine *Braunii*-Zelle 1 000 000 Molekeln Crocin.

4. Crocindunkelzellen, Vorstufengameten und reaktionsfähige Gameten sind gegen die auf die Beweglichkeit wirkenden Zucker chemotaktisch. Der Zucker mit dem niedrigsten Schwellenwert ist gleichzeitig der am günstigsten auf die Beweglichkeit wirkende. Der Schwellenwert des günstigsten Zuckers liegt bei allen drei Arten bei  $m/10\,000$ .

5. Die als Chemotaktikum wirkenden Crocinlösungen müssen bei *eugametos* 10 000 mal, bei *dresdensis* 100 000 mal, bei *Braunii* 1 000 000 mal konzentrierter sein als die Crocinlösungen, in denen sich die Zellen befinden.

6. Gegen cis- und trans-Crocetindimethylester und deren Mischungen verhalten sich Crocindunkelzellen, Vorstufengameten und reaktionsfähige Gameten verschieden.

7. Befinden sich die Crocindunkelzellen in einer Lösung, die weder cis- noch trans-Crocetindimethylester enthält, so sind sie gegen sämtliche cis/trans-Mischungen (von 100/0—0/100) chemotaktisch.

8. Befinden sich die Vorstufengameten in einer konzentrierten wässrigen Lösung von cis-Crocetindimethylester, so sind sie gegen cis/trans-Mischungen erst dann chemotaktisch, wenn die Mischung aus 80 Vol.-Teilen cis- und 20 Vol.-Teilen trans-Ester besteht. Gegen cis/trans-Mischungen von 100/0—85/15 sind sie nicht chemotaktisch.

9. Die reaktionsfähigen Gameten, die sich in einer bestimmten, erblich festgelegten cis/trans-Mischung befinden, sind gegen cis/trans-Mischungen chemotaktisch, wenn der Unterschied mindestens 19/19

beträgt. Bei Unterschieden von 0/0—18/18 sind sie nicht chemotaktisch.

10. Die reaktionsfähigen Gameten sind auch gegen natürliche Gametenfiltrate chemotaktisch. Auch hier muß der cis/trans-Unterschied mindestens 20/20 betragen; bei Unterschieden von 0/0 und 10/10 erfolgt keine chemotaktische Anlockung.

11. Damit ist nachgewiesen, daß das Sichaufsuchen der Gameten zur Kopulation ein chemotaktischer Vorgang ist und daß als Chemotaktika dabei nur die Sexualstoffe wirken.

12. Alle Erscheinungen der Chemotaxis, auch die Schnelligkeit der chemotaktischen Reaktion, stehen völlig in Übereinstimmung mit den Erscheinungen der Gruppenbildung und den aus der Theorie der relativen Sexualität entwickelten Vorstellungen.

---

### Literaturverzeichnis.

- ÅKERMAN, A. (1910): Über die Chemotaxis der Marchantiaspermatozoiden. Z. Bot. **2**, 94.
- BRUCHMANN, H. (1909): Von der Chemotaxis der Lycopodium-Spermatozoiden. Flora **99**, 193.
- BULLER, A. H. R. (1900): Contributions to our knowledge of the physiology of the spermatozoa of Ferns. Ann. of Bot. **14**, 543.
- HARTMANN, M. (1933): Allgemeine Biologie. 2. Aufl. Jena.
- HAUSSER, J. (1939): Naturwiss. **27**, 330—331.
- JOST, L. (1933): Reizerscheinungen der Pflanzen. Handw. d. Naturwiss. **8**, 353.
- KUHN, R., F. MOEWUS u. D. JERCHEL (1938): Über die chemische Natur der Stoffe, welche die Kopulation der männlichen und weiblichen Gameten von Chlamydomonas eugametos im Licht bewirken. Ber. dtsh. chem. Ges. **71**, 1541.
- KUHN, R. u. A. WINTERSTEIN (1933): Über einen lichtempfindlichen Carotinfarbstoff aus Safran. Ber. dtsh. chem. Ges. **66**, 209.
- KUSANO, S. (1909): Studies on the Chemotactic and other Related Reactions of the Swarm-Spores of Myxomycetes. J. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo **2**, No. 1.
- LIDFORSS, B. (1905a): Über die Chemotaxis der Equisetum-Spermatozoiden. Ber. dtsh. bot. Ges. **23**, 314.
- (1905b): Über die Reizbewegungen der Marchantia-Spermatozoiden. Jb. Bot. **41**, 65.
- MOEWUS, F. (1933): Untersuchungen über die Sexualität und Entwicklung der Chlorophyceen. Arch. Protistenkde **80**, 469.
- (1938a): Carotinoide als Sexualstoffe von Algen. Jb. Bot. **86**, 753.
- (1938b): Vererbung des Geschlechts bei Chlamydomonas eugametos und verwandten Arten. Biol. Zbl. **58**, 516.
- (1939): Untersuchungen über die relative Sexualität von Algen. Ibid. **59**, 40.

- PFEFFER, W. (1884): Locomotorische Richtungsbewegungen durch chemische Reize. *Unters. a. d. Bot. Inst. Tübingen* **1**, 363.
- PRINGSHEIM, E. G. u. F. MAINX (1926): Untersuchungen an *Polytoma uvella* EHRB., insbesondere über Beziehungen zwischen chemotactischer Reizwirkung und chemischer Konstitution. *Planta* (Berl.) **1**, 583.
- PRINGSHEIM, E. G. u. K. Ondraček (1939): Untersuchungen über die Geschlechtsvorgänge bei *Polytoma*. *Beih. z. Bot. Zbl.* **59 A**, 117.
- SHIBATA, K. (1905 a): Studien über die Chemotaxis der *Isoetes*-Spermatozoiden. *Jb. Bot.* **41**, 561.
- (1905 b): Studien über die Chemotaxis der *Salvinia*-Spermatozoiden. *Bot. Mag. Tokyo* **19**, 39.
- (1905 c): Über die Chemotaxis der Spermatozoiden von *Equisetum*. *Ibid.* **19**, 79.
- (1905 d): Weitere Mitteilung über die Chemotaxis der *Equisetum*-Spermatozoiden. *Ibid.* **19**, 126.
- (1911): Untersuchungen über die Chemotaxis der Pteridophyten-Spermatozoiden. *Jb. Bot.* **49**, 1.
-

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Archiv für Protistenkunde](#)

Jahr/Year: 1939

Band/Volume: [92\\_1939](#)

Autor(en)/Author(s): Moewus F.

Artikel/Article: [Über die Chemotaxis von Algengameten. 485-526](#)