

*Nachdruck verboten.
Übersetzungsrecht vorbehalten.*

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Deutschen Universität in Prag.)

Untersuchungen an *Basidiobolus ranarum* EIDAM.

Von

Willy Nowak.

(Hierzu 16 Textfiguren.)

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
I. Einleitung	196
II. Physiologie der Zygotenbildung und Keimungsversuche	199
a) Methodik	199
b) Wirkung des Peptons und des KNO_3	202
1. Einfluß des Peptons auf die Zygotenbildung	203
2. Wirkung des KNO_3 auf die Ausreifung der Zygoten	205
3. Bestimmung der optimalen Konzentration des Peptons und des KNO_3 für reichliche Zygotenbildung und Reifung	206
c) Versuch, die Zygoten zur Keimung zu bringen	208
1. durch Säuren und Alkali in verschiedenen Konzentrationen	209
2. durch Pepsin und Trypsin	210
3. durch Austrocknen oder Auflegen auf Leitungswasseragar	211
4. durch Einwirkung des Magen- und Darminhaltes von Fröschen	212
III. Morphologie und Wachstum	213
a) Mycel	213
1. Konidienkeimung	213
2. Wachstum des Mycels	215
3. Verzweigung	218
b) Zygoten	220
1. Vorstadien	221
2. Bildung und Reifung der Zygoten	221
c) Konidien	222
1. Ausbildung der Konidien	222
2. Ablösungsvorgang	222

	Seite
IV. Cytologie der Befruchtung	223
a) Deutung der bisherigen Befunde	223
b) Methodik	224
c) Bestätigung der Befunde FAIRCHILD's und OLIVE's	225
d) Widerlegung der Annahme einer Reduktionsteilung durch LOEWEN- THAL u. a.	229
e) Eigene Vermutungen in Analogie mit anderen Pilzen	230
V. Zusammenfassung	230
VI. Nachtrag	231
VII. Literaturverzeichnis	232

I. Einleitung.

Ein durch einfachen morphologischen Bau und ansehnliche Zellgröße bemerkenswerter Pilz ist *Basidiobolus ranarum* EIDAM. Er wurde im Jahre 1887 auf Froschexkrementen von EIDAM entdeckt, von ihm auf dem natürlichen Substrat kultiviert und morphologisch wie biologisch ziemlich eingehend beschrieben. Auf Froschexkrementen fand er ihn bloß in Form von braunen Zygoten, die mit hornartig gekrümmten Schnäbeln versehen waren. Als er darauf den Magen- und Darminhalt auf Objektträgern aufstrich und sie in feuchter Kammer aufbewahrte, bemerkte er, daß aus den verdauten und unverdauten Tier- und Pflanzenteilen bald ein Mycel hervortrat, das sich sehr rasch weiterentwickelte. EIDAM beschrieb dann die einzelnen Entwicklungsstadien dieses Organismus. Er beobachtete, wie unter Ansammlung von Plasma an der Hyphenspitze Konidien entstehen, beschrieb weiter, wie sie abgeschleudert werden, auskeimen und ein neues Mycel bilden. Ganz besonders wies er auf die Verschmelzung zweier benachbarter Zellen hin, die vorher noch schnabelförmige Fortsätze bilden. Er sah dann schließlich, wie alles Plasma in eine anschwellende Zelle zusammenfließt, wie sich dieses Gebilde mit einer dicken Haut umgibt, bräunt und zur Zygote wird. Über die Kernteilungsverhältnisse bei diesem Befruchtungsakt gibt EIDAM dem damaligem Stande der Technik entsprechend bloß ungenaue Bilder. Auch über das weitere Schicksal dieser Zygoten und über eine eventuelle Reduktionsteilung finden sich bei ihm keine Angaben. Schließlich glaubte noch EIDAM den Basidiobolus als Saprophyt ansprechen und ihn zu den Entomophthoraceen stellen zu müssen, eine Ansicht, die jedoch in jüngster Zeit von LAKON auf Grund vergleichender morphologischer Studien entschieden bestritten wurde.

Genauere Bilder über die Cytologie der Befruchtung finden wir erst bei FAIRCHILD (1896). Er schildert die einzelnen Phasen der Kernteilungen vor der Befruchtung an Hand vieler Abbildungen. RACIBORSKI (1896) bearbeitete zur gleichen Zeit die Ernährungsphysiologie des *Basidiobolus ranarum* an absolut reinem Material. Er suchte die für das Wachstum optimale Nährlösung zu bestimmen, wobei er zeigen konnte, daß das Pepton als Stickstoff- und Kohlenstoffquelle ausgenützt wird. Dabei beobachtete er auch die Kopulationsbedingungen. Die besonderen, in dieser Richtung hin angestellten Versuche ergaben, daß durch Nahrungsmangel und erhöhte Temperatur die Zygotenbildung angeregt wird, wobei durch letztere auch ein schnelleres Wachstum und ein rascheres Erschöpfen der Nährlösung erfolgt. In gleicher Weise kann man Zygotenbildung durch Übertragen des Mycels in destilliertes Wasser und in Lösungen, die nicht für die Ernährung in Betracht kommen (KNO_3), erzielen.

Schließlich glaubte er noch, den eigentümlichen Befruchtungsakt mit Zellfusionen bei anderen Pilzen vergleichen zu können und wollte den Vorgang bei der Schnabelbildung als Reduktionsteilung deuten. HAECKER (1901), WOYCICKI (1904), WEISMANN (1913) und ganz besonders der Entdecker des *Basidiobolus lacertae*, LOEWENTHAL (1903), griffen den Gedanken auf und betrachteten die auffallende letzte Kernteilung vor der Zellverschmelzung als Reduktionsteilung analog den Vorgängen bei der Reifeteilung des tierischen Eies. Diese von den Zoologen hineingetragene Betrachtungsweise der Vorgänge vor der Kopulation ist in der Folgezeit nicht nur von den Zoologen, sondern auch von Botanikern (OLTMANN'S 1907) vertreten worden.

Es blieb dabei unberücksichtigt, daß dieses Verhalten ein sehr auffälliges wäre, da im Pflanzenreich bisher kein Fall bekannt geworden ist, daß bei der Reduktionsteilung die homöotype Teilung fortfällt. Wenn die Kernteilung in den Schnäbeln eine Reduktionsteilung ist, so ist zu erwarten, daß sich die Vorstadien dieser Kernteilung von der einer somatischen Teilung unterscheiden müssen. Aber weder in den Angaben EIDAM'S und FAIRCHILD'S noch OLIVE'S (1907) ist eine Andeutung darüber zu finden. Letzterer hat die Kernteilungen in der vegetativen und in der Schnabelzelle in jüngster Zeit eingehend untersucht und gefunden, daß sich beide Kernteilungen im wesentlichen voneinander nicht unterscheiden. Cytologisch ließ sich durch nichts eine Reduktionsteilung wahrscheinlich machen. Doch sind die Prophasestadien von keinem Untersucher

so eingehend beachtet worden, daß nicht ein Übersehen z. B. von Synapsis und Diakinesestadien möglich wäre.

Freilich kennen wir von anderen Pilzen auch eigentümliche Kern- und Zellteilungen vor der Zellverschmelzung, die denen des *Basidiobolus ranarum* sehr ähnlich sehen und wir wissen, daß sie keine Reduktionsteilung darstellen. Es sei bloß die Äcidienbildung von *Phragmidium speciosum* erwähnt, wo zuerst die Hyphenenden in sterile obere und fertile untere Zellen zerfallen. Je zwei benachbarte fertile Zellen verschmelzen nach Auflösung der Querwand miteinander, es treten Kernteilungen auf, und schließlich werden die so entstandenen Paarkerne durch je eine Querwand abgeschnürt. Diese Zellfusionen werden als letzte Reste einer geschlechtlichen Fortpflanzung aufgefaßt, was auch beim *Basidiobolus* möglich wäre.

Zur Klärung dieser fraglichen Verhältnisse mußten also die Prophasen der Kernteilungen in den Schnäbeln genau untersucht werden, ob sich nicht vielleicht doch irgendwelche Stadien auffinden ließen, die eine Reduktionsteilung beweisen würden. Wenn aber diese auffallende Kern- und Zellteilung vor der Kopulation keine Reduktionsteilung ist, so muß letztere an Entwicklungsstadien des Pilzes vor sich gehen, die wir überhaupt noch nicht kennen. Es ist somit der Entwicklungsgang des *Basidiobolus* von der Keimung der Zygote an zu erforschen.

Um die Untersuchung in der angegebenen Richtung ausführen zu können, mußte für reichlich kopulierendes Material gesorgt werden. Ferner mußten Bedingungen ausfindig gemacht werden, unter denen die gebildeten Zygoten völlig ausreifen und die natürliche Beschaffenheit aufweisen. Diese Bedingungen sind noch nicht bekannt. EIDAM gewann zwar völlig reife Zygoten, aber auf natürlichem Substrat. RACIBORSKI macht keine Angaben darüber, ob er reife oder unreife Zygoten in seinen Kulturen erhielt und scheint nur unreife erzielt zu haben.

Völlig ausgereifte Zygoten müssen aber vorliegen, sollen die weiteren Stadien des Pilzes untersucht werden. Um dies zu ermöglichen, wurde die Keimung der Zygoten zu erzielen gesucht. Die Kenntnis der Keimungsvorgänge ist wichtig, da im Falle des Nichtzutreffens der Anschauung, daß die Reduktionsteilung im Schnabel auftritt, die Möglichkeit gegeben wäre, sie am Ende der Ruhezeit der Zygoten oder an uns noch unbekanntem diploiden Zuständen des Organismus zu suchen.

II. Physiologie der Zygotenbildung und Keimungsversuche.

a) Methodik.

Bei *Basidiobolus ranarum* versuchte bis jetzt bloß RACIBORSKI (1896) die Bedingungen der Kopulation zu finden. Er glaubte entsprechend der damaligen, allgemein verbreiteten und plausibel erscheinenden Anschauung die geschlechtliche Fortpflanzung am besten durch Aus-hungerung herbeiführen zu können. In einer Versuchsreihe zeigte er auch, daß bei geringerem Zusatz organischer Stickstoffquellen (Pepton), das als C- und N-Quelle ausgenützt wird, die Zygoten früher auftreten als in höheren Konzentrationen. Ferner gibt er an, daß in destilliertem Wasser und in 1 proz. KNO_3 -Lösung, die für die Ernährung gar nicht in Betracht kommt, bei 30°C schon nach 6 bis 8 Stunden Zygotenbildung eintritt.

Bei anderen Organismen, z. B. bei *Sporidinia grandis*, versuchte zu gleicher Zeit KLEBS (1896) die äußeren Bedingungen der Fortpflanzung zu bestimmen. Er fand, daß in feuchter Luft die geschlechtliche, in trockener Luft die ungeschlechtliche Fortpflanzung überwiegt, was jedoch FALK (1902) nicht bestätigen konnte. Im Gegensatz zu RACIBORSKI sah KLEBS in diesem Falle im Nahrungsmangel eine Hemmung für die Zygotenbildung und glaubte, daß eine geeignete chemische Zusammensetzung der Nährlösung die Kopulation hervorrufen könne. Er fand nämlich, daß der Zusatz von Kohlehydraten mit oder ohne Zusatz von anorganischen Salzen ($[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$, KNO_3 , NaNO_3) Zygotenbildung auslöste, während manche organische Stickstoffverbindungen, z. B. Pepton, die Sporangienbildung begünstigen. FALK glaubte jedoch bei dem gleichen Organismus, daß bei einer Erhöhung der Konzentration von löslichen Kohlehydraten die meisten Zygoten gebildet werden, während schwer lösliche Kohlehydrate dagegen die Sporangienbildung hervorrufen. Er geht in seinen Folgerungen schließlich soweit, daß er behauptet, die Qualität der Nährstoffe wäre für die Zygotenbildung nicht maßgebend, sondern nur die Steigerung der Konzentration eines jeden beliebigen Stoffes allein genüge vollkommen zur Auslösung der Kopulation, auch wenn diesem Stoffe als Nährstoff keine Bedeutung zukommt. In neuester Zeit sind wieder von ZIKES Angaben über Anregung der Zygosporenbildung durch äußere Faktoren bei *Mucor stolonifer* gemacht worden; aber nach seiner Ansicht scheinen die Aminosäuren notwendig zu sein.

Aus diesen Angaben ist zu ersehen, daß wir das Wesen der Auslösung der Zygosporenbildung selbst bei dem meist untersuchten Pilz noch gar nicht kennen. Es ist anscheinend weder der Nähr-

stoffmangel im allgemeinen, noch der Stickstoffmangel im besonderen, noch der osmotische Druck oder der Kohlenstoffmangel maßgebend. Die Angaben sind freilich nicht direkt miteinander vergleichbar.

Für unsere Zwecke galt es, jene von RACIBORSKI gefundenen Bedingungen auf ihre Brauchbarkeit zur Erzielung von Kopulationsstadien zu überprüfen und sie soweit auszubauen, daß sie eine zuverlässige Methode darstellen.

Das Material für die folgenden Untersuchungen stammte aus den Kulturen des Instituts, wo der Pilz auf Bierwürzeagar gezogen wird. Mit einer starken Platinnadel wurde ein Stückchen Agar aus dem Proberöhrchen ausgestochen und in Nährlösungen überimpft. Der Bierwürzeagar war stark von Hyphen durchzogen und auch eine Menge weißer Zygoten war darin zu finden. Braune Zygoten konnten nicht festgestellt werden. Um jeweils Impfmateriale aus jungen Kulturen für die Versuchsreihen zu haben, wurden von diesen Agarkulturen Lösungskulturen angelegt, die ich als Stammlösungskulturen bei den einzelnen Versuchsserien bezeichnete. Die Nährlösung wurde nach dem Rezept von RACIBORSKI angefertigt und in 50 ccm Erlenmeyerkölbchen in einer Menge von 20 ccm geboten.

Sie enthielt

	1 Proz. Pepton
	1 „ Glucose
	0,05 Proz. K_2HPO_4
	0,025 Proz. $MgSO_4$
	0,025 „ $CaCl_2$.

Der Pilz bildet bald dichte Rasen, erzeugt mit der Zeit Konidien und Zygoten und wächst in der Nährlösung so gut, daß sein Mycel mit der Impfnadel nicht zu zerreißen ist. Da es jedoch notwendig war, beim Impfen möglichst gleich viel Material zu übertragen, dies aber mit Nadeln, Spateln u. dgl. nicht zu bewerkstelligen war, so mußte schließlich mit einer dünnen, langen Schere, die durch öfteres Hindurchziehen durch die Flamme von anhaftenden Keimen befreit wurde, der Rasen zerschnitten werden. Dann war es leicht, kleine Mycelstückchen mit der Nadel aufzuspießen und zu übertragen.

Zunächst wurde dem Pilz Pepton in nachstehenden Abstufungen geboten. Benutzt wurden 50 ccm Erlenmeyerkölbchen, die mit 20 ccm Nährlösung beschickt waren.

Es tritt also in den niederen Konzentrationen die Zygotenbildung nach 15 Tagen schon ein, während sie in der höchsten bis zur Beendigung des Versuches noch ausbleibt. In 0,1 Proz., 0,01 Proz. und 0 Proz. Pepton waren überall Zygoten zu finden; in 0,1 Proz. sogar die meisten. Daraus kann man ersehen, daß die Aushungerung den

Versuch 1.

Impfmateriäl 1 Woche alt; Stammlösungskultur, verdunkelter Thermostat. 30° C.

10. 2.	1 ‰	0,1 ‰	0,01 ‰	0 ‰
25. 2.	—	ooo	o	o

o = weiße Zygoten, o = wenige, ooo = zahlreiche.

Prozeß beschleunigt, was RACIBORSKI in seinen Versuchsreihen beweisen wollte. Zu einem Ausreifen der Zygoten kam es jedoch nicht.

Die zweite Angabe RACIBORSKI's, daß in 1 proz. KNO₃-Lösung nach 6—8 Stunden bei 30° C Zygotenbildung eintritt, mußte auch nachgeprüft werden. Es wurden 9 Erlenmeyerkölbchen von 50 ccm Inhalt mit 20 ccm 1 proz. KNO₃-Lösung gefüllt, mit gleichem Material beimpft und im verdunkelten Thermostaten bei 30° C aufgestellt.

Versuch 2.

Impfmateriäl 1 Woche alt; Stammlösungskultur, verdunkelter Thermostat. 30° C.

10. 2.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
25. 2.	•	•	•	•	•	•	•	•	•

• = braune Zygoten.

Nach 8 Stunden waren noch keine Zygoten zu finden und auch nach 2 Tagen traten sie bloß in so geringer Menge auf, daß sie kaum in Betracht kamen.

Erst nach 15 Tagen konnten in dem schwachen Mycel einige Zygoten gefunden werden. Sie zeigten bemerkenswerterweise ein braunes Exosporium, konnten aber nicht als ausgereift betrachtet werden. Dunkelbraune Zygoten mit warziger und dorniger Oberfläche, die EIDAM auf Froschexkrementen fand, konnten in Kulturen allerdings nie gewonnen werden.

Wenn auch die Richtigkeit der Versuchsergebnisse RACIBORSKI's nicht anzuweifeln ist, so können sie doch schwer zum Vergleich herangezogen werden, denn man findet bei ihm über die Versuchsanstellung keine nähere Angabe. Er sagt weder über die Herkunft und Beschaffenheit des Materials etwas aus, noch über das Nährsubstrat und des Verhalten des Pilzes auf ihm.

Doch gerade der letzte Befund, daß durch diese Versuchsanstellung braune Zygoten zu erhalten waren, veranlaßte uns, den

Wirkungen dieser Stoffe näher zu treten, ohne weiter das Wesen der Kopulationsbedingungen zu berücksichtigen.

b) Wirkung des Peptons und des KNO_3 .

Deshalb wurde eine Reihe von Versuchen angesetzt, um die Wirkungsweise einerseits des KNO_3 , andererseits des Peptons zu ermitteln. Schließlich sollte ihre gleichzeitige Wirkung in Betracht gezogen werden.

1. Der bequemeren Kontrollierbarkeit wegen wurden die ersten Versuche in Petrischalen mit festem Substrat ausgeführt. Verwendet wurde 2proz. Agar in einer Menge von 10 ccm. KNO_3 wurde in nachstehender Abstufung geboten.

Versuch 3.

Impfmaterial 2 Monate 21 Tage alt; Stammlösungskultur, verdunkelter
Thermostat. 30° C.

25. 2.	2 %	1,5 %	1 %	0,5 %	0,05 %	0 %
28. 2.	—	—	—	K	K	K
1. 3.	—	—	—	K	K	K
3. 3.	—	—	K	K	K	K

K = Konidien.

Es trat also in 0,5 Proz., 0,05 Proz. und in 0 Proz. sowie später auch in 1 Proz. KNO_3 nur Konidienbildung auf. Das Wachstum war anfangs in allen Konzentrationen mit Ausnahme der ersten recht gut; doch nach einer Woche wurden die Hyphen sehr dünn und sahen schlecht ernährt aus, was wegen der fehlenden C- und Energiequelle wohl selbstverständlich ist. Über die Rolle, die das KNO_3 spielt, kann man nichts aussagen, da zur Beurteilung, ob es den N-Bedarf deckt, eine C-Quelle hätte verwendet werden müssen. Das anfängliche Wachstum dürfte durch die Nährstoffe, die beim Impfen im Mycel übriggeblieben sind, ermöglicht worden sein. Auch die im Agar vorhandenen Stoffe scheinen aufgebraucht worden zu sein.

Ich stellte deshalb eine zweite Reihe mit gleichen KNO_3 -Zusätzen bei Zimmertemperatur in feuchter Kammer auf. Es sollte sich zeigen, ob nicht vielleicht durch das Herabsetzen der Temperatur das anfängliche Wachstum mehr herabgemindert werden könnte, wodurch es schon eher durch die größere Konzentrationsmöglichkeit des Plasmas zur Zygotenbildung kommen dürfte. Das Material für

den folgenden Versuch stammte aus der gleichen Stammlösungskultur, die unterdessen um 10 Tage älter geworden war.

Versuch 4.

Impfmaterial 3 Monate alt; Stammlösungskultur, Zimmertemperatur.

5. 3.	2 ‰	1,5 ‰	1 ‰	0,5 ‰	0,05 ‰	0 ‰
8. 3.	—	—	—	K o	K	—
9. 3.	—	K	—	K o	K	—
10. 3.	—	K	K o	K ooo	K	K
21. 3.	K o	K o	K o	K ooo	K o	K o

Aus dieser Versuchsreihe kann man ersehen, daß bei 0,5 Proz. KNO_3 Zygoten schon am dritten Tage auftreten; aber sie sind nur vereinzelt zu sehen, sind unreif und werden auch später nicht braun. Erst am fünften Tage erscheinen sie bei dieser Konzentration in Massen, während sie bei 1 Proz. an diesem Tage, bei 2 Proz., 1,5 Proz., 0,05 Proz. und im Kontrollversuch erst nach weiteren elf Tagen nur verstreut im Mycel gefunden werden können. Konidien jedoch erscheinen bei einer Konzentration von 0,5 Proz. und 0,05 Proz. schon am dritten Tage. Bei 1,5 Proz. dauert es vier, bei 1 Proz. und im Kontrollversuch fünf und bei 2 Proz. sogar 16 Tage. Das Mycel sieht wieder sehr schlecht ernährt aus, obwohl in diesem Falle wegen der niederen Temperatur kein so rascher Verbrauch der Nährstoffe stattfand. Zur Deckung des C-Stoffwechsels ist neben dem N-Vorrat, wie aus den Versuchsergebnissen RACIBORSKI's hervorgeht, eine C-Quelle in Form eines Kohlehydrates notwendig. Ammonverbindungen und Methylamine können weder den Stickstoff- noch den Kohlenstoffbedarf des *Basidiobolus* decken.

2. Pepton dagegen dient diesem Pilz sowohl als Stickstoff- als auch als Kohlenstoffquelle. Er wächst darin sehr üppig.

Es wurde also das Pepton in folgenden Konzentrationen dem 2proz. Agar zugesetzt. Verwendet wurden wieder Petrischalen, in die je 10 ccm des Agars gegossen wurde.

Es ist also bei 0,05 Proz. Pepton schon am dritten Tage eine Zygotenbildung zu verzeichnen; am vierten Tage treten bei 0,5 Proz. und am fünften Tage bei 1 Proz. Zygoten auf. Die Bildung von Konidien wird durch die Erhöhung der Peptonkonzentration unterdrückt. Auf die Abhängigkeit der Zygotenbildung vom Stickstoffmangel wies RACIBORSKI hin und wollte seine Anschauung durch einen ähnlichen

Versuch 5.

Impfmaterial 2 Monate 21 Tage alt; Stammlösungskultur, verdunkelter
Thermostat. 30° C.

26. 2.	2 %	1,5 %	1 %	0,5 %	0,05 %	0 %
1. 3.	—	—	—	—	o	K
2. 3.	—	—	—	o	o	K
3. 3.	—	—	ooo	o	o	K

Versuch bekräftigen. Wenn man jedoch auch die Menge der gebildeten Zygoten in Betracht zieht, so wird man finden, daß in höheren Konzentrationen mehr gebildet werden als in niederen. Auch fängt dort die Zygotenbildung im Zentrum des Wachstums an und schreitet zentrifugal fort. Es scheint also bei kleineren Mengen verfügbaren Nährstoffes die Zygotenbildung früher aufzutreten als bei größeren, wenn man auch nicht leugnen darf, daß in höheren Konzentrationen mehr auftreten, was durch die größere Menge verfügbarer Nährstoffe zu erklären ist. Man sieht also: Vorbedingung der Zygotenbildung ist gute Ernährung. Ausgelöst wird sie durch Nahrungsmangel.

Wurden die Peptonmengen noch mehr verringert, so ergaben sich bei gleicher Versuchsanstellung keine großen Unterschiede mehr:

Versuch 6.

Impfmaterial 3 Monate alt; Stammlösungskultur, verdunkelter
Thermostat. 30° C.

13. 3.	1 %	0,1 %	0,01 %	0 %
15. 3.	—	o	K o	K
16. 3.	—	K ooo	K o	K
22. 3.	ooo	K ooo	K o	K o

Nach den Ergebnissen des Versuchs Nr. 2 bei bloßer Verwendung des KNO_3 wäre zu schließen, daß ein Mangel an Nährstoffen die Kopulation auslöse, weil das KNO_3 allein als Nährstoffquelle für den *Basidiobolus* einen nur vorübergehenden und bescheidenen Ersatz darstellt. Aber es fiel auf, daß sich hierin braune Zygoten bildeten, während sie im Pepton, wenn es in noch so geringer Menge geboten wurde, nie oder erst nach Monaten reiften. Aus diesem Grunde interessierte uns die Wirkung der Kombination beider Stoffe.

3. Obwohl ich bei den letzten Versuchen mit Agar, den ich zwecks dauernder Beobachtung verwendete, nicht das gleiche Resultat erhielt wie in den Nährlösungen bei Versuch 1 und 2, so versuchte ich auch den folgenden Versuch in Petrischalen anzusetzen, um besser vergleichbare Resultate zu haben.

Das KNO_3 und das Pepton wurde in folgenden Konzentrationen geboten.

Versuch 7.

Impfmaterial 14 Tage alt; Stammlösungskultur, verdunkelter Thermostat.
30° C.

18. 3.		1 % Pepton	0,1 %	0,01 %	0 %
19. 3.	2 % KNO_3	—	—	—	—
20. 3.		—	K	—	—
22. 3.		—	K o	K	K
12. 4.		ooo	K o	K	K
18. 3.		1 % Pepton	0,1 %	0,01 %	0 %
19. 3.	1 % KNO_3	—	K	—	—
20. 3.		—	K o	K	K
22. 3.		o	K o	K	K
12. 4.		o	K o	K	K
18. 3.		1 % Pepton	0,1 %	0,01 %	0 %
19. 3.	0,5 % KNO_3	—	—	—	K
20. 3.		—	K	K	K
22. 3.		—	K o	K	K
12. 4.		o	K o	K	K

Es scheinen hier die Bedingungen für die Zygotenbildung in den höheren Konzentrationen von 1 Proz. und 0,1 Proz. Pepton günstiger zu sein als in den niederen. Man trifft in allen drei Reihen bei 0,1 Proz. Pepton am dritten Tage Zygotenbildung an, während sie bei 1 Proz. erst später und bei 0,01 Proz. und 0 Proz. überhaupt nicht auftreten. Ferner müssen im Agar Nährstoffe wirken, weil stets in den Kontrollversuchen ohne Pepton ein gutes Wachstum zu verzeichnen war. Sie genügen aber nicht, um die Vorbedingung für die Zygotenbildung zu schaffen, wie dies bei einer

Konzentration von 0,05 Proz. Pepton der Fall ist. Auf diese Weise kann weder der Einfluß des KNO_3 noch der des Peptons klar zum Vorschein kommen.

Es schien also im Interesse der Untersuchung besser zu sein, die Übersichtlichkeit auf festem Substrat aufzugeben und die Versuche mit Lösungen durchzuführen. Benutzt wurden zu diesem Zwecke 50 ccm Erlenmeyerkölbchen, die mit 20 ccm Nährlösung gefüllt wurden.

Wie im Versuch 7 wurde KNO_3 und Pepton in verschiedener Menge geboten; es wurden bloß einige Zwischenstufen geprüft.

Im ersten Versuch (8) wurde das Impfmateriale aus einer Stamm-lösungskultur genommen, die schon zwei Monate alt war. Der Versuch blieb 25 Tage im verdunkelten Thermostaten bei 30°C stehen. Es kam nur bei 2 Proz. KNO_3 + 0,05 Proz. Pepton und bei 1 Proz. KNO_3 + 0,1 Proz. Pepton zur Bildung und teilweisen Ausreifung der Zygoten.

Daraufhin wurde der Versuch wiederholt. Diesmal war das Impfmateriale bloß 5 Tage alt und stammte aus einer Nährlösung von 0,01 Proz. Pepton. Die übrigen Versuchsbedingungen waren die gleichen.

Versuch 9.

Impfmateriale 5 Tage alt; aus 0,01 Proz. Pepton, verdunkelter Thermostat. 30°C .

29. 4.—22. 5.	in %	2 % KNO_3	1 %	0,1 %	0 %
	1 Pepton	—	—	—	—
	0,1 "	○	○	—	—
	0,05 "	● ○	● ○	●	—
	0,01 "	●	○	—	—
	0,001 "	—	●	—	—
	0 "	—	—	—	—

Bei einer Konzentration von 0,05 Proz. Pepton findet man bei allen drei KNO_3 -Stufen braune Zygoten. Ferner sind braune Zygoten bei 0,01 Proz. Pepton + 2 Proz. KNO_3 und bei 0,001 Proz. Pepton + 1 Proz. KNO_3 . Bei 1 Proz. Pepton wurden die Zygoten trotz Gegenwart von 2 Proz. und 1 Proz. KNO_3 nicht braun. Es scheint also die Wirkung des KNO_3 meist bei niederen Peptonkonzentrationen zur vollen Geltung zu kommen. Das Pepton leistete seine Dienste als Nährstoff; denn man konnte bei niederen Peptonkonzentrationen einen zwar kleinen, aber gleichmäßig gewachsenen Rasen beobachten.

Bei 1 Proz. Pepton wuchs der Pilz sehr rasch und nahm bald den ganzen Boden des Kölbchens ein.

Es scheint also die Peptonmenge von 0,05 Proz. gemischt mit KNO_3 in Konzentrationen von 2, 1 und 0,1 Proz. bei einem Impfmateriale, das aus schwachen Nährlösungen stammte, sowohl für die Zygotenbildung als auch für das Braunwerden ganz besonders günstig zu sein.

Wurde nun der Versuch (10) unter gleichen Bedingungen und mit gleichen Ausgangsmaterial, das jedoch schon 26 Tage alt war, wiederholt, so waren bloß bei 1 Proz. KNO_3 mit 0,1 und 0,05 Proz. Pepton Zygoten zu finden, die überdies nicht braun wurden.

Es wäre schließlich noch in Betracht zu ziehen, ob nicht etwa die Größe der Kölbchen und die darin befindliche Nährstoffmenge das Eintreten der Kopulation beeinflußt. Es wurden deshalb zu diesen Reihen Versuche (11) in 200 ccm Kolben mit je 50 und 100 ccm Nährlösung angeschlossen. Als Nährlösung diente 1 Proz. KNO_3 und 0,05 Proz. Pepton. Das Impfmateriale stammte aus einer Stammlösungskultur und war 2 Monate alt. Der Versuch wurde im verdunkelten Thermostaten bei 30°C aufgestellt. In beiden Fällen waren nach 25 Tagen reichlich braune Zygoten zu finden.

Es wurden nun zur Bestätigung der letzten Ergebnisse 9 200 ccm Kolben mit je 100 ccm Nährlösung, die aus 1 Proz. KNO_3 und 0,05 Proz. Pepton bestand, gefüllt. Im übrigen wurden die gleichen Bedingungen eingehalten:

Versuch 12.

Impfmateriale 10 Tage alt; aus 0,01 Proz. Pepton, verdunkelter Thermostat. 30°C .

10. 5.—4. 6.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	●	● ○	● ○	○	○	○	○	—	—

Es wurden bloß in drei Kolben braune Zygoten gefunden, in vierten waren ungeriefte und in den letzten zwei gar keine zum Vorschein gekommen. Aus diesem ungleichen Versuchsergebnis geht hervor, daß auch eine größere Menge gebotener Nährstoffe unter obwaltenden Umständen keine Bedeutung für die Kopulation und für das Braunwerden der Zygoten hat.

Endlich dachte man noch unter Beibehaltung der günstigen Peptonmenge von 0,05 Proz. durch Konzentrationssteigerung des KNO_3 , NaCl und schließlich von Glukose eine Zygotenbildung her-

vorrufen zu können. Es wurde auch die wegen ihrer osmotischen Wirkung und Unschädlichkeit bekannte Lösung nach BRENNER (1920) verwendet, die auf 100 g H₂O,

1,82 „ NaCl,

0,06 „ KCl,

0,47 „ MgCl₂ + 6 aq,

1,6 „ CaCl₂ + 6 aq enthält.

Es kommen also auf 100 g Wasser 2,79 g Salze.

Von den obigen Salzen und der Glukose wurden die Konzentrationen von 2, 3, 5 und 10 Proz. angewendet. Das Ausgangsmaterial stammte aus 0,01 Proz. Pepton und war 23 Tage alt. Der Versuch (13) wurde im verdunkelten Thermostaten bei 30° C aufgestellt. Nach 25 Tagen konnte in keiner Konzentration eine Zygotenbildung festgestellt werden.

Wenn auch mit diesen wenigen Versuchen jene Bedingungen nicht festgestellt waren, unter denen wir mit Sicherheit braune Zygoten erhalten, so können wir doch bei Verwendung mehrerer Kulturen immer auf Eintritt von Kopulation rechnen. Daß nicht in jeder Kultur Kopulation eintritt, dürfte daran liegen, daß noch andere Faktoren, die hier keine Beachtung gefunden haben, bei der Auslösung der Kopulation von Bedeutung sind. Vor allem ist an die Vorkultur, also an die Herkunft des Impfmateri als zu denken.

c) Versuch, die Zygoten zur Keimung zu bringen.

Mit den in der Kultur erhaltenen braunen Zygoten wurden aus obenerwähnten Gründen Keimversuche gemacht. Über die Anstellung solcher Versuche mit Pilzzygoten sind in der Literatur nur spärliche Angaben zu finden. BREFELD legte die Zygoten, nachdem er sie von anhaftendem Mycel befreit hatte, auf feuchtes Filterpapier in Schalen aus, bewahrte sie in feuchten Kammern auf und wartete die Ergebnisse ab. Auf diese Weise konnte er bei *Mucor Mucedo* nach 6 Wochen eine Keimung erzielen. Die Zygoten von *Chaetocladium Jonessi* mußten zuerst auf Pferdemit ganz ausreifen. Dann erst konnte er sie auslegen, was nach mehr als 3 Monaten zum Ziele führte. Bei den Zygoten von *Piptocephalis Freseniana* war eine Nachreife von 2—3 Tagen nicht zu umgehen; erst nach dieser Vorbehandlung keimten sie nach 2 Monaten bei obiger Kulturmethode aus. Über die Keimversuche mit *Mortierella Rostafinski* gehen die Angaben BREFELD'S (1872) sehr auseinander. Er behauptete anfangs, daß zur Reifung eine Nährlösung notwendig

sei. Dann müßten die Zygoten eine kurze Zeit hindurch sich selbst überlassen werden, um auszukeimen. Später mußte er jedoch bei Wiederholung des Versuches feststellen, daß ihm die Keimung überhaupt nicht geglückt war. Die beobachteten Keimschläuche stammten bloß aus der Hyphenkapsel, die die Zygoten umgibt. Bei *Chaetocladium Fresenianum* und *Pilobolus* genügte wieder ein Auslegen auf feuchtes Filterpapier, um nach 4 Wochen die Keimung zu erzielen. Die Zygoten von *Entomophthora radicans* bereiteten BREFELD (1881) große Schwierigkeiten. Eine Nachreife, die für das Gelingen dieser Versuche unerläßlich sein soll, erfolgte zwar durch 8—10 Tage; doch eine Keimung konnte er nach monatelangem Warten nicht erzielen.

BURGEFF (1915) und GRETE ORBAN (1919) erzielten bei Zygoten von *Phycomyces nitens* KUNTZE, die sie in Reagensgläsern im Dunkeln entstehen ließen und denen sie dann eine entsprechende Ruhepause von 5—6, jedoch nicht mehr als 12 Monaten gönnten, nach Abpräparieren der Dornen und Auflegen auf Leitungswasseragar nach 14—20 Tagen eine Keimung. BURGEFF bezeichnet hier das Licht als auslösenden Faktor zur Zygotenkeimung.

Die Angaben KÜSTER'S (1907) über geglückte Keimversuche BREFELD'S (1875) und LOEWENTHAL'S (1903) an *Basidiobolus*zygoten mit Hilfe von proteolytischen Fermenten sind unrichtig. BREFELD spricht bloß von Versuchen mit Trüffelsporen, die er in einer Nährlösung, der Pepsin und Galleextrakt beigemischt war, vergebens zur Keimung zu bringen versuchte. LOEWENTHAL hält die Darmpassage beim Frosch oder bei einem anderen Zwischenwirt zur Keimung der Zygoten des *Basidiobolus* für notwendig. Es hat jedoch keine Versuche zur Bestätigung seiner Ansicht gemacht. Die ungerreifen Zygoten des *Basidiobolus ranarum* brachten EIDAM (1887) und CHMIELEVSKY (1890) zur Keimung; sie konnten sogar einen Paarkern im Keimschlauch feststellen. Reife Zygoten von *Basidiobolus* aber hat bisher niemand keimen sehen.

Es wurde nun bei den eigenen Versuchen zuerst daran gedacht, keimende Zygoten im Magen- und Darminhalt von Fröschen zu finden. Doch weder in den Fröschen vom Spätherbst aus der Prager Umgebung, noch in den Fröschen, die im Frühjahr bei Budweis gefangen wurden, konnte der *Basidiobolus* gefunden werden. Als ich den Magen- und Darminhalt auf Objektträger aufstrich, die ich dann nach der Art von EIDAM in feuchten Kammern aufbewahrte, konnte ich trotz genügend verfügbaren Materials nicht einmal seine Ent-

wicklung nach einigen Tagen beobachten. Ebenso ist es nach mündlicher Mitteilung E. PRINGSHEIM in Berlin-Dahlem ergangen.

Es wäre der Gedanke nicht von der Hand zu weisen, daß der Pilz bloß zufällig in den Frosch kommt und gerade dort entdeckt wurde. Vielleicht lebt er auf ganz anderen Substraten und wird vom Frosch mit der Nahrung aufgenommen.

Es wurde nun versucht, die braunen Zygoten, die man in der künstlichen Kultur in genügender Menge zur Verfügung hatte, unter sterilen Bedingungen zur Keimung zu bringen. Wenn man an der Annahme festhält, daß die Darmpassage im Frosch für den Entwicklungszyklus des *Basidiobolus* notwendig sei, so mußte man versuchen, ihm jene Stoffe zu bieten, die auf seine Zygoten im Magen und Darm einwirken. Es wäre daran zu denken, daß die Säure im Mageninhalt oder das Alkali im Darminhalt allein genügen, um diesen Prozeß auszulösen. Vielleicht ist der Wechsel der Azidität mit der Basidizität ausschlaggebend. Schließlich mußte noch untersucht werden, inwieweit Pepsin + HCl oder Trypsin + Alkali wirken.

Über das Pepsin im Magensaft des Frosches fand ich keine Angaben. OPPENHEIMER (1913) sagt bloß an einer Stelle, daß das Pepsin des Frosches bei 0° C schon wirksam sei. Doch diese Angabe mußte er in seiner Arbeit bald widerrufen. Die Menge der notwendigen Salzsäure ist bloß für das Pepsin der Fische angegeben. Bei ABDERHALDEN (1923) findet man, daß das Pepsin bei einem Salzsäurezusatz von 0,8—1 Prom. am besten auf Fibrin, bei 1 Prom. auf Kasein und Myosin und bei 2—5 Prom. auf Eiereiweiß wirkt.

Über Keimversuche mit Zygoten unter Beibehaltung von sterilen Bedingungen finden wir in der Literatur keine näheren Angaben.

In unserem Falle war es unmöglich die Zygoten von anhaftendem Mycel zu trennen. Es mußten unter sterilen Bedingungen mit einer kleinen Schere in den Kölbchen kleine Mycelstückchen herausgeschnitten werden, um wenigstens mit einer leicht übersehbaren Zahl von Zygoten arbeiten zu können. In allen Fällen wurde von einem gleichen Impfmateriale ausgegangen. Verwendet wurden 50 ccm Erlenmeyerkölbchen, die stets mit einer Menge von 20 ccm Versuchsflüssigkeit gefüllt waren. Vor dem Versuch wurde das Impfmateriale dreimal in sterilem destilliertem Wasser gewaschen, um die Reste der zwischen den Hyphen haftenden Nährlösung wegzuspülen.

Die Keimversuche, die stets in mehreren Reihen angestellt wurden, wurden in folgender Weise kombiniert.

1. Auf das Impfmateriale wurde 12 Stunden bei Zimmertemperatur nach oben angegebener Methode 1, 0,1, 0,01 und 0 Proz. HCl einwirken gelassen.

2. Ein anderes Impfmateriale wurde die gleiche Zeit mit den gleichen Mengen Na_2CO_3 behandelt.

3. Ferner wurde ein bestimmtes Materiale unter Beibehaltung der oben herrschenden Bedingungen 6 Stunden der Einwirkung der Säure und dann 6 Stunden der Soda ausgesetzt.

4. Endlich wurden vier Kölbchen mit einer Salzsäuremenge von 2, 1,5, 1 und 0,5 Prom. und mit einer Messerspitze Pepsin Grubler beschickt. Darin wurde dann ein bestimmtes Impfmateriale 24 Stunden im verdunkelten Thermostaten bei einer Temperatur von 30°C belassen.

5. Der Versuch wurde wiederholt. Die Einwirkungsdauer wurde auf 6 Stunden beschränkt und verlief bei Zimmertemperatur.

6. Es wurden vier Kölbchen mit der gleichen Menge von $\frac{n}{100}$ $\frac{n}{200}$ NaOH gefüllt und mit einer Messerspitze von Trypsin beschickt. Das Impfmateriale verblieb 12 Stunden im verdunkelten Thermostaten bei 30°C in den Kölbchen.

7. In allen Versuchen wurde das Impfmateriale nach Ablauf der Einwirkungszeit gründlich dreimal in destilliertem und sterilem Wasser gewaschen und dann zum Teil in die RACIBORSKI'sche Stamm-lösung überimpft oder in steriles Wasser übertragen.

8. Die Kölbchen blieben nun länger als 1 Monat bei Zimmertemperatur stehen. Manche Versuche wurden jedoch schon nach 5 Tagen unterbrochen, was besonders bei Verwendung der Nährlösung der Fall war, weil das Überwuchern durch Mycel-fäden die Beobachtung unmöglich macht. Doch in keinen der Versuchsserien konnte eine Zygotenkeimung beobachtet werden.

Schließlich versuchte ich noch durch andere Eingriffe die Keimung herbeizuführen. Ich ließ ein kleines Mycelstückchen, das aus einer Nährlösung von 0,1 Proz. Pepton stammte, 3 Monate und 5 Tage alt war und viele braune Zygoten enthielt, in einer Petrischale 1 Woche trocknen. Dann überimpfte ich es in destilliertes Wasser.

Die Methode von BURGEFF und GRETE ORBAN wurde auch an diesem Objekte versucht. Sie versuchten nämlich eine Zygotenkeimung bei *Phycomyces* dadurch herbeizuführen, daß sie die Zygoten aus der alten Nährlösung entfernten und sie auf ein feuchtes Sub-

strat betteten. Dadurch sollten die Zygoten aus dem Bereich der Stoffwechselprodukte gebracht werden, die vielleicht eine Keimung hemmen.

In unserem Falle konnte ich aus angegebenen Gründen bloß mit kleinen Mycelstückchen arbeiten. Es wurden nun diese Stückchen auf Leitungswasseragar geimpft. Zur Kontrolle wurden noch Schalen mit 2proz. Agar, dem 1 Proz. Pepton und Schalen mit gleich starkem Agar, dem 0,1 Proz. Pepton beigemischt war, gegossen und mit gleichem Material beschickt. Gleichzeitig wurden noch Zygoten nach 19 tägiger Trocknung sowohl auf Leitungswasseragar als auch auf Agar mit den nötigen Peptonmengen aufgelegt.

Alle Versuche wurden bei Zimmertemperatur ausgeführt und blieben 1 Monat stehen. Nach dieser Zeit konnte in keiner der Schalen eine Keimung beobachtet werden.

Schließlich glaubte ich den Bedingungen, wie sie in der Natur herrschen, dadurch am nächsten zu kommen, daß ich auf die Zygoten frischen Magen- und Darminhalt, der Fröschen entnommen wurde, einwirken ließ. Es konnte hier einestells die natürliche Stufe der Azidität des Magensaftes in Tätigkeit treten, andererseits können auch die Bakterien und die anderen Mikroorganismen des Darminhalts zur Geltung kommen. Auf die Sterilität mußte verzichtet werden. Der Magen- und Darminhalt der getöteten Frösche wurde in Objektträgeraufstrichen in Anwendung gebracht. Durch kleine feuchte Ringe aus Pappdeckel und Auflegen eines Deckglases wurde für eine wasserdampfgesättigte Atmosphäre gesorgt. Schließlich kamen alle Objektträger in eine feuchte Kammer, die bei Zimmertemperatur aufgestellt wurde. Die Zygoten samt den Resten des Mycels, das unmöglich von ihnen zu trennen war, wurden mit dem Magen- und Darminhalt vermischt. Es wurden im ganzen 13 Magensaftpräparate hergestellt und drei Objektträger mit Dünn- und vier Objektträger mit Dickdarminhalt belegt. Außerdem kam der übrige Dickdarminhalt in einer kleinen Schale zur Verwendung. Nach 24 Stunden wurden aus den vier Magensaftpräparaten die Zygoten herausgenommen und in die Darminhaltpräparate gelegt, um hier den natürlichen Wechsel der Reaktion nachahmen zu können.

Nach 1 Monat waren die Zygoten noch nicht gekeimt.

Es war also weder durch die Wirkung von Säuren und Alkali, noch durch proteolytische Fermente, die sowohl in künstlicher wie in natürlicher Form geboten wurden, möglich, die Zygoten innerhalb einer Versuchszeit von 1—2 Monaten zur Keimung zu bringen. Auch das Auslegen auf Leitungswasseragar und das Austrocknen

der Zygoten nützte nichts. Möglicherweise sind nur die ganz dunklen, bestachelten Zygoten keimfähig, die ich nicht erhalten habe. Doch hat auch sie noch nie jemand sich weiter entwickeln sehen. Die Keimung ungereifter Zygoten konnte jedoch, wie schon erwähnt, beobachtet werden; doch die kann hier nicht in die Wagschale fallen.

III. Morphologie und Wachstum.

a) Mycel.

Die Angaben EIDAM's (1887) über die Morphologie des *Basidiobolus ranarum* sollten mit besseren Methoden nachgeprüft und durch einige Einzelheiten ergänzt werden. Wie EIDAM ging auch ich bei diesen Untersuchungen von der Keimung der Konidien aus. Ich beobachtete sie an Objektträgern, die durch Eintauchen in flüssigen 2 proz. Peptonagar mit einer dünnen Schicht des Nährbodens überzogen waren, während EIDAM auf sterilisiertem Urin und Pferdemistabkochung Konidien streuen ließ und ihre Weiterentwicklung studierte. Die mit Agar benetzten Objektträger wurden in den Deckel von Petrischalen gelegt, in den die andere Schale, die oben ein Konidien lieferndes Mycel führte, hineinpaste. Dadurch konnten die oben entstandenen Konidien auf die Objektträger fallen, auskeimen und jederzeit durch Umlegen der Schale beobachtet werden. Diese Methode, die von KNIEP (1911) mit Vorteil zur Untersuchung der Hymenomyceten angewendet wurde, war auch hier gut zu gebrauchen.

1. Auf dem Objektträger bilden die Konidien bald einen oder mehrere Keimschläuche aus, die nicht nur an den Seiten, sondern auch am apikalen Ende der Konidie auftreten können. Färbt man solche Stadien mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHEIN, so kann man die Angabe EIDAM's bestätigen, daß der Keimschlauch nur einen Kern besitzt (Fig. 1). Sind mehrere Keimschläuche entstanden, so besitzt bloß einer von ihnen einen Kern (Fig. 2). Die kernlos gebliebenen Schläuche gehen keine Zellteilungen ein und hören bald zu wachsen auf. Ferner kann öfter beobachtet werden, daß die nächste Verzweigung der lebensfähigen Hyphe im Winkel von 90° nahe der Konidie angelegt wird. Dadurch ist schon eine

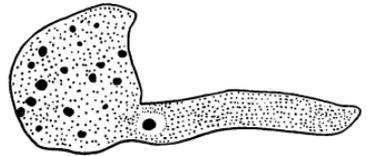


Fig. 1. Konidie, einen einkernigen Keimschlauch treibend. Comp. Oc. 10. Obj. 7.

größere Ausbreitungsmöglichkeit für eine Weiterentwicklung des Mycels gegeben. Noch nach fünf Tagen findet man zuweilen in der Konidie einen Kern. Dieser Kern verdankt seine Entstehung einer frühen Kernteilung im Keimschlauch. Der eine dieser Kerne wandert, sich weiter teilend, in den Keimschlauch, während der andere in der Konidie zurückbleibt. Kommt nun an der entgegengesetzten Seite ein neuer Keimschlauch zur Entwicklung, so braucht dieser zurückgebliebene Kern bloß dort hineinzuwandern. Dadurch wird die Einleitung eines annähernd radiären Wachstums eingeleitet.

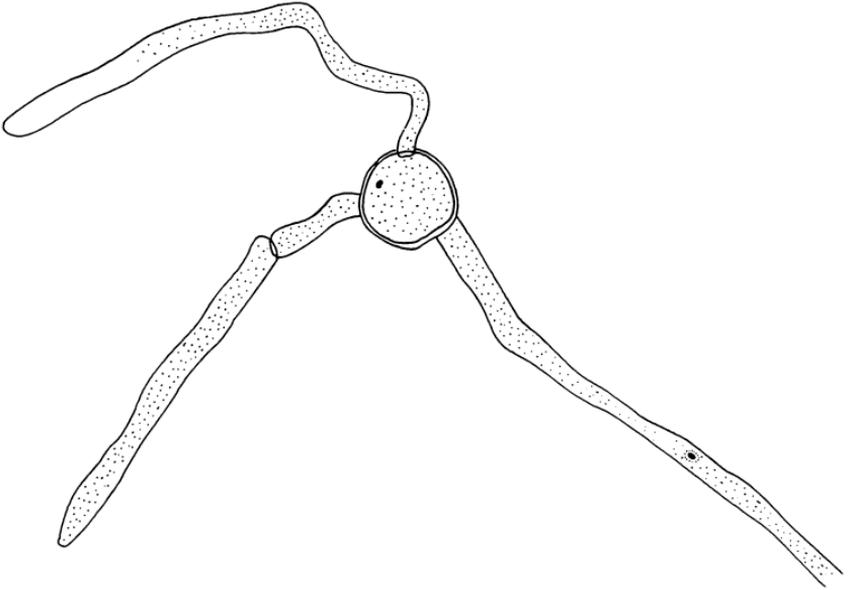


Fig. 2. Konidie mit drei Keimschläuchen, von denen bloß einer einen Kern besitzt.
Comp. Oc. 4. Obj. 7.

Eine solche ungestörte Verzweigung ist nur dann möglich, wenn die Konidien einzeln liegen. Sind viele Konidien auf einer kleinen Fläche nebeneinander, so können die meisten kaum auskeimen. Nahrungsmangel oder Stoffwechselprodukte dürfte die Ursache hierfür sein. Auch wenn es zu einer Keimung kommt, so entstehen bloß sehr dünne Hyphen, die sich gegenseitig stören und schließlich zugrunde gehen. Im besten Fall gelingt es manchmal einer Hyphe aus diesem Bereich herauszuwachsen. Das gelingt bloß durch einseitige Wachstumseinstellung und ohne viel Verzweigungen. Auch bei ungestörtem Wachstum ist auf solchen Objektträgerkulturen die Verzweigung und die Kernverteilung im neuentstandenen Mycel anfangs sehr unregelmäßig.

2. Weil die Nährstoffe in der dünnen Agarschicht bald aufgebraucht sind, und das Wachstum des Mycels leicht erlischt, so reicht diese Methode bloß zum Studium der ersten Keimungsstadien aus. Will man das Wachstum des Mycels länger beobachten, so muß man von einem Impflötzchen ausgehen, das man auf Agar in Petrischalen auslegt. Auf diese Weise kann ein radiäres Wachstum zustande kommen, und es konnte mit dem Okularmikrometer die Zunahme des Mycelradius in 24 Stunden sowie in noch kürzeren Zeiträumen gemessen werden.

Um den Einfluß der Nährstoffkonzentration gleich mit zu berücksichtigen, wurde in vier Petrischalen je 10 ccm 2proz. Agars, dem Pepton in einer Konzentration von 1, 0,1, 0,01 und 0 Proz. zugefügt wurde, ausgegossen (Vers. 31).

Am nächsten Tage war um das Impfstückchen ein Kranz von Hyphen zu beobachten. Mit einem Fettstift wurde an der Petrischale ein feiner Strich als Durchmesser über dem Impflötzchen gezogen und in diesem Bereiche in bestimmten Zeitabschnitten je zehn Messungen gemacht.

E. G. PRINGSHEIM konnte nach den Angaben K. O. MÜLLER'S (1922) bei *Saprolegnia monoiccia* durch Wachstumsmessungen, die er in Zeiträumen von einer Minute machte, einen konstanten Zuwachs beobachten. Bei *Basidiobolus* ist jedoch der Mycelzuwachs pro Minute mit dem Okularmikrometer nicht meßbar. Es mußte deshalb der Zuwachs des Mycelradius nach Zeiträumen von je 15 Minuten gemessen werden.

Das Mittel der Zuwächse wird in Teilstrichen des Okularmikrometers ausgedrückt:

1 Proz. Pepton; verdunkelter Thermostat. 30° C.

25. 6.	1	2	3	4	5	6
		0,4	0,1	0,5	0,3	0,5
	Mittel: 0,36					

0,1 Proz. Pepton.

	1	2	3	4	5	6
		0,7	1	0,4	0,9	1
	Mittel: 0,80					

0,01 Proz. Pepton.

	1	2	3	4	5	6
		0,4	0,5	0,4	0,8	0,6
Mittel:	0,54					

0 Proz.

	1	2	3	4	5	6
		0,5	0,4	0,2	0,6	0,5
Mittel:	0,44					

Eine gewisse Regelmäßigkeit trotz der großen Abweichungen im einzelnen ist an den Durchschnittswerten doch zu erkennen. Bei größeren Zahlenreihen würde sie wohl bestätigt werden. Sie entspricht ganz dem Befund von MÜLLER mit Pepton. Eine hohe Konzentration von Pepton hemmt das Wachstum, während bei niederen Konzentrationen das ohnehin schon lockere Wachstum durch den baldigen Aufbrauch der Nährstoffe leicht erlischt. R. SCHMIDT sieht im Sauerstoffmangel bei dichtem Mycelwachstum den begrenzenden Faktor, der verhindert, daß bei hohen Konzentrationen ein völliges Ausnützen und Durchwachsen des Nährbodens durch *Phycomyces Blakesleeanus* stattfindet. Bei geringeren Konzentrationen genüge ihm der Sauerstoffgehalt in der Schale schon vollkommen, um den Nährboden tiefer durchwachsen zu können.

Bei *Basidiobolus* ist auch der 24 stündige Zuwachs des Mycels sehr unregelmäßig, wie aus folgenden Tabellen hervorgeht:

Tabelle I.

Verdunkelter Thermostat. 30° C.

1 Proz. Pepton.

24. 6.—30. 6.	1	2	3	4	5	6	7
r	31,7	147,5	200,1	423,9	535,9	635,3	
Δ r	31,7	115,8	152,6	223,8	112,0	99,4	

Tabelle II.

0,1 Proz. Pepton.

Tage	1	2	3	4	5	6	7
r		58,4	240,9	446,6	700,6	881,4	1025,2
Δ r		58,4	182,5	205,7	254	181,8	143,8

Tabelle III.

0,01 Proz. Pepton.

	1	2	3	4	5	6	7
r		64,8	180,7	274,5	344,2	458,1	458,7
Δ r		64,8	115,9	93,8	69,7	113,9	0,6

Tabelle IV.

0 Proz.

	1	2	3	4	5	6	7
r		37	82	122,8	163,2	181,8	1,3
Δ r		37	45	40,8	40,4	18,6	1,2

Abgesehen von einer Zahl (Tab. III/6) überall dieselbe Regel: Das stärkste Wachstum um so später, je höher die Konzentration. Das Zahlenmaterial ist freilich gering. Besonders auffällig ist das allmähliche Aufhören des Wachstums bei den niederen Konzentrationen.

3. Diese Unregelmäßigkeiten kommen dadurch zustande, daß auch die einzelnen Hyphen untereinander nicht gleichmäßig wachsen. Ferner ist nicht nur das Wachstum der Haupthyphye, sondern auch die Anlage der Seitenhyphen und die daraus entstehende Verzweigung des Mycels sehr unregelmäßig.

Bei einem 2proz. Agar, dem 0,01 Proz. Pepton zugesetzt wurde, konnte man, da bei geringer Nährstoffkonzentration das Wachstum lockerer ist als bei höheren, die Verzweigung recht gut verfolgen. Es bestand hier nicht die Gefahr, daß die Hyphen sich überkreuzen (Fig. 3).

Wenn man das Wachstum einer Hyphe verfolgt, so kann man feststellen, daß ein Seitenzweig das meiste Plasma enthält und

durch eine Scheidewand, die normal oder schief auf die Wachstumsrichtung der Haupthyphe angelegt wird, von ihr getrennt wird. Es wächst in der Richtung der bisherigen Haupthyphe weiter, die oft fast rechtwinkelig abbiegt. Man wäre deshalb geneigt, von einer sympodialen Verzweigung zu sprechen. Die Haupthyphe bleibt jedoch keineswegs hinter der Seitenhyphe zurück, weil ihr der übrige Rest des Plasmas zum Weiterwachsen genügt. Sie überholt sie bald, biegt jedoch immer wieder seitlich aus. Der abgeschnürte Teil wächst dann gerade weiter und so kann sich das Spiel von neuem wiederholen. Es erfährt dadurch die Wachstumsrichtung

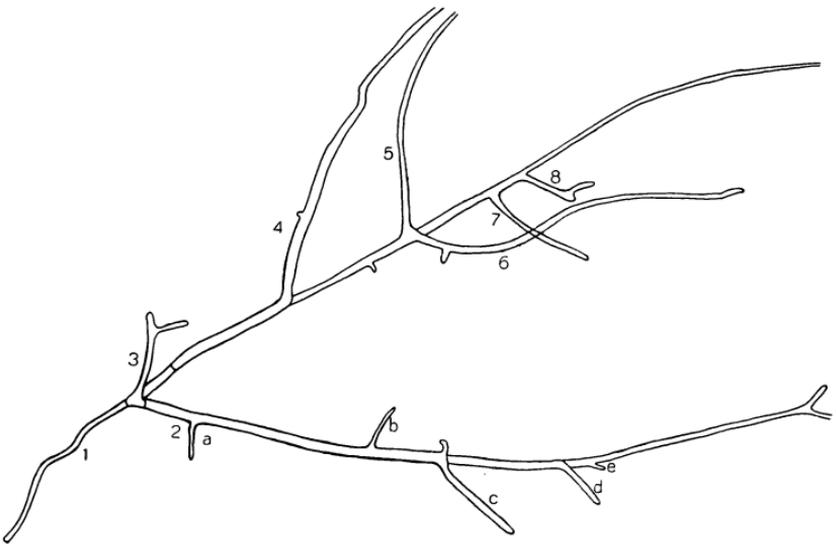


Fig. 3. Schematische Darstellung der Verzweigungsweise der Hyphen auf einen 0,01proz. Peptonagar. Comp. Oc. 4. Obj. 3.

stets eine Knickung, die bald auf der einen, bald auf der anderen Seite auftritt. Ferner wird die Verzweigung auch dadurch so unregelmäßig, daß außerdem eine große Menge von seitlichen Aussprossungen in allen möglichen Richtungen angesetzt wird, die im Gegensatz zu den Seitenhyphen sehr kurz sind und nicht lange lebensfähig zu bleiben pflegen. Die Zellen der Haupthyphe, die ihre Entwicklung in der Wachstumsrichtung fortsetzen, verbleiben nicht immer im innigen Zusammenhang miteinander. Es macht eher den Eindruck, als ob eine Zelle auf die andere aufgesetzt wäre und ganz unabhängig im Zellverband stände. Eine vollständige Trennung der Zellen voneinander wie bei den Entomophthoraceen kommt hier nicht vor, worauf schon LAKON (1926)

hinwies. Es braucht also bloß eine Zelle ihre Wachstumsrichtung zu ändern und seitlich auszuweichen, um schon eine sympodiale Verzweigung vorzutäuschen. In alten Mycelien auf Agar ist eine Rekonstruktion und Deutung der Verzweigung noch schwerer, weil hier das Plasma auf bestimmte Strecken konzentriert ist und die plasmaleeren Hyphen unsichtbar werden. Auch die Zahl der Verzweigungen einer Mutter- und Tochterhyphe in einem bestimmten Abschnitt ist nicht so konstant, wie sie MÜLLER (1922) für *Saprolegnia monoica* oder SCHMIDT (1925) für *Phycomyces Blakesleeanus* fand.

Die Intensität der Verzweigung innerhalb einer gewissen Strecke konnte nur bei Berücksichtigung der Tochterhyphen und aller seitlichen Aussprossungen bestimmt werden. Aus dem Mittel von 30 Messungen innerhalb eines Abschnittes von 50 Teilstrichen des Okularmikrometers ergab sich bei einem Nährboden von 0,01 Proz. Peptonagar eine Zahl von 4,1 Auszweigungen.

Wurden auf einer Petrischale mit 0,01 Proz. Peptonagar in einer Entfernung von 4 bis 5 cm zwei Impfkümpchen aufgelegt, so konnte auch bei diesem Objekte beim Entgegenwachsen der Mycelien ein Hem-

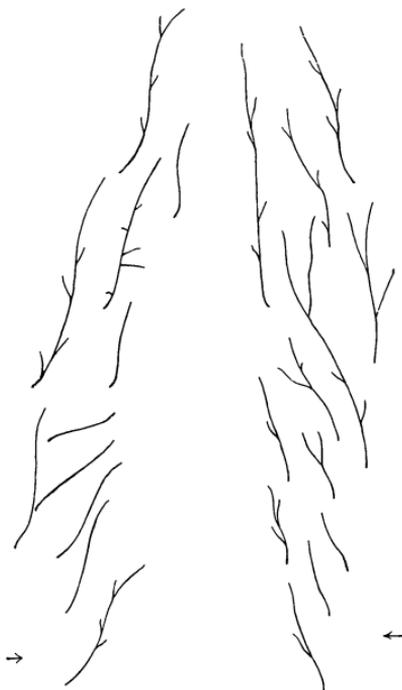


Fig. 4. Schematische Darstellung des Hemmungsraumes, der sich beim Entgegenwachsen zweier Agarkulturen bildet. Das Abweichen der Hyphen von der ursprünglichen Wachstumsrichtung ist zu beachten.
Binoc.

mungsraum gesehen werden. K. O. MÜLLER machte den Versuch mit *Saprolegnia monoica* und konnte zeigen, daß die Breite der Gasse mit der Nährstoffkonzentration zunimmt und daß diese ganze Erscheinung durch die vorausdiffundierenden Stoffwechselprodukte zu erklären ist. SCHMIDT beschrieb einige typische Hemmungsräume bei *Phycomyces Blakesleeanus*, *Mucor spinosus*, *hiemalis* und *Mucedo*. Er glaubt diese Erscheinungen umständlicher durch Nahrungsmangel (besonders der C- und N-Quelle) und durch steigende Alkalität erklären zu sollen. Die Tatsache, daß die Hemmungs-

zone mit der Nährstoffkonzentration zunimmt, spricht für Stoffwechselprodukte, wohl NH_3 und gegen Nahrungsmangel.

In unserem Falle ist der Hemmungsraum über 100 Sklalentile des Okularmikrometers breit. Betrachtet man die Hyphenspitzen solcher einander entgegenwachsender Mycelien näher, so sieht man ein plötzliches Abweichen von der Wachstumsrichtung. Es treten sehr viele Torsionen der Hyphen auf, und die ganze Wachstumsrichtung

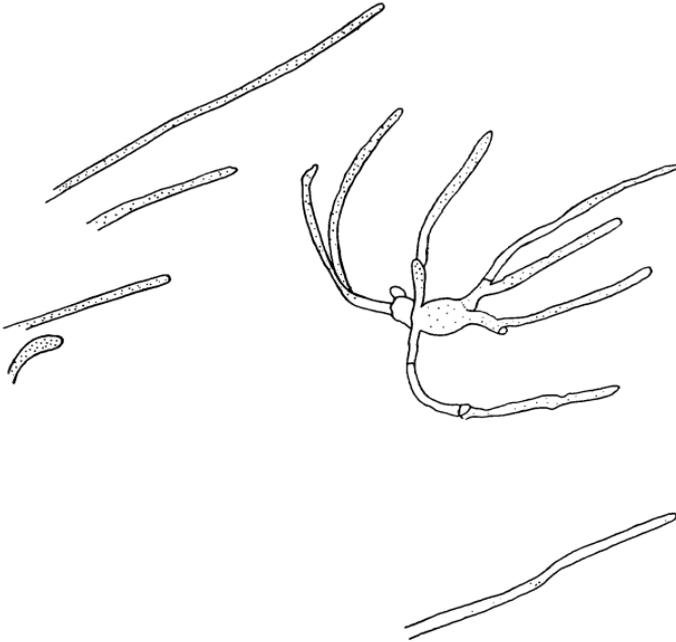


Fig. 5. Gegenseitige Hemmung der Mycelien beim Wachstum. Comp. Oc. 2. Obj. 4.

der beiden Mycelien verläuft dann parallel. Schließlich sind alle Hyphen samt Zygoten einander parallel gelagert, während den ohnehin breiten Hemmungsraum nur kleine, sterile und verkrümmte Hyphen kreuz und quer durchziehen. Eine Überschneidung der Hyphen und eine Ausbildung von Luftmycel wie bei *Mucor Mucedo* konnte hier nicht beobachtet werden (Fig. 4).

Jüngere Konidienmycelien lenken sich auch ab, wenn sie gegeneinander wachsen, wobei sie ihr Wachstum nur in einer Richtung fortsetzen (Fig. 5).

b) Zygoten.

Lenkt man bei seinen Untersuchungen das Augenmerk mehr auf die Vorgänge im Zellinnern, so kann man aus der Verteilung des Plasmas in den einzelnen Zellen noch andere Gesetzmäßigkeiten herauslesen.

1. Es ist beim vegetativen Mycel des *Basidiobolus* auffällig, daß man plasmaleere und plasmaerfüllte Teile findet, die dadurch zustande kommen, daß beim Wachstum ein Teil des Plasmas stets an der Spitze mitfließt, während ein anderer Teil im Mycel zurückbleibt. Auf welche Weise die Plasmawanderung durch die Zellwand hindurch vor sich geht, ist schwer zu entscheiden. Die Grenze zwischen der plasmaleeren und plasmaerfüllten Stelle liegt meist in der Mitte der Zelle und wird auf keinen Fall durch die Zellwand gebildet. Doch dieses Plasma bleibt nicht unbenützt; der *Basidiobolus* geht damit, wie schon EIDAM sagte, sehr haushälterisch um.

Nach kurzer Zeit treiben zwei benachbarte Zellen, die an ihren angrenzenden Stellen Plasma besitzen, je eine Ausstülpung hervor. Diese beiden Ausstülpungen werden, beiderseits eng aneinander geschmiegt, bald länger und nehmen die Form eines Schnabels an. Dieses eigentümliche Gebilde hat schon frühzeitig die Aufmerksamkeit auf sich gelenkt und ist von EIDAM sehr genau beschrieben worden. Bald darauf schwillt die eine der beiden Zellen, die diese Ausstülpungen gebildet hatten, kugelig an und nimmt das Plasma angrenzender Zellen in sich auf. Die Geschwindigkeit des Plasmaflusses ist sehr groß; in einer Stunde kann alles Plasma in der Zelle vereinigt sein. Das Plasma ist in diesem Falle sehr körnig und enthält viele Reservestoffe, die sich bei der Kernfärbung mit Eisenhämatoxylin nach HEIDENHEIN stark mitfärben. Man dürfte es hier mit Volutinkörnern zu tun haben. Die Blaufärbung mit Methylenblau und 1proz. konz. H_2SO_4 , die A. MEYER angibt, war zwar nicht sehr intensiv; doch die zweite Volutinreaktion mit Methylenblau und Jodjodkali zeigte starke Schwärzung.

2. Schließlich fließt dann durch ein Loch, das sich jetzt bildet und das sich in der Scheidewand zwischen beiden Zellen befindet, noch der letzte in den Zellen übrig gebliebene Rest des Plasmas in die verdickte Zelle über und der Kopulationsprozeß ist in vollem Gange ¹⁾.

Darauf umgibt sich dieses neue Gebilde bald mit einer dicken Haut und wird zur Zygote, an der die Schnäbel noch lange als plasmaleere Fortsätze sichtbar sind und durch eine Scheidewand abgetrennt erscheinen. Die unreifen Zygoten sind weiß und besitzen ein glattes Exosporium. Nach der Ausreifung bräunt es sich und bekommt ein warziges und verdicktes Häutchen. Auch schwarze

¹⁾ Über die Kernverhältnisse siehe unten.

Zygoten bildet der *Basidiobolus* aus. Sie sind meist runde oder ovale Klumpen und besitzen an ihrem Exosporium spitze Fortsätze und scharfkantige Warzen. Solche Zygoten wurden bloß von EIDAM in Froschexkrementen gefunden; in künstlichen Substraten treten sie nie auf. Vielleicht sind nur diese reif und wirklich keimfähig!

c) Konidien.

Auch das Plasma, daß sich in den Spitzen der Hyphen befindet, wird früher oder später zur Erzeugung neuer Gebilde verwendet. Es kommt nämlich dort zur Ausbildung von Konidien, deren Entstehungsweise EIDAM an Hand guter Abbildungen beschrieben hat.

1. Die ersten Anzeichen einer Konidienbildung geben sich darin kund, daß eine Hyphe sich vom Substrat erhebt und in die Luft wächst. An ihrer Spitze entsteht bald eine kolbige Anschwellung, die sich unter Hinzuströmen von Plasmamassen immer mehr vergrößert. Hat diese Anschwellung, die EIDAM ganz unzutreffend Basidie nennt, eine gewisse Größe erreicht, so kommt an ihrer Spitze eine kleine Papille zum Vorschein. Das ganze Plasma verschwindet nun bald aus der „Basidie“ und wandert in die neu entstandene Papille, die immer größer wird und sich bald abschnürt. Sie rundet sich vollständig ab und erscheint der plasmaarm gewordenen Hyphe, die wir Konidienträger nennen wollen, aufgesetzt. Die Konidie ist hiermit fertig.

2. Über das weitere Schicksal der Konidie erfährt man von EIDAM, daß sie dann mit einem Stück ihres Trägers, den sie auf dem Wege verliert, weggeschleudert wird. Dieses gewaltsame Abschleudern will EIDAM dadurch erklären, daß durch den stetig wachsenden Druck im Konidienträger die Dehnungsmöglichkeit der Membran ihre Grenze bald überschreitet und sie deshalb platzt. Die Flugweite der Konidie betrage 2—3 cm.

Genaue Bilder über die Entstehung und Abschleuderung der Konidien sind bei EIDAM zu finden.

Die Ansicht von dem Abschleudern der Konidien wird später noch von LOEWENTHAL und OLIVE vertreten.

In dieser Hinsicht stellte ich auch einige Beobachtungen an. Ich beobachtete in Petrischalen auf Agar ein fruktifizierendes Mycel, um das in großer Menge Konidien in den verschiedensten Keimstadien herumlagen. Ich hatte nun das Glück, die Beobachtung machen zu können, wie der Konidienträger gleichsam unter der Last der prallen reifen Konidie zusammenbricht. Letztere kommt

dadurch auf den Agar zu liegen und kann eventuell gleich auskeimen. Manchmal kann sie noch mit dem Rest des Trägers ein Stückchen weiterrollen. Von einem Abschießen kann also wohl hier nicht die Rede sein.

Um auch experimentell diese Vorstellung zu überprüfen, wurde die untere Petrischale, die ein fruktifizierendes Mycel enthielt, mit dem Deckel zugedeckt, an dessen Innenseite zwei mit Agar belegte Objektträger angeklebt waren. Der Abstand, den die Konidien zu durchfliegen hatten, war also gleich der Höhe der Petrischale und zwar ungefähr 0,5 cm. Um jeden Luftzug zu vermeiden, wurde die Schale fest in Papier eingewickelt und sich selbst überlassen. Es konnten jedoch keine abgeschossenen Konidien beobachtet werden.

Diese Beobachtungen müßten noch durch eine Reihe von Versuchen bestätigt werden. Vielleicht findet ein Abschießen nur unter natürlichen Bedingungen statt, während bei unseren Kulturversuchen möglicherweise doch noch irgendwelche Störungen auftreten. Wahrscheinlicher aber ist es, daß sich EIDAM durch die Ähnlichkeit mit anderen Pilzen, vielleicht *Pilobolus* oder *Empusa* hat täuschen lassen und daß gar kein Abschleudern stattfindet. Dann trüge der Pilz seinen Gattungsnamen sehr zu Unrecht; doch kann das natürlich kein Grund sein, ihn zu ändern.

IV. Cytologie der Befruchtung.

a) Deutung der bisherigen Befunde.

Die ersten Angaben über die Kernverhältnisse vor der Befruchtung des *Basidiobolus ranarum* finden sich schon bei EIDAM. Da jedoch seine Bilder wegen der unvollkommenen Fixierung und Färbung nicht die richtige Klarheit in diese Dinge bringen konnten, so versuchte FAIRCHILD an Mikrotomschnitten, die er mit FLEMMING'S „Dreifarbenverfahren“ färbte, die Sache noch genauer zu untersuchen. Es ist ihm auf Grund seiner Abbildungen gelungen, uns ein genaues Bild der Kernverhältnisse vor der Befruchtung zu geben. LOEWENTHAL, der die Morphologie und Cytologie des *Basidiobolus lacertae*, die mit dem *Basidiobolus ranarum* fast vollkommen identisch ist, beschrieb, steht mit seinen Angaben ganz im Gegensatz zu FAIRCHILD. Er zweifelt nämlich manche Einzelheiten, die FAIRCHILD bei der Besprechung des Kernteilungsvorganges angibt, an, ohne sie jedoch durch bessere Zeichnungen widerlegen zu können. OLIVE hat schließlich die betreffenden Gegensätze dadurch

zu klären versucht, daß er sowohl die generative als auch die vegetative Kernteilung nochmals untersuchte und einen Vergleich zwischen beiden zog. Neben einer Bestätigung der Angaben FAIRCHILD's gibt er an, daß bloß zwei ganz geringe Unterschiede zwischen beiden Kernteilungen beständen. Es würde erstens bei der generativen Kernteilung in den Schnabelzellen die Querwand zur Abschnürung der beiden Tochterkerne schon bei Bestehen der Spindel angelegt, während bei der vegetativen Teilung eine Zellwand erst nach der Regeneration der Tochterkerne aufträte. Zweitens träten bei der generativen Teilung die sog. „archoplasmatischen Gebilde“ an den Polen der hier auftretenden vielpoligen Spindeln nicht so deutlich hervor wie bei der vegetativen Teilung.

Da jedoch diese „generative“ Kernteilung von LOEWENTHAL und anderen Zoologen als Reduktionsteilung aufgefaßt wird, ohne daß besondere Beweise für ihre Anschauung auf Grund eindeutiger Abbildungen angegeben worden wären, so mußten diese Verhältnisse noch einmal nachgeprüft werden. Dabei sollten ganz besonders die ersten Stadien der Prophase berücksichtigt werden, weil nur hier vor allem jene Figuren auftreten müßten, die eine solche Anschauung beweisen können.

b) Methodik.

Zu diesem Zwecke wurde mit Vorteil die schon erwähnte Methode nach KNIEP angewendet. Sie gestattet es nämlich, jederzeit die Entwicklung des Pilzes zu übersehen und im geeigneten Augenblick mit der Fixierung zu beginnen. Es wurden zuerst Petrischalen mit 2proz. Agar, dem Pepton in einer Menge von 0,01 Proz. zugesetzt wurde, gegossen. Nach Beimpfung wurden die Schalen umgedreht aufgestellt und in ihren Deckel gut entfettete Objektträger gelegt. Die Entfettung erfolgte durch Kaliumbichromat und konzentrierte Schwefelsäure. Die Objektträger wurden mit einer Pinzette in ein Zylinderglas mit heißem 2proz. Agar, dem 0,1 Proz. Pepton beigemischt war, getaucht. Nach dem Entfernen der Objektträger aus dem Glase blieb eine dünne Agarschicht übrig, die geeignet war, um ihn mit der einen Seite an der Schale anzukleben, während sie an der anderen Seite den von oben herunterfallenden Konidien zur Keimung genügte. Bei geeigneter Entwicklung des Mycels und Ausbildung der Schnäbel wurden die Objektträger in toto 24 Stunden in schwacher Chromessigsäure fixiert, nach mehrmaligem Waschen in Leitungswasser eine Stunde in 3proz. Eisenalaun gebeizt, nach neuerlichem Abspülen in destilliertem

Wasser 15 Minuten in Eisenhämatoxylin nach HEIDENHEIN gefärbt und schließlich zwei Minuten in 2,5proz. Eisenalaun differenziert. Nach Entwässerung in den üblichen Alkoholreihen wurden die Präparate in Xylol-Kanadabalsam eingeschlossen. Obgleich Reservestoffkörnchen (Volutin) mitgefärbt waren, konnte man die Kerne doch gut erkennen.

c) Bestätigung der Befunde FAIRCHILD'S und OLIVE'S.

Die Ruhekerne in den Schnäbeln besitzen bald ein größeres, bald ein kleineres Kernkörperchen, das häufig vakuolisiert ist und

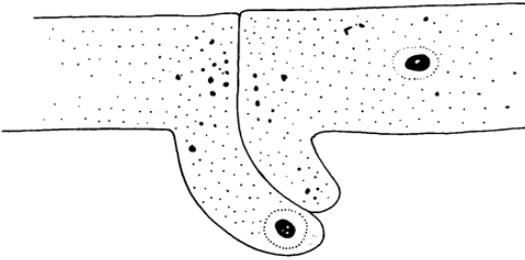


Fig. 6. Vor dem Geschlechtsakt: Der eine Kern ist bereits in der Schnabelzelle, der andere befindet sich noch auf dem Wege. Comp. Oc. 4. Hom. Imm.

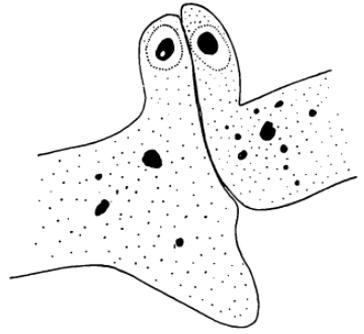


Fig. 7. Die beiden Ruhekerne in den Schnäbeln. Comp. Oc. 4. Hom. Imm.

in einem Chromatingerüst von annähernd radiärer Struktur liegt. Öfters kann man auch eine verdickte Kernmembran sehen (Fig. 6 u. 7). Die Abbildungen FAIRCHILD'S und OLIVE'S stimmen mit meinen Beobachtungen vollkommen überein. LOEWENTHAL, der alles sehr schematisiert wiedergibt, spricht hier von einem langgestreckten Karyosom, das in einer achromatischen Zone liege. Viel mehr gehen die Angaben FAIRCHILD'S und LOEWENTHAL'S bei den ersten Teilungsstadien auseinander. Das Schwinden des Kernkörperchens in der Prophase, wie es FAIRCHILD angibt, konnte von mir bestätigt werden. Hier lenkte LOEWENTHAL seine größte Aufmerksamkeit auf die Vakuolen des Kernkörperchens hin und wollte einen Zerfall des Karyosoms durch sie beobachtet haben. Doch das scheint nicht richtig zu sein; ich habe viele solcher Kerne genau untersucht, ohne jedoch irgendeine Gesetzmäßigkeit in der Anordnung dieser Vakuolen finden zu können.

In den frühesten Stadien der Prophase sind die Kerne bloß als unregelmäßig begrenzte und annähernd rechteckig aussehende Gebilde zu sehen, in denen eine Parallelstreifung schwach zu erkennen ist (Fig. 8).

In diesen Stadien jedoch müßte wohl, falls es sich wirklich um eine Reduktionseinteilung handeln sollte, eine Art Synapsis oder Diakinese zu beobachten sein. Darüber ist jedoch LOEWENTHAL hinweggegangen und hat seine Behauptung bloß auf das spätere Abstoßen der beiden Kerne in der abgeschnürten Schnabelzelle gestützt, was er mit der Bildung von Richtungskörperchen bei der Eireifung im Tierreiche verglich. Dies ist jedoch noch lange kein Beweis für eine heterotypische Kernteilung.

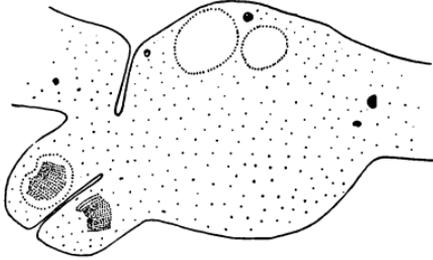


Fig. 8. Prophase: Das Kernkörperchen ist verschwunden. Der Kern ist jetzt von unregelmäßiger Gestalt und zeigt eine leichte Parallelstreifung. Comp. Oc. 4. Hom. Imm.

Bei den Phycomyceten ist zwar über die Phasen einer heterotypischen Teilung nichts bekannt. Die Kerne sind meist sehr klein und schwer zu untersuchen. Bei den Ascomyceten werden bei den ersten Teilungen im Ascus Stadien angegeben, die einer Reduktionsteilung entsprechen; doch stimmen sie mit den Bildern, wie wir

sie bei den höheren Pflanzen zu sehen gewohnt sind, bei weitem nicht überein. Die Kleinheit der Kerne macht auch hier die Erkennung von Einzelheiten fast unmöglich. Erst bei den Uredineen, z. B. bei den keimenden Äcidiosporen von *Endophyllum Sempervivi* sind eindeutiger Stadien gefunden worden. Es ist dort an der einseitigen Anlagerung der chromatischen Substanz im Kern das Stadium der Synapsis gut zu erkennen. Ferner kann man dort das Heraufdifferenzieren der Chromosomen bei noch geschlossener Kernmembran, die Diakinese und schließlich die zweite Teilung gut beobachten (TISCHLER 1921/22). Doch in unserem Falle ist in der Prophase kein solches Stadium zu erkennen, das wegen der großen Kerne gut hervortreten müßte.

Es treten hier bloß die breitpoligen Spindeln (Fig. 9) auf, wie sie auch FAIRCHILD in Fig. 3 bis 6 seiner Abhandlung wiedergibt. Die Parallelstreifung scheint doch in die „Spindel“ überzugehen. Die Nucleolen sind schon vorher verschwunden. Es bleibt also fraglich, ob ihr Chromatin sich in den Chromosomen wiederfindet

und wie diese sich bilden. Die Chromosomen, die sehr klein sind und in großer Anzahl auftreten, sind in der Mitte in Form einer Äquatorialplatte angeordnet, was aus Fig. 4 bei OLIVE gut zu sehen ist. Die Pole dieser Spindeln sind etwas stärker kontouriert. Das sind nämlich die sog. „Polplatten“, die OLIVE als „archoplasmatische Gebilde“ anspricht und die nach seinen Angaben in den Teilungsphasen der vegetativen Zellen stark hervortreten sollen. Dieses Stadium ließe sich bei LOEWENTHAL höchstens mit seiner Fig. 61 vergleichen; doch neben einer falschen Wiedergabe der Polplatten ist die Abbildung stark schematisiert und der Vergleich mit „Ringen und Walzen“ unzutreffend.

Das Auseinanderweichen der Chromosomen, wie es FAIRCHILD in Fig. 6 angibt, konnte ebenfalls beobachtet werden (Fig. 9 u. 10).

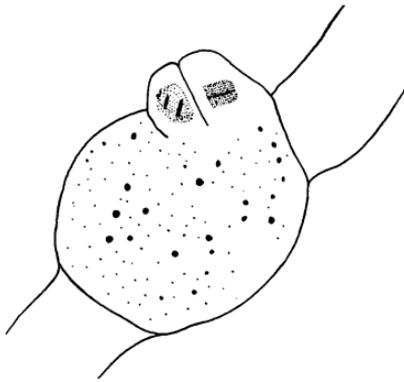


Fig. 9. Die Parallelstreifung geht in die Spindel über. Die Chromosomen sind in Form einer Äquatorialplatte angeordnet. Comp. Oc. 4. Hom. Imm.

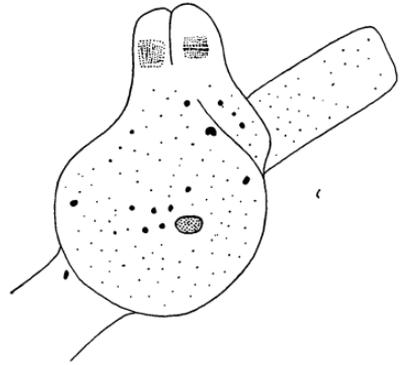


Fig. 10. Das Auseinanderweichen der Chromosomen. Comp. Oc. 4. Hom. Imm.

In den Anaphasen sind die Chromosomen schon an den Polen der Spindeln zu finden und ordnen sich dort in breiter Front an, wobei die Spindelfasern noch ihre parallele Stellung beibehalten (Fig. 11). Bei LOEWENTHAL dürfte dieses Stadium seiner Fig. 62 entsprechen; doch ist die Deutung mit vier färbbaren Gebilden unrichtig.

Schließlich seien noch die stark entwickelten Spindeln der Telophase zu erwähnen, deren Fasern fast die Membran der Schnabelzellen berühren und die von FAIRCHILD bei den Schnabelzellen wie von OLIVE bei den vegetativen Zellen durch Fig. 16 in mustergültiger Weise wiedergegeben wurden. Sie sind bei einer genügenden Anzahl von Präparaten leicht zu finden (Fig. 11 u. 12), scheinen aber LOEWENTHAL vollkommen entgangen zu sein. Man

findet bei ihm höchstens die Anlagen der beiden Tochterkerne angegeben. Da die Teilungen in den Schnäbeln nicht gleichzeitig vor

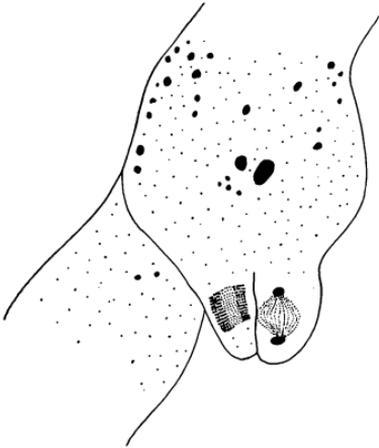


Fig. 11. Im linken Schnabelteil ist das Stadium der Anaphase erreicht worden. Die Chromosomen haben sich an den Polen in breiter Front angeordnet. Die Spindelfasern sind noch parallel. Im rechten Teil sind die Spindeln der Telophase zu sehen. Comp. Oc. 4. Hom. Imm.

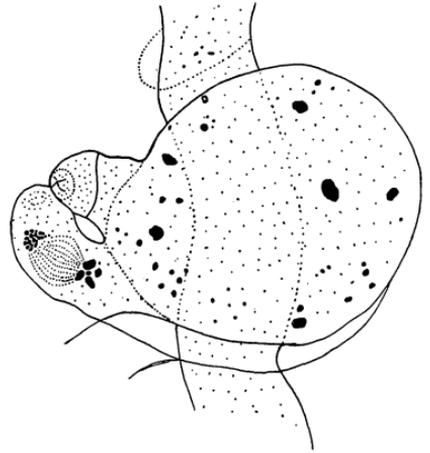


Fig. 12. Telophase im unteren Schnabelzellenteil. Comp. Oc. 4. Hom. Imm.

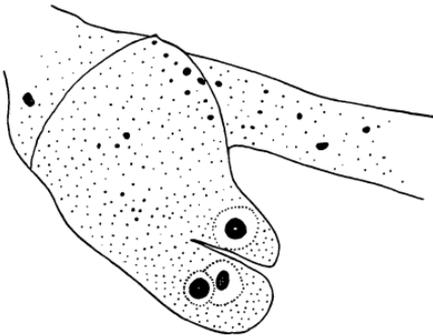


Fig. 13. Ein Tochterkernpaar in der unteren Schnabelzelle. In der oberen ist der zweite Kern nicht mehr zu sehen. Comp. Oc. 4. Hom. Imm.

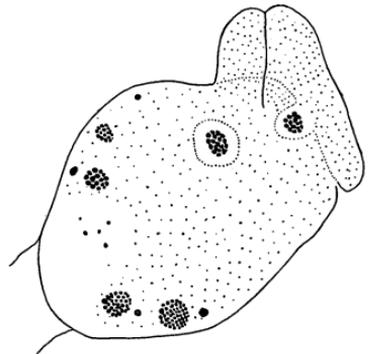


Fig. 14. Wanderung der beiden Tochterkerne in den verdickten weiblichen Gameten. Comp. Oc. 4. Hom. Imm.

sich gehen, so hat man Gelegenheit, in einem Schnabel eine Anaphase, in dem anderen eine Telophase zu sehen.

Später kann man höchstens Paarkerne in den Schnabelzellen

beobachten (Fig. 13), von denen in jeder Schnabelzelle der basale Tochterkern in den verdickten weiblichen Gameten übertritt (Fig. 14) und sich dort an den Eikern eng anlegt (Fig. 15), während die beiden oberen Tochterkerne durch eine Membran abgeschnürt werden und zugrunde gehen. In diesem Punkte stimmen alle Autoren überein. Die angeschwollene Zelle umgibt sich dann mit einer dicken Haut und wird zur Zygote, in der nach vier Tagen durch Mikrotom-schnitte ($5\ \mu$) das Kernpaar nachgewiesen werden konnte (Fig. 16). RACIBORSKI und CHMIELEVSKY konnten noch nach zwei Wochen das

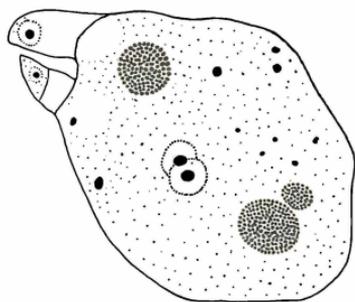


Fig. 15. Enges Aneinanderliegen der Kopulationskerne in der verdickten weiblichen Zelle, die später zur Zygote wird.
Comp. Oc. 4. Hom. Imm.

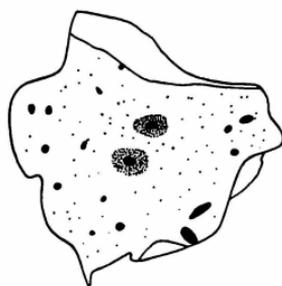


Fig. 16. Junge Zygote vor der Verschmelzung der Kopulationskerne. Querschnitt $5\ \mu$. Comp. Oc. 4. Hom. Imm.

Kernpaar in den Zygoten finden, weil erst nach vier Wochen eine Kernverschmelzung eintrat. Die Angaben WOYCICKIS über vielkernige Zygoten dürften wohl nicht der Wahrheit entsprechen. Er ist durch Reservestoffe irregeleitet worden.

d) Widerlegung der Annahme LOEWENTHAL'S u. a. einer Reduktionsteilung

Es findet sich also im Kernteilungsprozeß nichts, was als Stütze für die Auffassung von LOEWENTHAL dienen kann.

Betrachtet man die Frage vom vergleichend morphologischen Standpunkte, so findet man auch bei anderen Pilzen Fälle von Zellabschnürung und -verschmelzung, ohne daß dies etwas mit einer Reduktionsteilung zu tun hätte. So werden z. B. bei *Phragmidium speciosum* bei der Äcidiosporenbildung die Zellen der Hyphenspitzen abgeschnürt und bleiben steril. Die Sporen entstehen aus je zwei benachbarten Zellen, die sich unterhalb der Spitze befinden. Zwischen

diesen beiden Zellen wird die Kernwand aufgelöst, die Zellen verschmelzen, es treten Kernteilungen auf, je ein neu entstandenes Kernpaar umgibt sich mit einer Membran und wird zur Spore.

Fassen wir nun die Gründe zusammen, die dagegen sprechen, in den Teilungen der Schnabelzellen des *Basidiobolus* eine Reduktionsteilung anzunehmen. Erstens wird in jeder Zelle bloß eine Kernteilung beobachtet. Es unterbliebe also die homöotype Kernteilung, was bisher in keinem Falle bei Pflanzen bekannt geworden ist. Zweitens war es unmöglich, in den Prophasestadien eine Synapsis oder Diakinese zu finden. Schließlich spricht noch die Ähnlichkeit der Teilungen in den Schnabelzellen mit den vegetativen Kernteilungen, worauf OLIVE hinwies, dagegen. Man kann also die Kernteilungen in den Schnäbeln als rein vegetativ auffassen.

e) Eigene Vermutungen in Analogie mit anderen Pilzen.

Wenn man schließlich in der Literatur über den Ort der Reduktionsteilung bei näher verwandten Pilzen nachliest, so wird man schon aus bloßer Analogie eine Reduktionsteilung an dieser Stelle nicht mehr vermuten wollen. BURGEFF glaubt bei *Phycomyces* in der keimenden Zygote eine Reduktionsteilung suchen zu müssen. CLAUSSEN, KRÜGER und MÜCKE suchten bei *Saprolegnia monoica*, *Albugo candida*, *Peronospora Ficariae* und *Achlya polyandra* vergebens vor der Befruchtung nach einer Reduktionsteilung. Auch sie vermuten eine solche in der keimenden Zygote.

Da wir nun den Entwicklungszyklus des *Basidiobolus ranarum* nicht ganz kennen, so wäre es nicht ausgeschlossen, daß die Reduktionsteilung auch hier in der keimenden Zygote zu suchen wäre. Diese Vermutung ließ sich leider nicht bestätigen, weil die Keimung der Zygoten nicht erzielt werden konnte.

V. Zusammenfassung.

1. Prüft man die Bedingungen der Zygotenbildung bei *Basidiobolus ranarum* EIDAM an Nährlösungen mit Pepton und KNO_3 , so kann man meist feststellen, daß eine Konzentration von 1 Proz. KNO_3 und 0,05 Proz. Pepton eine reichliche Zygotenbildung und bräunung hervorbringen kann. Es mußte das Material aus einer schwachen Nährlösung stammen und der Versuch 25 Tage im verdunkelten Thermostaten bei 30°C aufgestellt bleiben.

2. Es wurde versucht, braune, aus der Kultur gewonnene Zygoten, die ein Alter von drei Monaten nicht überschritten hatten,

durch verschiedene äußere Einflüsse zur Keimung zu bringen. Man versuchte dies durch Einwirkung von Säuren und Alkali, durch proteolytische Fermente in künstlicher Zusammensetzung und in Form von Magen- und Darmsaft von Fröschen, durch Austrocknen und Auflegen auf Leitungswasseragar zu erzielen. In keinem Falle konnte eine Keimung beobachtet werden.

3. Die Angaben EIDAM's über die Morphologie konnten größtenteils bestätigt werden; nur konnte ein Abschleudern der Konidien bei unseren Kulturmethode nicht beobachtet werden. Die Zygoten- und Konidienbildung wurde in zahlreichen Abbildungen wiedergegeben. Bei der Messung des Wachstums und der Verzweigungsdichte ergaben sich sehr unregelmäßige Werte.

4. Es wurden die widersprechenden Angaben über die Kernverhältnisse in den Schnabelzellen nachgeprüft. An Hand von reichlichem Material konnten die Angaben FAIRCHILD's und OLIVE's bestätigt werden, nicht aber die LOEWENTHAL's. Nicht nur das Ausbleiben einer zweiten Teilung, sondern auch das Fehlen eines Synapsis- oder Diakinesestadiums, lassen fast mit Gewißheit annehmen, daß es sich hier um eine Art vegetativer Teilung handelt, wie wir sie auch bei anderen Pilzen an dieser Stelle finden. Den Ort für eine Reduktionsteilung muß man an anderer Stelle und zwar in der uns noch unbekanntem diploiden Phase des Organismus, der bei der Keimung der Zygoten entsteht, suchen.

VI. Nachtrag.

Ein Jahr nach Beendigung der Versuche erschienen noch einige Arbeiten, über die ich an dieser Stelle einiges berichten will. In den „Jahrbüchern für wissenschaftliche Botanik“ Bd. 66, 1927, berichtet IDA LEVISOHN von ihren Infektionsversuchen, die sie an Fröschen mit dem *Basidiobolus ranarum* vornahm. Es gelang ihr jedoch auch nicht, bei Fütterung von Fröschen mit *Basidiobolus*zygoten letztere zur Keimung zu bringen. Im übrigen bestätigt sie in ihrer Arbeit, die den Titel „Beiträge zur Entwicklungsgeschichte und Biologie von *Basidiobolus ranarum* EIDAM“, führt, das Vorhandensein einer Darmform bei obengenanntem Pilze, wie es schon LOEWENTHAL seinerzeit vermutete. Schließlich glaubt sie noch den Entwicklungsgang des *Basidiobolus* geklärt zu haben, indem sie nachweist, daß die Frösche durch Käfer aus der Gruppe der Carabidae u. a. infiziert werden, die die Konidien, die aus dem Froschkot auf sie geschleudert werden, verschleppen. Sie werden dann gefressen, und im Darm

des Frosches zerfällt die Konidie in die Darmform, die so charakteristisch ist.

Einen Beitrag zur Frage der Reduktionsteilung bei *Basidiobolus* lieferte weiter nach Niederschrift dieser Arbeit ZYGMUNT WOŹCICKI in zwei Abhandlungen: Über die Zygotenbildung bei *Basidiobolus ranarum* EIDAM II, Flora N. F. 22. 1927, und Sur la formation des zygosporos chez *Basidiobolus ranarum* EIDAM II, Acta Soc. Bot. Polon 5, 1927. Er bestätigte die früheren Angaben, daß die Kopulation der Kerne in sehr jungen Zygoten stattfindet. Neu sind jedoch die Angaben über das weitere Verhalten des Kopulationskernes in der Zygote. Der Kopulationskern teilt sich, bildet sog. Dyaden, Kerne, die sich bald darauf wieder teilen und „Tetraden“-Kerne liefern. Der Teilungsvorgang ist sehr primitiv und ermöglicht keine Chromosomenzählung. Später degenerieren drei Kerne, so daß die Zygote allmählich drei-, zwei- und schließlich einkernig wird. Hiermit würde also die Reduktionsteilung bei *Basidiobolus ranarum* unmittelbar nach der Kernverschmelzung in der Zygote stattfinden, was an die Verhältnisse bei *Spirogyra calospora*, *Sp. longata* und *Sp. neglecta* erinnert. Das Mycel des *Basidiobolus* stellt demnach eine langandauernde X-Phase dar. Die zwei X-Phase ist bloß im Kopulationskern gegeben.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 2. Dezember 1925 bis zum 30. Juni 1926 im pflanzenphysiologischen Institute der Deutschen Universität in Prag ausgeführt. Die Anregung zu ihr ging vom Herrn Prof. Dr. ERNST G. PRINGSHEIM aus, dem ich meinen besten Dank ausspreche.

Literaturverzeichnis.

- ABDERHALDEN, E.: Biochemisches Handlexikon. Bd. 5 1923.
 ALLEN, CH. E.: Die Keimung der Zygote bei Coleochaete. Ber. d. Deutsch. bot. Ges. Bd. 23 1905.
 BĚLAŘ, K.: Der Formenwechsel der Protistenkerne. p. 129. Jena 1926.
 BREFELD, O.: Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze. H. 1 1872, H. 4 1881.
 —: Vorträge über kopulierende Pilze. Sitz.-Ber. d. Ges. naturf. Freunde. Berlin 1875.
 —: Methoden zur Untersuchung der Pilze. Landw. Jahrb. Bd. 4 1875.
 BURGEFF, H.: Untersuchungen über Variabilität, Sexualität und Erbllichkeit bei *Phycomyces nitens* KUNTZE. I. II. Bd. 107, 108. Flora 1914, 1915.

- CHMIELEVSKY, V.: Matériaux pour servir a la morphologie de proces sexual chez les plantes inferieures. Charkow 1890. Ref.: Bot. Zentralbl., Bd. 38 1890.
- CLAUSSEN, P.: Über Eientwicklung und Befruchtung bei *Saprolegnia monoica*. Ber. d. Deutsch. bot. Ges. Bd. 26 1908.
- EIDAM, E.: *Basidiobolus*, eine neue Gattung der Entomophthoraceen. Beitr. z. Biol. d. Pfl. Bd. 4 1887.
- FALK, R.: Bedingungen und Bedeutung der Zygotenbildung bei *Sporodinia grandis*. Beitr. z. Biol. d. Pfl. Bd. 8 1902.
- FAIRCHILD, D. G.: Über Kernteilung und Befruchtung bei *Basidiobolus ranarum* EIDAM. Prings. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 30 1897.
- HAECKER, V.: Über vorbereitende Teilungsvorgänge bei Tieren und Pflanzen. Verh. d. Deutsch. zool. Ges. 1898.
- KLEBS, G.: Die Bedingungen der Fortpflanzung bei Algen und Pilzen. Jena 1896.
—: Zur Physiologie und Fortpflanzung einiger Pilze: *Sporodinia grandis*. Pringsh. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 32 1898.
- KNIEP, H.: Beiträge zur Kenntnis der Hymenomyceten. I., II., III. Zeitschr. f. Bot. 1911, 1913, 1915.
- KRÜGER, F.: Beitrag zur Kenntnis der Kernverhältnisse von *Albugo candida* und *Peronospora Ficariae*. Zentralbl. f. Bakt. Abt. 2 Bd. 27 1910.
- KÜSTER, E.: Kultur der Mikroorganismen. 1907.
- LAKON, G.: Über die systematische Stellung der Pilzgattung *Basidiobolus ranarum* EIDAM. Pringsh. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 65 1926.
- LOEWENTHAL, W.: Beiträge zur Kenntnis des *Basidiobolus lacertae* EIDAM. Arch. f. Protistenk. Bd. 2 1903.
- MEYER, A.: Orientierende Untersuchungen über Verbreitung, Morphologie und Chemie des Volutins. Bot. Ztg. 1904.
- MÜCKE, M.: Zur Kenntnis der Eientwicklung und Befruchtung bei *Achlya polyandra* DE BARY. Ber. d. Deutsch. bot. Ges. Bd. 26 a 1908.
- MÜLLER, K. O.: Untersuchungen zur Entwicklungsphysiologie des Pilzmycels. Beitr. z. allg. Bot. Bd. 2 H. 3 1922.
- OLIVE, E. W.: Cytological studies on the Entomophthoraceae. Bot. Gaz. Vol. 41 1906.
—: Cell and nuclear division in *Basidiobolus*. Annal. Mycol. Vol. 5 1907.
- OLTMANN, F.: Über die Sexualität der Pilze. Biol. Zentralbl. Bd. 21 1901 oder 1907 (5, 3).
- OPPENHEIMER, C.: Die Fermente und ihre Wirkungen. I. Leipzig 1913.
- ORBAN, GRETE: Untersuchungen über die Sexualität von *Phycomyces nitens*. Beihefte z. Bot. Zentralbl. Bd. 34 1919.
- RACIBORSKI, M.: Über den Einfluß äußerer Bedingungen auf die Wachstumsweise des *Basidiobolus ranarum* EIDAM. Flora Bd. 82 1896.
—: Mycol. Studien. I. Karyokinese bei *Basidiobolus ranarum* usw. Bull. intern. de l'Acad. des Sci. de Cracovie. 1896. (Nicht gelesen.)
—: Studia mycologiczne. Acad. of Sci. of Cracow. Vol. 14 Ser. 2 1898. (Nicht gelesen.)

- SCHMIDT, R.: Untersuchungen über das Mycelwachstum der Phycomyceten. Pringsh. Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 64 1925.
- TISCHLER, G.: Allgemeine Pflanzenkaryologie. Berlin 1921—22.
- ÚLEHLA, V. und MORAVEK, V.: Über die Wirkung von Säuren und Salzen auf den *Basidiobolus ranarum* EIDAM. Ber. d. Deutsch. bot. Ges. Bd. 49 1922.
- WEISMANN, A.: Vorträge über Deszendenztheorie. I., II. Jena 1913.
- WOYCICKI, Z.: Einige neue Beiträge zur Entwicklungsgeschichte des *Basidiobolus ranarum* EIDAM. Flora Bd. 93 1904.
- : Ber. d. Deutsch. bot. Ges. Bd. 25 1907.
- ZIKES, H.: Beitrag zur Zygosporenbildung durch äußere Faktoren. Zentralbl. f. Bakt. Abt. 2 Bd. 66 1925.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

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

Jahr/Year: 1930

Band/Volume: [69_1930](#)

Autor(en)/Author(s): Nowak Willy

Artikel/Article: [Untersuchungen an Basidiobolus ranarum Eidam 195-234](#)