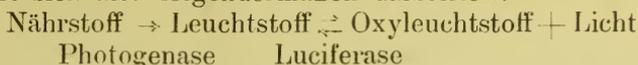


stoffes Zustand und ist die von Dubois gefundene Luciferase. Der Prozeß läßt sich also folgendermaßen darstellen:



Man achte darauf, daß die Überführung von Leuchtstoff in Oxyleuchtstoff ein reversibler Prozeß ist, daß aber der Leuchtstoff nicht wieder in Nährstoff übergeführt wird. Inwieweit die Luciferase sich von anderen Oxydasen unterscheidet, ist nicht ohne weiteres zu sagen. Dubois fand aber in zahlreichen, nicht leuchtenden Organismen, u. a. bei vielen Mollusken und Krustaceen, Enzyme, die gleichfalls den Leuchtstoff unter Lichterscheinung oxydieren.

Fassen wir die obenstehenden Untersuchungen zusammen, dann geht daraus hervor:

1. Die Eier der Lampyriden leuchten anfänglich gleichmäßig und das Licht konzentriert sich, je nachdem der Embryo sich entwickelt, an einer bestimmten Stelle. In diesem Stadium leuchten die Eier von *Luciola vittata* periodisch, mit einer Periode aber von mehreren Minuten.

2. Das periodische Leuchten wird durch das Insekt beherrscht und ist bei den getöteten Exemplaren mittels des elektrischen Stromes nachzuahmen. (Von einem völlig automatischen Nervenzentrum (Verworn) ist gar keine Rede.)

3. Das periodische Leuchten beruht auf einer intermittierenden Absperrung der Sauerstoffzufuhr in den Kapillartracheen, mittels einer Kontraktion der sogen. Tracheenend- resp. -verzweigungsstellen, unter Einfluß von Nervenreizen.

3. Die Narkose der Lampyriden findet in drei, deutlich unterschiedenen Stadien statt, kenntlich an einem reversiblen Erlöschen, Wiederaufleuchten und schließlich irreversiblen Erlöschen des Leuchtorgans.

5. Man kann in der von Dubois angegebenen Weise das Vorhandensein eines spezifischen Leuchtstoffes und wenigstens eines Enzyms bei *Luciola vittata* nachweisen.

Kopulationsbedingungen und sekundäre Geschlechtsmerkmale bei *Ustilago violacea*.

Von Robert Bauch, Würzburg.

In seinen „Untersuchungen über den Antherenbrand“ hatte Kniep (1919) den für das Sexualitätsproblem wichtigen Nachweis erbracht, daß die Sporidien der *Ustilago violacea*, die morphologisch vollkommen gleichwertig erscheinen, ihrem physiologischen Verhalten nach geschlechtlich differenziert sind. Nur Sporidien mit entgegengesetztem Geschlechtscharakter treten in den Sexualakt, die Kopulation ein. Die morphologischen „Isogameten“ sind in Wirklichkeit physiologische Heterogameten. Zillig (1921) bestätigte in ausgedehnten Infektionsversuchen

die von Kniep ausgesprochene Vermutung, daß die *Ustilago violacea* eine Sammelspezies darstellt. Sie läßt sich in eine ganze Reihe von biologischen Rassen aufteilen, die ihren jeweiligen Wirtspflanzen spezialisiert angepaßt sind. Teilweise lassen sich diese Spezialformen auch durch feinere morphologische und besonders durch physiologische Eigenheiten ihrer Sporidien voneinander unterscheiden. So z. B. weisen die Sporidien der Form von *Saponaria officinalis* eine herabgesetzte Kopulationsfähigkeit auf. Für die Rasse von *Dianthus deltoides* hatte Kniep gewisse Beobachtungen gemacht, die auf das Vorhandensein von sekundären Geschlechtsmerkmalen der beiden Sporidiengeschlechter hindeuteten. Zillig fand gelegentlich die gleichen Erscheinungen. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, diese Frage nach sekundären Geschlechtsmerkmalen der *Dianthus deltoides*-Form eingehender zu verfolgen. Daneben wurden noch einige andere Fragen in Angriff genommen, von denen hier die Ergebnisse der Untersuchung über die äußeren Bedingungen der Kopulation der Sporidien mitgeteilt seien.

I. Kopulationsbedingungen.

In der älteren mykologischen Literatur taucht überall dort, wo bei einem Pilz auf eine Zeit üppiger Vermehrung — sei es nun rein vegetativ als Myzel oder nach reichlicher Konidien- oder Sporangienproduktion — ein sexuelles Stadium folgt, der Gedanke auf, die sexuelle Vermehrung sei veranlaßt durch den eintretenden Mangel an Nährstoffen, durch die Erschöpfung des Nährsubstrates. Da meist das Produkt des Sexualaktes besonders zum Überstehen von Trockenheit und Nahrungsmangel, allgemein gesagt von für das vegetative Wachstum des Organismus schlechten äußeren Bedingungen, ausgerüstet ist, so stand hinter diesem Gedankengang häufig die Betrachtung — bald direkt ausgesprochen, bald nur zwischen den Zeilen zu lesen —, daß der Pilz bei Eintritt von Nahrungsmangel zur Sicherung der Erhaltung der Art jetzt zum Sexualakt und den damit verbundenen Dauerzuständen übergehe. Daß Nahrungsmangel den Sexualakt hervorruft, mag für eine Reihe von Formen stimmen — als Beispiel sei hier die *Pyronema confluens* (Claußen 1912) angeführt —, für andere aber wieder nicht. Das wiesen z. B. Klebs für *Sporodimia grandis* (1898) und *Saprolegnia mixta* (1899), Raciborski (1896) für *Basidiobolus ranarum*, Charlotte Ternetz (1900) für *Ascophanus* nach. Für den Antherenbrand war die Annahme, daß Nährstoffmangel die Kopulation auslöse, zuerst von Brefeld (1883) ausgesprochen worden und ohne genauere Nachprüfung von späteren Bearbeitern übernommen. Kniep (1919) verwendete auf Grund dieser Annahme nährstoffarme Medien für Kopulationsversuche, in der Hauptsache 0,1 % Lösung von Malzextrakt. Die eingehende Untersuchung ergab nun — um das Resultat gleich vorweg zu nehmen —, daß nicht Nährstoffmangel im Brefeld'schen Sinne oder die in alten Kulturen eintretende Anhäufung von Stoffwechselprodukten kopulationsauslösend wirken, sondern daß vor allem die Sauer-

stoffspannung des Mediums das maßgebende Moment darstellt. Die nachstehenden Versuche mögen den Beweis dafür erbringen.

Versuch I.

- Sporidiengemische werden in 0,01 % Malzextraktlösung angesetzt
1. in Reagenzröhrchen (13 cm hoch, 1,5 cm Durchmesser) bis dicht unter den Wattestopfen mit Malzlösung beschickt = „hoch“;
 2. in Röhrchen, die ca. zu $\frac{1}{3}$ der Höhe mit Flüssigkeit gefüllt sind = „normal“;
 3. in Röhrchen mit normalhoher Flüssigkeit, die aber, sobald sich die Sporidien in der Kuppe des Reagenzglases abgesetzt haben ($\frac{1}{2}$ Tag ca.), bis auf den Kuppeninhalt abgegossen werden = „abgegossen“;
 4. in Petrischalen mit ca. 3—5 ccm Flüssigkeit, die sich in dünner Schicht über die ganze Schale verteilt.

Die Versuche wurden mit 3 Stämmen des einen Geschlechtes in Kombination mit einem des entgegengesetzten Geschlechtes angesetzt. Zur klareren Darstellung mögen die beiden Geschlechter nach dem Vorgange von Zillig (1921) unter den indifferenten Bezeichnungen „a“ und „b“ geführt werden und zwar seien die von Kniep hauptsächlich zur Geschlechtsprüfung verwendeten Stämme 12d = a und 14d = b gesetzt. Dieser Festsetzung entsprechen auch die Bezeichnungen Zilligs, so daß in allen Arbeiten des Würzburger Institutes die Geschlechter gleichartig benannt sind¹⁾. Die Indizes in den Tabellen geben die laufende Nummer der jeweils benützten Stämme wieder, die Zahlen bedeuten die Tage, nach denen die ersten Kopulationen gefunden wurden. Die Häufigkeit der Kopulationen wurde nach folgendem Schema wiedergegeben:

- = überhaupt keine Kopulationen
- ± = Kopulationen selten
- + = „ etwa in jedem 5.—10. Gesichtsfeld.
- ++ = „ „ „ „ 1.—5. „
- +++ = mehrere in jedem Gesichtsfeld.

— 7 besagt also z. B., daß auch nach 7 Tagen noch keine Kopulationen zu finden sind.

Tabelle 1.

	a ₁ + b ₁	a ₂ + b ₁	a ₃ + b ₁
Röhrchen hochgeschichtet	± 6	± 10	± 3
„ normal	± 2	± 2	± 3
„ abgegossen	± 1	± 1	± 1
Petrischalen	++ 1	++ 1	++ 1

Die Tabelle zeigt, daß in Petrischalen die Kopulationen bereits innerhalb eines Tages und in reichlicher Menge auftreten, daß in den Röhrchen die Kopulationen sich teilweise später oder in geringerer Menge einstellen. Der Unterschied dieser 4 Anordnungen liegt nur

1) Reinkulturen beider Geschlechter von verschiedenen Wirtspflanzen sind der Zentralstelle für Pilzkulturen, Baarn (Holl.) Javalaan 4 und Krål's bakteriol. Museum Wien IX/2, Zimmermannsgasse 3, übersandt.

in der größeren oder geringeren Möglichkeit, in Gasaustausch mit der Luft zu treten. In Analogie zu dem sonstigen Einfluß des Sauerstoffs auf alle Lebensvorgänge liegt es nahe, hier speziell in dem reichlicheren Zutritt von Sauerstoff die kopulationsauslösende Ursache zu sehen. Der Versuch steht nicht als einzelner da, sondern wurde mehrmals mit prinzipiell gleichem Ergebnis wiederholt. Das schnelle und reichliche Auftreten von Kopulationen in Petrischalen wurde in mehreren Hundert Gebrauchskombinationen des zweiten Teiles der Arbeit immer bestätigt, während man in Reagenzglasversuchen erst nach 5–6 Tagen auf Kopulationen in entsprechender Häufigkeit rechnen kann.

Gegen die Bewertung dieses Versuches ließe sich im Brefeldschen Sinne einwenden, daß er ja schon mit ganz nährstoffarmen Lösungen angestellt wurde. Es war also die Frage zu prüfen, ob der gleiche Einfluß des Gasaustausches auch bei Anwendung höher konzentrierter Flüssigkeiten sich nachweisen läßt. Daß dies der Fall ist, zeigt Versuch II, bei dem an Stelle von 0.01 % eine 3 % Malzlösung verwendet ist.

Tabelle 2.

	$a_1 + b_1$	$a_2 + b_1$	$a_3 + b_1$
3 % Malzröhrchen abgegossen	+ 9	± 7	± 7
3 % Malz Petrischale	+ 3	+ 3	± 1

Das Auftreten von Kopulationen in hochkonzentrierten Nährlösungen bereits nach einem Tage, das in Parallelversuchen sich noch häufiger ergab, ist mit der Brefeldschen Erschöpfungshypothese unvereinbar. Denn es ist schwerlich anzunehmen, daß nach eintägigem Wachstum bereits Erschöpfung der Nährlösung eingetreten sein sollte. Das wäre erst in bedeutend älteren Kulturen zu erwarten.

Aber auch lange bewachsene Kulturmedien sind weder durch ihren Mangel an Nährsubstanzen noch durch ihren reichen Gehalt an Abbauprodukten des Stoffwechsels von Einfluß auf Eintreten und Häufigkeit der Kopulation, wenn die Gasaustausch-Verhältnisse außer acht gelassen werden. Ein derartiger Versuch wurde mit 3 % und 0,1 % Malzextrakt angestellt, der 2 $\frac{1}{2}$ Monate lang mit der Kultur b_1 bewachsen war und währenddessen häufig umgeschüttelt wurde, um der am Boden des Kulturgefäßes liegenden Sporidienmasse immer neue Nährlösung zuzuführen. Die überstehende Flüssigkeit wurde dann vorsichtig, ohne den Satz aufzuwirbeln, abgegossen, steril in Röhrchen in normaler Höhe gefüllt und zur Sicherheit eine Stunde im Dampftopf übersterilisiert. Dann Beimpfung mit gleichen Mengen von a- und b-Kulturen.

Die Tabelle III bedarf im Vergleich zu I wohl keiner weiteren Erläuterung.

Tabelle 3.

	$a_1 + b_1$	$a_2 + b_1$
3 % Malz erschöpft	± 10	± 10
0,1 % Malz erschöpft	± 2	± 2

Brefeld hatte nun allerdings seine Versuche anders durchgeführt. Er war nicht von Sporidienreinkulturen mit bekanntem Geschlecht, sondern von Brandsporenaussaaten ausgegangen. Es hätte ja möglich sein können, daß diese Unterschiede irgendwie auf das Endergebnis Einfluß besitzen. Die Erledigung dieser Fragestellung gibt Versuch IV.

Versuch IV.

Brandsporenaussaat in 0,01 % und 3 % Malzextrakt in Röhren normaler Höhe und in Petrischalen.

Tabelle 4.

	Kopulationen nach
3 % Malz in Röhren	15—20 Tagen
3 % Malz in Petrischalen	3 Tagen
0,01 % Malz in Röhren	3—4 Tagen
0,01 % Malz in Petrischalen	2 Tagen

Also auch hier keine Abweichung von dem oben geschilderten Verhalten. Die Unterschiede in dem Auftreten von Kopulationen in 0,01 % Malzextrakt sind hier gering. Doch mag sich dies aus der Beobachtung erklären, daß in stark verdünntem Malz die Brandsporen nicht unter-sinken, sondern an der Oberfläche schwimmend keimen und Sporidien abschnüren. Sie besitzen dann natürlich auch im Röhren die Möglichkeit reichlichen Gasaustausches mit der Luft.

Alle diese Ergebnisse sprechen dafür, daß nicht Erschöpfung der Nährstoffe oder Anhäufung von Stoffwechselprodukten die Kopulation auslöst. Vielmehr ist der intensivere Gasaustausch mit der Luft, den die Petrischalenmethode gegenüber der Röhrenmethode gestattet, der realisierende Faktor. In den folgenden Versuchen wird der Nachweis geführt werden, daß tatsächlich, wie von vornherein zu erwarten, der leichte Sauerstoffzutritt zu den dünnen Flüssigkeitsschichten die wesentliche Bedingung darstellt.

Als erste sollte die Frage entschieden werden, wie die Verminderung des Luftdruckes, damit also auch Verminderung des O-Partiärdruckes, auf die Kopulation einwirkt. Die Versuche wurden unter Glasglocken mit 2 Zuführungswegen angesetzt. Die eine Zuführung war mit der Wasserstrahl-luftpumpe, die andere mit einem Hg-Barometer

verbunden. Die Diffusion der Gase von Flüssigkeit zu Luft scheint ziemlich langsam vor sich zu gehen. Werden die Petrischalen sofort mit Sporidiengemischen dem veränderten Luftdruck ausgesetzt, so zeigen sie regelmäßig schon nach einem Tag Kopulationen. Werden die beiden Sporidienformen dagegen erst getrennt in Petrischalen unter verminderten Luftdruck gebracht und dann schnell zusammengegossen und wieder ins Vakuum gebracht, dann läßt sich eine gesetzmäßige Einwirkung des Luftdruckes feststellen. Da Kopulationen unter normalen optimalen Bedingungen bereits nach einigen Stunden eintreten, erscheint das Verhalten der Sporidiengemische nicht unerklärlich. Der endgültige Gleichgewichtszustand zwischen den Flüssigkeitgasen und den Luftgasen würde also erst später eintreten, als daß der O-Gehalt der Flüssigkeit nicht noch zur Kopulation genügt hätte. Das Auftreten von Kopulationen ist so beinahe ein Reagenz für die Schnelligkeit der Gasdiffusion.

Versuch V.

Sporidien in Petrischalen in 0,01 % Malz, erst 2—3 Tage getrennt, dann gemischt.

Tabelle 5.

L u f t d r u c k:	$a_1 + b_1$	$a_2 + b_1$	$a_3 + b_1$
normal	+++1	+++1	+++1
auf $\frac{3}{4}$ erniedrigt	+1	+1	+1
auf $\frac{1}{2}$ erniedrigt	-3	-3	-3
auf $\frac{1}{4}$ erniedrigt	-4	-4	-4

Bei Erniedrigung des Luftdruckes auf die Hälfte treten demnach keine Kopulationen mehr auf.

Versuch VI.

Nun wurde der Einfluß verschiedener Gase mit der gleichen Versuchsanordnung durchgeprüft. Die Luft wurde bis auf $\frac{1}{10}$ ca. ausgepumpt, dann mit dem zu prüfenden Gase unter der Glasglocke wieder normaler Druck hergestellt. Die Sporidien wurden wie im vorigen Versuch erst einige Tage getrennt dem Gas ausgesetzt und dann erst miteinander gemischt.

Tabelle 6.

	$a_1 + b_1$	$a_2 + b_1$	$a_3 + b_1$
Sauerstoffatmosphäre	+++3	++3	++3
Wasserstoffatmosphäre	-9	-9	-9
Kohlensäureatmosphäre	-6	-6	-6
Stickstoffatmosphäre	-3	-3	-3

Von den untersuchten Gasen treten nur im Sauerstoff Kopulationen auf und somit ist der oben aufgestellte Satz bewiesen.

Nachdem durch die vorhergehenden Versuche ein Optimum der Kopulationsbedingungen festgestellt war, konnten auch weitere Fragen über die Bedeutung anderer Außenbedingungen in Angriff genommen werden. Durchgehends wurde jetzt die Petrischalenmethode angewendet.

Versuch VII.

Einfluß der Konzentration der Nährlösung: Malzextrakt in verschiedenen Verdünnungen.

Tabelle 7.

	$a_1 + b_1$	$a_2 + b_1$
3 % Malz	+ 3	+ 3
1 % Malz	+ 1	+ 1
0,1 % Malz	+++ 1	+++ 1
0,01 % Malz	+++ 1	+++ 1
0,001 % Malz	+++ 1	+++ 1
Aqua dest.	+++ 1	+++ 1

Die höheren Malzkonzentrationen hemmen also die Kopulationen deutlich. Am besten erscheint ungefähr 0,01 % Malz.

Versuch VIII.

Einfluß des Säure- und Alkaligehalts. Aqua dest. in Petrischalen mit verschiedenem HCl- und NaOH-Zusatz. Die Säuregrade geben an, wieviel ccm n/10-Lösung zur Neutralisation von 10 ccm Flüssigkeit bei Phenolphthalein als Indikator verbraucht werden.

Tabelle 8.

	$a_2 + b_1$	$a_3 + b_1$
Aqua dest. 2,8 alkalisch	- 3	- 3
Aqua dest. 1,5 alkalisch	- 3	- 3
Aqua dest. 0,5 alkalisch	- 3	+++ 1
Aqua dest. ganz leicht alkalisch	+++ 1	+++ 1
Aqua dest. neutral	+++ 1	+++ 1
Aqua dest. 0,5 sauer	- 4	- 4
Aqua dest. 2,5 sauer	- 4	- 4
Aqua dest. 4,0 sauer	- 4	- 4

Hohe Säure- und Alkalimengen hemmen in gleichem Maße die Kopulation, während geringes Alkali sie befördert. Dementsprechend wurde für die Gebrauchskombinationen des II. Teiles der Arbeit die verwendete 0,01 % ige Malzlösung ganz leicht alkalisch gemacht (1 Tropfen n/1 NaOH auf 100 ccm Flüssigkeit).

Versuch IX.

Versuch VII hatte gezeigt, daß hohe Malzkonzentrationen die Kopulation hemmen. Könnte diese Hemmung nicht auf dem höheren Säuregrade beruhen? 3 % Malzlösung ist ungefähr 0,5 bis 0,8 sauer. Der Ansatz geschah in 3 % Malz mit verschiedenen Säure- und Alkali-graden in Petrischalen.

Tabelle 9.

			$a_1 + b_1$	$a_2 + b_1$
3 % Malz	1,4	alkalisch	- 3	+ 2
3 % Malz	0,5	alkalisch	+ 2	+ 1
3 % Malz	ganz leicht alkalisch		++ 1	+ 1
3 % Malz	0,6	sauer (normal)	+ 3	+ 3

Das Ergebnis, vielleicht nicht ganz so klar wie im vorhergehenden Versuch, zeigt, daß in leicht alkalischer Lösung am frühesten und reichlichsten Kopulationen auftreten. Die Hemmung durch konzentrierten Malzextrakt wird also wohl in der Hauptsache auf seinen Säuregehalt zurückzuführen sein.

Diese Anschauung wurde weiterhin bestätigt durch Versuche mit reinen Zuckerlösungen. Hierbei waren die Säure-Alkaliverhältnisse so gut wie ganz ausgeschaltet — die Reaktion von 3 % Maltose schwankt um 1—2 Tropfen n/10 KOH — nur der höhere osmotische Druck konzentrierter Lösungen war wirksam. Die Ergebnisse waren für alle benutzten Zuckerarten im allgemeinen gleichartig; deshalb sei hier nur der Maltoseversuch als Beispiel angeführt.

Tabelle 10.

		$a_1 + b_1$	$a_2 + b_1$
10 %	Maltose	+ 1	+ 1
5 %	Maltose	+ 1	+ 1
3 %	Maltose	+ 1	+ 1
1 %	Maltose	+ 1	++ 1
0,1 %	Maltose	+ 1	++ 1
0,01 %	Maltose	++ 1	++ 1
0,001 %	Maltose	++ 1	++ 1

Außer den bisher angeführten Faktoren — guter Sauerstoffzutritt, leichte Alkaleszenz — scheint nur noch die Frage des osmotischen Druckes für die Kopulation von einiger Bedeutung zu sein. Daß etwa eine bestimmte Stoffgruppe einen besonders befördernden Einfluß hätte, wie es Klebs (1898) z. B. für mehrere Kohlehydrate bei der Zygo-sporenbildung von *Sporodinia* nachgewiesen hat, oder daß andere deutlich hemmend wirkten, dafür lieferten diesbezügliche Versuche keine Anhaltspunkte. Untersucht wurden von Eiweißstoffen Pepton „Witte“, Nutrose, Gliadinpepton (reines Präparat), von Aminosäuren Glykokoll, von N-haltigen organischen Verbindungen Asparagin, von Kohlehydraten Milhzucker, Maltose, Saccharose, von Alkoholen Glycerin, immer in verschiedenen Verdünnungen von 1 % bis 0,001 %. Meist traten in den stärksten Konzentrationen die Kopulationen später ein und spärlicher als in den schwächsten, aber eine Bevorzugung eines dieser Stoffe in positiver und negativer Beziehung ließ sich nicht nachweisen. Die Versuche sind aber zu wenig ausgedehnt worden, um etwa behaupten zu können, daß es gar keine Körper gäbe, die die Kopulation hemmten. Bei eingehenderer Untersuchung würden sich wohl sicher organische Verbindungen auffinden lassen, bei denen man eine Säure-Alkaliem-mung ausschließen kann und die trotzdem durch ihre chemische Struktur hemmend einwirken. Da es aber unwahrscheinlich war, daß Versuche in dieser Richtung etwas wesentlich Neues zu der Hauptfragestellung ergeben würden, wurde davon Abstand genommen. Einige Versuche mit anorganischen Salzen aber ließen eine Hemmung deutlich erkennen. Als Beispiel sei das Verhalten von NaCl in Tabelle XI wiedergegeben.

Tabelle 11.

	$a_1 + b_1$	$a_2 + b_1$
0,01 % Malz NaCl m/1	— 6	— 6
0,01 % Malz NaCl m/5	— 6	— 6
0,01 % Malz NaCl m/10	+ 6	+ 1
0,01 % Malz NaCl m/15	+ 1	+ 1

Zusatz von m/5 NaCl zur Malzlösung, die eine Erhöhung des osmotischen Druckes bedingt, hemmt die Kopulation. Man wird nicht fehl gehen, auch die Hemmung der höheren Konzentrationen der eben erwähnten Stoffe und der Maltose (siehe Tabelle X) auf Erhöhung des osmotischen Druckes zu beziehen. Gleichsinnig würde wohl die Beobachtung zu deuten sein, daß in dem stark kalkhaltigen Würzburger Leitungswasser Kopulationen erst nach mehreren Tagen und dann sehr spärlich auftreten.

Wichtig ist noch die Bedeutung der Temperatur für den Kopulationsvorgang. Tabelle XII gibt eine diesbezügliche Versuchsreihe wieder.

Tabelle 12.

	$a_1 + b_1$	$a_2 + b_1$	$a_3 + b_1$
im Brutschrank bei 28°	— 5	— 5	— 5
im warmen Zimmer 18—20°	+++ 1	+++ 1	+++ 1
im kalten Gewächshaus 10°	++ 1	+++ 1	+++ 1
im Freien —5° bis +5°	+ 2	+ 2	+ 2

Das Temperaturoptimum liegt also zwischen 10° und 20°. Allzu große Entfernung davon nach oben und unten hin hat deutlich hemmende Wirkung.

Von sonstigen Faktoren hätte vielleicht noch das Licht eine Rolle spielen können. Versuche, die unter sonst gleichen Bedingungen ange-
setzt wurden, nur daß einmal der Ansatz in den frühen Morgenstunden geschah und die Petrischalen während des ganzen Tages dem zerstreuten Tageslicht ausgesetzt waren, daß im anderen Falle der Ansatz am Abend bei elektrischem Licht erfolgte und die Petrischalen dann sofort unter sicheren Dunkelsturz gebracht wurden, ergaben keinerlei Unterschiede.

Fassen wir die Ergebnisse kurz zusammen:

Der Kopulationsvorgang der Sporidien von *Ustilago violacea* ist in erster Linie abhängig von dem Sauerstoffgehalt der Flüssigkeit oder der Möglichkeit eines intensiven Gasaustausches mit der Luft, wie ihn dünne Flüssigkeitsschichten bieten. Er ist ferner abhängig von dem Alkaligehalt des Mediums. Starkes Alkali und schon geringe Säuregrade hemmen den Vorgang. Irgend ein besonders befördernder Einfluß von Körpern der Eiweiß- oder Kohlehydratgruppe ist nicht nachgewiesen worden, doch hemmen diese Stoffe in hohen Konzentrationen deutlich, ebenso wie hoher Salzgehalt des Mediums durch ihre osmotische Wirkung. Die Kopulation erfolgt unabhängig vom Licht. Ein Temperaturoptimum ist deutlich vorhanden. Eine Abhängigkeit des Auftretens der Kopulationen von der Erschöpfung der Nährlösung bzw. der Anreicherung mit Stoffwechselprodukten, wie Brefeld (1883) es annahm, besteht nicht. All diese experimentell ermittelten äußeren Bedingungen entsprechen also im allgemeinen denen, wie sie der Pilz auch in der Natur vorfinden mag*).

Bisher wurden immer nur äußere Bedingungen berücksichtigt. Schon Kniep (1919) berichtete aber von verschieden guter Kopulationsfähig-

*) Die exakte Beherrschung der Kopulationsbedingungen machen den Antherenbrand zu einem günstigen Demonstrationsobjekt der „Isogamie“.

keit seiner Sporidien und beobachtete auch, daß das Kopulationsvermögen nach längerer Kultur nachläßt. Bei meinen Kulturen, die im Anfang der Arbeit wahllos aus einer großen Reihe frisch isolierter herausgegriffen waren, habe ich eine Abnahme der Sexualfreudigkeit nicht feststellen können. Noch jetzt, nachdem sie ca. $\frac{3}{4}$ Jahr ständig von Malzagar zu Malzagar gezüchtet sind, kopulieren sie unter optimalen Bedingungen noch ebenso tüchtig wie im Anfang. Auch Petrischalenversuche mit verschiedenen alten Kulturen gleicher Abstammung (darunter auch schon beinahe vertrocknete) ließen keine Abnahme der Kopulationsfähigkeit erkennen. Doch scheinen in gewissen Fällen tatsächlich innere Bedingungen von Einfluß zu sein. Unter den mehreren Tausenden auf ihr Geschlecht geprüften Kulturen fanden sich hin und wieder einige — ohne daß ihr Auftreten irgend eine Regelmäßigkeit erkennen ließ — die als „schlecht kopulierend“ zu bezeichnen waren. Erst nach mehrfachem Ansetzen in Röhrchen, der Gebrauchsmethode für den Massenbetrieb, konnten Kopulationen aufgefunden werden und dann meist spärlich. Mitunter führte auch der geduldige mehrmals wiederholte Ansatz im Röhrchen nicht zum Ziel. Dann gelang es aber immer unter den optimalen Verhältnissen der Petrischalenmethode eine Entscheidung über das Geschlecht des betreffenden Stammes zu fällen. Meist zeigten diese schlecht kopulierenden Stämme morphologische Abweichungen von der Norm. Eine größere oder geringere Zahl von Sporidien war bedeutend größer als normal, dick mit Reservefettkügelchen angefüllt, häufig zeigen sie Biskuit- oder sogar hantelförmige Gestalt. Diese großen Formen wurden nie bei der Kopulation beobachtet, stets waren die wenigen in solchen Kulturen kopulierenden Individuen von normaler Größe. Der Gedanke liegt nahe, in derartigen schlecht kopulierenden Kulturen eine pathologische Erscheinung zu sehen, über deren Zustandekommen allerdings nicht einmal Vermutungen geäußert werden können. Daneben gibt es noch kleinere, individuelle Unterschiede des sexuellen Temperamentes der Sporidien. So fanden sich z. B. häufig in dem gleichen Massenansatz unter sonst gleichen Bedingungen (gleiche Nährlösung, gleicher zur Geschlechtsprüfung benutzter Teststamm) deutliche Unterschiede zwischen solchen Kulturen, die massenhaft kopuliert hatten und anderen mit nur wenigen Kopulationen, die erst nach längerem Suchen aufgefunden werden konnten. Wiederholte vergleichend ausgeführte Versuche mit derartig extremen Stämmen in Petrischalen ergaben fast stets, daß die schlecht kopulierenden Stämme auch unter diesen Bedingungen nach einem Tage weniger Kopulationen ausgebildet hatten als die gut kopulierenden. Doch war bei 2—3 tägiger Beobachtung dieser Vorsprung wieder eingeholt. Diese individuellen Unterschiede können also nur geringfügiger Natur sein.

Alle bisher wiedergegebenen Beobachtungen beziehen sich nur auf die Sporidien der Spezialform des Antherenbrandes von *Dianthus deltoides*. Einige andere Spezialformen (*Dianthus carthusianorum*, *Di. superbus*, *Silene nutans*, *Melandryum album*) kopulieren unter den für

die Deltoidesrasse optimalen Bedingungen ebenso kräftig wie diese. Ferner lassen sich Bastardierungen z. B. von *Di. deltoides* mit *Melandr. album*, die im Röhrchen nur schwer zu erzielen sind, in Petrischalen schon nach einem Tage gewinnen. So wird die Behauptung nicht allzu gewagt sein, daß die Kopulationsbedingungen der anderen Spezialformen die gleichen sind wie die für die Deltoidesform, mit Ausnahme allerdings der von *Saponaria officinalis*. Für diese ist schon durch die älteren Beobachter festgestellt, dann durch Kniep und Zillig wieder bestätigt worden, daß sie nur schwer oder gar nicht zur Kopulation zu bringen ist. Auch ich konnte bei verschiedenst variierten Bedingungen, auch unter den für die Deltoidesrasse optimalen, weder bei Eigenmischung noch Kreuzungsversuchen mit anderen Rassen eine erhöhte Kopulationsfähigkeit erzielen. Vielleicht liegt hier eine Rasse vor, deren Kopulationsfähigkeit vermindert ist, oder deren Sexualstadium ähnlich wie bei *Ustilago maydis* teilweise auf eine andere Stelle des Entwicklungszyklus verlegt ist.

Vergleichen wir noch, ob die für den Kopulationsakt der *Ustilago violacea* als überragend festgestellte Rolle des Sauerstoffs sich auch bei anderen Organismen wiederfindet. Die Bedingungen des Sexualaktes niederer Organismen sind im allgemeinen wenig eingehend — abgesehen von den groß angelegten Untersuchungen Klebs — bekannt, die O-Frage im speziellen nicht aufgerollt. Sowohl für Sporodinia wie für sämtliche Mucorineen gilt der Satz, daß Zygoten nur in Luft, nie in Nährsubstrat gebildet werden. Das Gleiche trifft nach Raciborski (1896) für *Basidiobolus ranarum*, nach Ternetz (1900) für *Ascophanus*, nach Claußen (1912) für *Pyronema confluens* und nach dem sonstigen Auftreten von Sexualprodukten der Ascomyzeten meist nur an der Luftoberfläche ihres natürlichen Substrates für die große Mehrzahl der Ascomyzeten zu. Dem schließt sich die Beobachtung von Kniep (1918) über die Schnallenbildung gewisser Basidiomyceten an, die auch nur im Luftmyzel, nie in untergetauchten oder innerhalb des Substrates wachsenden Fäden auftreten. Für Sporidinia steht dieser Anschauung allerdings ein Klebscher Versuch (1898) entgegen, wo Zygoten noch in einem Vakuum von 20—25 mm entstanden, unter Verhältnissen also, wo der Sauerstoffpartiärdruck nur noch minimal sein kann. Nicht ausgeschlossen wäre es aber, daß bei all den Formen mit Luftmyzel die Transpirationsverhältnisse von maßgebenderer Rolle sind als der Sauerstoffzutritt. Doch liegen darüber bisher noch keine Untersuchungen vor.

II. Sekundäre Geschlechtsmerkmale.

Für die Spezialform des Antherenbrandes von *Dianthus deltoides* hatte Kniep (1919) ein merkwürdiges Verhalten mitgeteilt. Er ließ die Brandsporen in verschiedenen Nährböden keimen und isolierte dann aus diesen Brandsporenaussaaten in der üblichen Weise durch Plattengüsse Einsporidienkulturen. Diese wurden durch Kombination untereinander auf ihr Geschlecht geprüft. Bei der Rassen aller untersuchten

Wirtsformen fanden sich die beiden Geschlechter ungefähr in einem Verhältnis von 50:50. Nur bei der *Di. deltoides*-Form kamen Abweichungen so bedeutender Art vor, daß sie nicht auf Rechnung des Zufalls zu schreiben waren. In einigen Versuchen, wo Malz- und Peptonzuckergelatine als Medium der Sporidienisolierung benutzt wurde, war nur das eine Geschlecht gezüchtet worden — die Verhältniszahlen lauteten 190 a:0 b — in anderen das entgegengesetzte, in anderen dagegen beide in ungefähr normalem Verhältnis. Kniep deutete diese Erscheinung bereits darin, daß sich die beiden Geschlechter irgend welchen Stoffen in den benutzten Nährmedien gegenüber verschieden verhalten, daß sie sich also nicht nur durch ihre geschlechtliche Tendenz, sondern auch durch anderweitige Eigenheiten unterscheiden, kurz daß es sich hierbei wohl um sekundäre Geschlechtscharaktere physiologischer Natur handle. Diese Frage soll im Vorliegenden eingehender untersucht werden.

Die im Nachfolgenden gegebenen Zahlen beziehen sich auf das Verhältnis der als Einsporidienkulturen isolierten Geschlechter a:b; so bedeutet z. B. 30:0, daß in diesem Falle 30 Kulturen des a-Geschlechtes und keine Kulturen des b-Geschlechtes gezüchtet wurden. Die Technik der Untersuchungen gestaltete sich gleichlautend der von Kniep angewendeten. Zuerst wurden die steril aus der Knospe entnommenen Brandsporen auf künstlichen Nährsubstraten zum Keimen und Sporidienbildung gebracht — „Brandsporenaussaat“ — und von den hier entstandenen Sporidienmassen dann Plattengüsse in Petrischalen hergestellt — „Sporidienisolierung“. Von den dabei gewachsenen Kolonien wurden in jedem Versuch 30 fortlaufend numeriert auf Schrägagarröhrchen (3 % Malz, 2 % Agar) übergeimpft und nach genügendem Wachsen mit Teststämmen bekannten Geschlechts in Röhrchen mit 0,01 % Malzlösung (leicht alkalisch) kombiniert. Nach einem Tage hatten die Sporidien sich am Boden des Röhrchens abgesetzt, die überstehende Flüssigkeit wurde abgossen und nach 5–6 Tagen der Bodensatz auf Kopulationen untersucht. Die Petrischalenmethode, die ja schon nach einem Tage endgültige Ergebnisse liefert, wurde im allgemeinen wegen ihrer etwas größeren technischen Umständlichkeit nicht angewendet, nur dort, wo es sich darum handelte, schnell den Ausfall eines Versuches abzulesen. Wenn bei einer Kultur die Kombination mit dem a-Teststamm Kopulationen ergeben hatte, so wurde sie als b bezeichnet, ohne daß erst noch auf das Ausbleiben von Kopulationen bei Kombination mit dem b-Stamm geprüft wurde. Gab eine Kultur mit a keine Kopulationen, so wurde sie mit b kombiniert und erst bei positivem Ausfall als a geführt. Keine Geschlechtsprüfung wurde abgeschlossen, ehe nicht mit einem der beiden Teststämme Kopulationen erzielt waren. Gelegentlich hätte es vorkommen können, daß die isolierte Kultur nicht einem Sporidium entstammte, sondern schon aus beiden Geschlechtern gemischt bestand. In diesem Falle wären von vornherein in der Kultur Kopulationen zu erwarten. Doch traten derartige „selbstkopulierende“ Stämme zu selten auf, um auf sie besondere Rücksicht nehmen zu müssen. Auf 2160 mit beiden Geschlechtern geprüften Stämmen kamen im ganzen 15 selbstkopulierende. Dieser Fehler von 0,7 % wurde aber durch die große Anzahl der in jedem Versuch isolierten Kulturen ausgeglichen.

Die Beobachtungen von Kniep wurden in großem Umfange nachgeprüft. Dies geschah in vollständiger Anlehnung an seine Versuche durch Kombination von 1) 3 % Malzlösung, 2) 3 % Malz, 10 % Gelatine, 3) 3 % Malz, 2 % Agar, 4) 0,5 % Pepton, 3 % Saccharose, 10 % Gelatine zur Brandsporenaussaat und soweit sie fest waren, zur Sporidienisolierung. Das Resultat gibt Tabelle I.

Tabelle 1.

Brandsporenaussaat in	Sporidienisolierung mit		
	Malzgelatine	Peptonzucker- gelatine	Malzagar
3 % Malz	28 : 0	28 : 0	11 : 42
Malzgelatine	22 : 3	18 : 0	4 : 20
Peptonzuckergelatine	26 : 0	28 : 0	9 : 7
Malzagar	22 : 3	22 : 4	9 : 14

Immer, wenn Gelatine gleich welcher Zusammensetzung zur Sporidienisolierung benutzt wird, treten nur a-Kulturen auf bzw. es ergibt sich ein bedeutendes Überwiegen von a gegen b, während die Sporidienisolierung mit Malzagar entweder ein ungefähr gleiches Verhältnis von a zu b liefert oder im Gegenteil eine Verschiebung zugunsten von b. Ohne besonderen Einfluß erscheint dabei das Nährsubstrat der Brandsporenaussaat. Auf den Medien, die hierfür benutzt waren, traten später Kopulationen auf, in Malzagar schon nach 5 Tagen reichlich, in den anderen nach 15–20 Tagen, wenn auch spärlicher. In den Brandsporenaussaaten waren also beide Geschlechter vertreten — ein Hinweis, daß die Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses nicht auf dem Stadium der Brandsporenaussaat, sondern erst auf der Phase der Sporidienisolierung eingetreten war. Endgültige Klarstellung dieser Frage geben eine Reihe weiterer Versuchsserien.

Zuerst wurden an Stelle des 3 % Malz verschiedene andere Flüssigkeiten zur Aussaat benutzt (Tabelle II).

Tabelle 2.

Brandsporenaussaat in	Sporidienisolierung mit		
	Malzgelatine	Peptonzucker- gelatine	Malzagar
3 % Saccharose	30 : 0	28 : 0	1 : 29
3 % Lactose	30 : 0	—	10 : 19
3 % Maltose	18 : 0	29 : 0	13 : 8
3 % Mannit	18 : 12	—	7 : 22
3 % Inulin	—	—	7 : 23
3 % Malz + 3 % Glyzerin	18 : 11	—	0 : 30
3 % Malz + 2 % Pepton	—	—	12 : 18
3 % Malz + 5 % Glykokoll	24 : 6	—	10 : 20
Knopsche Lösung	23 : 6	—	10 : 20

Die Bedeutung der fett gedruckten Zahlen wird später eingehend erörtert werden. Einstweilen sei gesagt, daß diese Abweichungen von dem geschilderten Bild nur scheinbar sind, sich in Wirklichkeit vollkommen in dem gleichen Sinne — Hemmung des Wachstums des einen Geschlechtes — deuten lassen.

Worauf schon das Ergebnis des ersten Versuches hindeutete, das läßt dieser klar erkennen: Die Unterdrückung des einen Geschlechtes geschieht nicht in den Medien der Brandsporenaussaat, sondern erst in den Nährsubstraten, die zur Sporidienisolierung benutzt werden. Dieser Satz wird durch eine Reihe von Versuchen von anderen Gesichtspunkten ausgehend vollkommen bestätigt. Sie seien hier kurz geschildert.

Versuch III.

Beeinflußt die Konzentration der Nährflüssigkeit bei der Brandsporenaussaat das Geschlechtsverhältnis? Durchprüfung mit verschiedenen Konzentrationen von Malzextrakt.

Tabelle 3.

Brandsporenaussaat in	Sporidienisolierung mit		
	Malzgelatine	Peptonzucker- gelatine	Malzagar
5 % Malz	30 : 0	29 : 0	6 : 24
3 % „	28 : 0	28 : 0	5 : 18
1 % „	29 : 0	30 : 0	10 : 19
0,1 % „	18 : 0	27 : 0	10 : 20

Ergebnis: Die Konzentration des Aussaatmediums ist für die Geschlechtsverschiebung ohne Bedeutung.

Versuch IV.

Hat das Alter der Brandsporenaussaat Einfluß auf die Geschlechtsverschiebung? Es wäre denkbar, daß die Ausbildung der beiden Sporidiengeschlechter an den Promyzelien zeitlich verschieden erfolgte, oder auch, daß die Vermehrungsgeschwindigkeit des einen Geschlechtes größer wäre als die des anderen. Beides müßte sich an dem kleinen Ausschnitt der tatsächlichen Verhältnisse, den die 30 jeweils durchgeprüften Kulturen bieten, als Verschiebung bemerkbar machen. Bisher war die Abimpfung von der Brandsporenaussaat immer nach 5—6 tägigem Wachstum vorgenommen, jetzt geschah sie in bestimmten Zeitintervallen, ausgehend von 2 tägigem Wachstum in 2—3 tägigem Zwischenraum bis zu 21 Tagen und schließlich nochmals am 43. Tage. Kombiniert wurden 3% Malz, Malzgelatine, Malzagar als Medium der Brandsporenaussaat mit Malzgelatine und Malzagar zur Sporidienisolierung. Die Aufstel-

lung ist zu umfangreich, um sie im Druck wiederzugeben. 23 Einzelversuche mit 638 durchgeprüften Sporidienkulturen ließen nur eine Deutung in dem oben gekennzeichneten Sinne zu. Auch das Alter der Brandsporenaussaat ist ohne Wirkung auf die Geschlechtsverschiebung.

Versuch V.

Bedingt der Säure- oder Alkaligehalt des Mediums der Brandsporenaussaat die Geschlechtsverschiebung? Ausgeführt wurde der Versuch mit verschiedenen alkalisch und saurer 3 % iger Malzlösung. Die Bezeichnungen geben wie bei den Kopulationsversuchen relative Werte, die Menge n/10 Säure oder Alkali, die 10 ccm der Flüssigkeit bei Phenolphthalein als Indikator neutralisieren; es bedeutet „4,0 alkalisch“ demnach: 4 ccm n/10 HCl werden verbraucht, um 10 ccm der Malzlösung zu neutralisieren.

Tabelle 5.

Brandsporenaussaat in	Sporidienisolierung mit		
	Malzgelatine	Peptonzucker- gelatine	Malzagar
3 % Malz 4,0 alkalisch	30 : 0	—	5 : 24
3 % Malz 2,5 alkalisch	—	—	3 : 26
3 % Malz 1,0 alkalisch	32 : 7	30 : 0	4 : 50
3 % Malz neutral	35 : 0	30 : 0	11 : 15
3 % Malz 0,5 sauer	28 : 0	28 : 0	11 : 42
3 % Malz 2,5 sauer	—	8 : 2	—

Auch der Ausfall dieses Versuches steht ganz im Einklang mit dem der vorigen.

Eine weitere Serie, die die Frage klären wollte, ob vielleicht durch Züchtung bei verschiedenen Temperaturen Abweichungen von dem bisher Festgestellten eintreten (Brandsporenaussaat in 3 % Malz bei 34°, 28°, 20°, 10°, Sporidienisolierung mit Malzgelatine und Malzagar) ergab ebenfalls nichts Entgegenstehendes.

Aus den Versuchen 1—5 geht somit klar hervor, daß in der Brandsporenaussaat die beiden Geschlechter zu gleichen Teilen vorhanden sind. Die Verschiebung des Geschlechtsverhältnisses muß also während der Phase der Sporidienisolierung stattfinden; d. h. durch irgend welche Einflüsse des betreffenden Nährmediums müssen die Sporidien des einen Geschlechts entweder vollkommen abgetötet oder zum mindesten in ihrer Wachstumsenergie geschwächt werden. Welcher Art könnten nun die Einflüsse der verschiedenen Nährböden sein?

Überschauen wir kurz die Gesamtergebnisse, so gab Gelatine, gleichgültig ob mit Malzextrakt oder Pepton und Zucker versetzt, fast durch-

weg nur das a-Geschlecht, Malzagar dagegen entweder ein normales Verhältnis beider Geschlechter oder ein Überwiegen der b-Form. Das verschiedene Verhalten wird also in erster Linie auf Unterschiede der beiden gallertgebenden Substanzen, der Gelatine und des Agars zurückzuführen sein. Die Unterschiede könnten sich nach zwei Richtungen hin erstrecken: 1) Nach chemisch-physikalischer Seite hin, 2) als rein chemische Differenzen.

Die chemisch-physikalischen Unterschiede könnten sich auf den Kolloidzustand, die mechanischen Verhältnisse der Spannung, des Zuges und Druckes innerhalb des Mediums, verschiedene Durchlässigkeit und Absorptionsfähigkeit für Gase erstrecken. Es erscheint von vornherein etwas unwahrscheinlich, daß die Abtötung oder Hemmung des einen Geschlechtes mit diesen Mitteln erzielt wurde. Praktisch ist es fast unmöglich, z. B. den Kolloidzustand in weitgehendem Grade zu verändern, ohne daß das Medium nicht auch seine gallertgebenden Eigenschaften verlieren würde. So konnte diese Frage experimentell nicht bearbeitet werden. Da es aber tatsächlich gelang, eine bestimmte Körpergruppe für die Verschiebung verantwortlich zu machen, so wird der Schluß nicht allzu gewagt erscheinen, die chemisch-physikalischen Unterschiede der beiden Gallerten aus dem Ursachenkomplex der Geschlechtsverschiebung auszuschalten.

Aber ein anderer Punkt muß hier noch erörtert werden. In der technischen Ausführung des Isolierungsverfahrens bestanden doch noch Unterschiede zwischen den beiden Medien. Die Gelatine wurde immer im flüssigen Zustande beimpft, also Gußverfahren, während der Agar nach dem Erstarren durch Verteilung des Impfmateriäls mit einem Glasspatel beimpft wurde. Daß aber diese Unterschiede ohne Bedeutung sind, zeigt Tabelle VI, in der beide Medien sowohl in Strich- wie in Gußmethodik beimpft wurden²⁾.

Tabelle 6.

Malzgelatine gegossen	28 : 0
Malzgelatine gestrichen	30 : 0
Malzagar gegossen	5 : 18
Malzagar gestrichen	5 : 52

Somit mußte die Jagd nach den Ursachen der Geschlechtsverschiebung bei den chemischen Verschiedenheiten beider Gallerten ansetzen. Da mußte sich zuerst der Gedanke aufdrängen, rein die Unterschiede im Säuregehalt der beiden Medien könnten die Unterdrückung des einen Geschlechtes bewirken. In der Tat sind die Differenzen recht erheblich.

2) Hier wie in sämtlichen weiteren Versuchen wird das Medium der Brandsporenaussaat nicht mehr besonders angegeben. Es handelt sich dann immer um 4—6 Tage alte Brandsporenaussaaten in 3 % Malzextrakt.

Malzagar (nach der oben benutzten Wertangabe) schwankt zwischen 0,6—0,8 sauer, während Malzgelatine Werte von 2,4—2,8 sauer aufweist, Peptonzuckergelatine etwas niedriger 2,3 sauer.

Versuch VII.

Welchen Einfluß hat der Säuregehalt des Mediums der Sporidienisolierung auf die Unterdrückung des einen Geschlechts? Sporidienisolierung in „agarsaurer“ Gelatine. „Gelatinesaurer“ Agar wird nicht mehr fest, auch nicht bei Verwendung von 5 % Agar. Dieser Versuch mußte somit ausfallen.

Malzgelatine 2,5	sauer	28 : 0
Malzgelatine 0,3—0,5	sauer	29 : 1

Spielte der Säuregrad hier eine Rolle, dann hätte in 0,3—0,5 saurer Gelatine das gleiche Verhältnis, wie es für Agar typisch ist, auftreten müssen. Das ist aber nicht der Fall.

Die Unterdrückung des b-Geschlechtes durch Gelatine — nur diese soll in Folgendem behandelt werden, nicht die gelegentlich auf Malzagar auftretende Hemmung der a-Sporidien — läßt sich weder durch chemisch-physikalische (mit Vorbehalt allerdings), noch durch Säuregradunterschiede zwischen Gelatine und Agar erklären. Sondern in der Gelatine müssen irgend welche Stoffe vorhanden sein, die dem Agar fehlen und die die b-Sporidien in ihrem Wachstum hemmen, vielleicht sogar abtöten. Licht warfen auf diese Verhältnisse Versuche mit Gelatinesorten verschiedener Herkunft. In den ersten Versuchsserien waren auf den Gelatineplatten stets annähernd gleichgroße Kolonien aufgetreten, die mit verschwindenden Ausnahmen dem a-Geschlecht angehörten. Eine späterhin in Gebrauch genommene Gelatinesorte (Friedensware, die ich der Liebenswürdigkeit von Frau Dr. Harder verdanke, wofür auch an dieser Stelle verbindlichster Dank gesagt sei) gab ein ganz verändertes Bild. Auf den 10—14 Tage alten Platten (Zimmertemperatur 18—20°) waren Kolonien in ungefähr gleicher Anzahl von ganz auffallend verschiedener Größe gewachsen. Die großen Kolonien erwiesen sich bei der Geschlechtsprüfung sämtlich als a, die kleinen sämtlich als b. Hier war also die in den ersten Versuchen beobachtete vollkommene Unterdrückung der b-Sporidien nicht eingetreten, die b-Kolonien waren nur gegenüber den a-Kolonien ganz erheblich in ihrem Wachstum gehemmt. Verschiedene Gelatinesorten verhalten sich hierin ganz verschieden. Die Tabelle VIII, in der, wie auch schon in den vorhergehenden, die kleinen Kolonien durch fette Zahlen wiedergegeben sind, zeigt ein stufenförmiges Absteigen von solchen Sorten, auf denen die Sporidien überhaupt nur sehr schlecht gedeihen, über solche der ersten Versuche, wo nur a-Formen wachsen, zu anderen, auf denen a als große und b als kleine Kolonien auftreten. An den Anfang dieser Reihe ließen sich noch Sorten stellen, auf denen weder a noch b zur Entwicklung kommt. Daß Größenunterschiede der Kolonien bei den Sorten I und II und Verschiedenheit der

Geschlechter parallel laufen, haben mehrfache Versuche immer wieder bestätigt. In 11 Versuchen unter verschiedenen veränderten Bedingungen wurden im ganzen 317 Kulturen isoliert, von denen genau den 214 in den Protokollen als groß bezeichneten Kolonien 214 a-Stämme und den 93 kleinen Kolonien 93 b-Stämme entsprachen. Bei zwei weiteren Versuchen traten Abweichungen auf, die in einem Falle darin bestanden, daß b nur unter den kleinen neben a auftrat, im anderen, daß auch unter die großen Kolonien einige wenige b eingesprengt waren, während die kleinen nur aus b bestanden, Abweichungen also, die im Prinzip dem oben geschilderten Bilde entsprechen.

Tabelle 8.

	Wachstum	Kolonien abstechbar nach	Größenunter- schiede der Kolonien	Geschlechts- verhältnis
3 % Malz + 10 % Gelatine IV	gehemmt	22 Tagen	unwesentlich	20 : 0
3 % Malz + 10 % Gelatine 0	gut	10-12 „ cc.	unwesentlich	30 : 0
3 % Malz + 10 % Gelatine I	gut	10-12 „ cc.	sehr scharf	20 : 8
3 % Malz + 10 % Gelatine II	gut	10-12 „ cc.	sehr scharf	14 : 6

Besonders anziehend und interessant gestaltete sich diese Beobachtung durch die Tatsache, daß die Sporidienkolonien auf Malzagar gerade das entgegengesetzte Verhalten zeigen. Auch hier sind mitunter deutlich große und kleine Kolonien zu unterscheiden, doch gehören die großen dem b-Geschlecht und die kleinen dem a-Geschlecht an. Typisch für Malzagar ist im allgemeinen aber ein gleich gutes Wachstum von a- und b-Sporidien. Eine eingehende Durcharbeitung der Hemmung des Malzagars wurde noch nicht versucht. Es erübrigt sich also im Augenblick weiter darauf einzugehen. Jetzt soll nur über die Hemmung des b-Geschlechtes durch Gelatine Klarheit gewonnen werden.

Durch diese Feststellungen war also der Kernpunkt des ganzen Problems verlagert. Nicht mehr handelt es sich darum, festzustellen, ob überhaupt nur das eine oder das andere Geschlecht vorhanden ist, sondern auf verschiedene Größe der Kolonien und auf die Frage, welchem Geschlecht die großen Kolonien, welchem die kleinen entsprechen, mußte geachtet werden. Nicht mehr die in den Tabellen wiedergegebenen Zahlen stellen das Wesentliche daran dar, sondern die durch Fettdruck bezeichnete Lage der kleinen Kolonien. Man hat es dabei natürlich in der Hand, bald nur große, bald nur kleine Kolonien abzustechen und so durch Ausfall der einen Sorte eine vollkommene Geschlechtsverschiebung zu erzielen. Das tatsächliche Geschlechtsverhältnis gibt jetzt nur die Zahl der auf den Platten gewachsenen großen und kleinen Kolonien wieder. Dieses Verhältnis war in der großen Mehrzahl der Fälle gleich 1:1, eine weitere Bestätigung für den vorher erbrachten Nachweis, daß

die Brandsporenaussaaten gleiche Mengen von a- und b-Sporidien enthalten. In 9 Versuchen nur weisen die Protokolle die Bemerkung auf: Große Kolonien weniger als kleine, oder selten und umgekehrt. Das Protokoll weist aber in allen diesen Fällen nach, daß aus dem gleichen Röhrchen mit gekeimten Brandsporen eine Reihe von Sporidienisolierungen auf anderen Nährsubstraten vorgenommen war, und daß bei diesen ein Überwiegen von großen oder kleinen Kolonien und damit eine Verschiebung des tatsächlichen Geschlechtsverhältnisses nicht eintrat. Dies deutet auf irgend welche Zufälligkeiten hin, die außerhalb der Macht des Experimentators liegen.

Die Beobachtung, daß die verschiedenen Gelatinesorten verschieden reich an dem „Hemmungskörper“ sind, erlaubten, seine chemische Natur enger zu umgrenzen. Die Gelatine (Glutin) ist ein echtes Protein (siehe Cohnheim 1911). Gewonnen wird sie durch Auskochen von Kollagen, der Grundsubstanz von Knochen und Knorpel. Wie die echten Eiweiße kann sie hydrolytisch oder durch eiweißlösende Fermente über Albumosen und Peptone zu Aminosäuren gespalten werden. Der vollkommene Abbau bis zu Aminosäuren ergibt einen auffallend hohen Gehalt von Glykøkoll, „Leimsüß“ (19 g in 100 g Glutin), ferner einen hohen Anteil von Glutaminsäure (14 g). Die anderen Aminosäuren verschwinden hinsichtlich ihrer Menge hinter diesen beiden. Das käufliche Handelsprodukt ist natürlich noch mit allerhand mehr oder weniger scharf chemisch faßbaren Substanzen verunreinigt. Sie enthält ferner verschiedene Salze.

So war nun die Frage zu entscheiden: Welcher der 3 Bestandteile des Handelsproduktes, das Glutin, die organischen Verunreinigungen, oder die Salze bedingen die Hemmung des b-Geschlechtes?

Beginnen wir mit der Frage nach der Bedeutung der Salze. Darüber brachte folgende Versuchsanordnung Klarheit.

Versuch IX.

20 g Gelatine werden 3 Tage lang in der Kälte mit 100 ccm Aqua dest. ausgezogen. Die Annahme ist erlaubt, daß nach dieser Zeit durch Diffusion zwischen dem Salzgehalt der Gelatine und des Wassers sich ein Gleichgewichtszustand eingestellt hat. 50 ccm dieses Gelatinewassers werden mit 3 % Malz und 2 % Agar zum Nährboden verarbeitet. Die hierin enthaltene Menge von Salzen entspricht also der sonst in 10 % Gelatine befindlichen. Die Platten wiesen keine besonderen Größenunterschiede auf. Das Geschlechtsverhältnis betrug 16:13, also nichts von Hemmung und Unterdrückung der b-Sporidien. Die Salze der Gelatine sind somit für unsere Frage wohl bedeutungslos.

Nun die Rolle der organischen Verunreinigungen, die die Herstellungstechnik des Handelsproduktes mit sich bringt.

Diese können je nach dem Ausgangsmaterial und der Fabrikationsart verschiedenster Natur sein. Doch erübrigt es sich, näher darauf einzugehen. Es mußte versucht werden, sie durch weitergehende Reini-

gung zu entfernen. In der physiologischen Chemie sind verschiedene Methoden zur Herstellung reiner Glutinpräparate üblich. Als bestes wird das von Sadikoff (1916) veröffentlichte Verfahren angegeben. Es besteht in einem Auswaschen mit 20 % $MgSO_4$ -Lösung, Auflösen darin, Ausfällen des Glutins mit HCl , Auswaschen und Lösen in Aqua dest., Fällern mit Alkohol, Neutralisieren der Säure mit NH_3 , wiederholtem Auswaschen der Alkoholfällung, die dann gebrauchsfertig ist. Die nach dieser Methodik gereinigte Gelatine erstarrte bei Zimmertemperatur nicht mehr, erst bei ca. 10^0 . Die Platten mußten daher im kalten Gewächshaus gehalten werden, dementsprechend war das Wachstum der Kolonien verzögert. Erst nach 40 Tagen waren sie reif zum Abstechen. Gewisse Größenunterschiede waren zwar entwickelt, doch nicht sehr ausgesprochen. Die Prüfung gab das Verhältnis 30:6. Nur unter den kleinen Kolonien war b vertreten, daneben aber auch 4 a-Kulturen. Die großen bestanden nur aus a. Im Prinzip stimmt das Resultat also mit dem sonst bei Gelatine üblichen überein. Die Tatsache, daß trotz Elimination der Verunreinigungen doch die Hemmung des b-Geschlechtes erhalten bleibt, beweist klar, daß diese Verunreinigungen ohne Einfluß auf die Hemmung sind.

Das wirksame Agens müssen wir also in den Eiweißstoffen des Glutins selbst suchen. Der Weg, um der Bedeutung der Eiweißstoffe beizukommen, bot die Benutzung von Agar- und Gelatinegemischen. Gibt man gewöhnlichem Malzagar einen Zusatz von 10 % Gelatine, so tritt in den Endresultaten nur die Wirksamkeit der Gelatine hervor. Wir erhalten wieder die typische Hemmung bzw. Unterdrückung der b-Sporidien. Eine quantitative Auswertung derartiger Mischnährböden gibt Versuch X.

Tabelle 10.

Malzagar+10% Gelatine	60:0 u. 24:6
Malzagar+9% Gelatine	16:13
Malzagar+8% Gelatine	21:9
Malzagar+7% Gelatine	17:13
Malzagar+5% Gelatine	4:25
Malzagar+1% Gelatine	6:24

Zusatz von 7 % Gelatine zum Malzagar vermag noch das b-Geschlecht zu hemmen, bei einer Mischung von 5 % Gelatine mit Malzagar ist aber der Hemmungskörper nicht mehr im genügenden Maße vorhanden. Hier kommen jetzt die Stoffe des Malzagars zur Wirkung, die das a-Geschlecht hemmen. Diese Methodik erlaubte, den Einfluß verschiedener Veränderungen der Gelatine durchzuprüfen. Wie weit kann die Gelatine abgebaut werden, bis sie in Mischung mit Agar die b-Form nicht mehr hemmt?

Der Abbau wurde einmal auf einem schonenden Wege durchgeführt. Bei längerem Erhitzen im Dampftopf wird die Gelatine teils durch die Wärme, teils auch durch ihren Säuregehalt zu Albumosen eventl. Peptonen aufgespalten und erstarrt dann nicht mehr. Einen Versuch dieser Art gibt Tabelle XI.

Tabelle 11.

Malzagar + 10 % Gelatine 24 Stunden im Dampftopf	16 : 13
Malzagar + 10 % Gelatine 5 Stunden im Dampftopf	6 : 24

Es gelingt also durch längeres Erhitzen das Glutin soweit abzubauen, daß es seine hemmende Wirkung auf die b-Sporidien nicht mehr ausübt. Wie weit hierbei der Abbau gegangen ist, ließe sich erst analytisch feststellen. Mit einer gewissen Sicherheit kann man aber Spaltung bis zu Aminosäuren durch Hydrolyse mit starken Säuren annehmen.

Versuch XII.

50 ccm 1 % Gelatinelösung wurden mit 1 ccm konz. HCl 1 Stunde lang gekocht, dann mit KOH bis fast an den Neutralpunkt herangebracht und mit 3 % Malz und 4 % Agar zum Nährboden verarbeitet. Die Platten wiesen zwar deutlich unterschiedliche Kolonien in gleicher Anzahl auf, aber die beiden Geschlechter waren nicht auf große oder kleine beschränkt — 8:22. Die hemmende Wirkung der Gelatine war also durch den Abbau bis zu Aminosäuren bezw. noch weiteren Spaltprodukten aufgehoben worden. Schon dieses Ergebnis weist darauf hin, daß der Hemmungskörper oberhalb der Aminosäuren zu suchen sein wird.

Ein dritter Abbauersuch wurde mit dem peptischen Enzym der Sporidien vorgenommen. Ein Kölbchen mit 100 ccm Malzgelatine wurde mit einem Sporidiengemisch beider Geschlechter beimpft. Nach 2 Monaten war die Verflüssigung so weit fortgeschritten, daß 50 ccm davon unter nochmaligem Zusatz von 3 % Malz mit 2 % Agar zum Nährsubstrat verwendet werden konnten. Sehr deutliche Unterschiede in der Größe der Kolonien traten auf, die Geschlechtsprüfung zeigte aber den Agartyp — 10:10. Auch hier hat die fermentative Spaltung die Hemmung aufgehoben.

Diese Abbauersuche erlauben natürlich nur ungefähre Vermutungen über den dabei erzielten Grad der Spaltung des Glutins auszusprechen. Eine bestimmte Umgrenzung der letzten noch wirksamen Abbaustufe war erst von Versuchen mit reinen Präparaten zu erwarten. Derartige reine Präparate von Spaltprodukten sowohl des Glutins als auch anderer Eiweißkörper verdanke ich der Liebenswürdigkeit von Herrn Geheimrat *Abderhalden* (Halle), wofür auch an dieser Stelle herzlichster Dank gesagt sei. Eine Mischung von 1 % Glutinspepton mit Malzagar z. B. gibt noch deutlich die kleine Hemmung wie Gelatine — 15:15. Die beiden quantitativ am meisten hervortretenden Aminosäuren der Gela-

tine, das Glykokoll und die Glutaminsäure³⁾ hemmen aber die b-Sporidien nicht mehr. Tabelle XIII zeigt eine Versuchreihe mit diesen beiden Substanzen.

Tabelle 13.

Malzagar + 5 % Glykokoll	6 : 23
Malzagar + 2 % Glykokoll	5 : 25
Malzagar + 1 % Glykokoll	12 : 18
Malzagar + 0,5 % Glykokoll	6 : 24
Malzagar + 2 % Glutaminsäure	11 : 18

Die Hemmungswirkung der Gelatine ist durch diesen Versuch nach unten hin einigermaßen umgrenzt. Eine noch schärfere Umgrenzung wäre vielleicht mit Polypeptiden zu erreichen gewesen, doch standen mir derartige Kostbarkeiten nicht zur Verfügung. Offen bleibt aber noch die Frage, ob das unabgebaute Glutin als solches schon hemmt, oder ob die Hemmung bei Benutzung der Handelsgelatine etwa nur durch die darin stets enthaltenen bzw. bei der Sterilisation entstehenden Albumosen oder Peptone ausgeübt wird. Diese Frage konnte nicht direkt geprüft werden. Sondern nur indirekt konnten aus dem Verhalten anderer Eiweißkörper Schlüsse gezogen werden. In Tabelle XIV sind die Ergebnisse von Versuchen mit anderen Eiweißkörpern, teils reinen Präparaten, teils Rohprodukten, zusammengestellt.

Das wichtigste Ergebnis dieser Versuchsserie liegt darin, daß man auch durch Zusatz einer ganzen Reihe anderer Eiweißarten als Gelatine zum Agar eine Hemmung des b-Geschlechtes erreichen kann. Von den genuinen Eiweißen ist das Edestin als einziges wirksam. Doch läßt sich dieses Ergebnis nicht als Beweis dafür anführen, daß den nativen Eiweißen als solchen die Hemmungswirkung zukommt. Denn bei der Bereitung des Edestinagar war es nicht zu umgehen, die hohe Temperatur des Dampftopfes darauf einwirken zu lassen, wobei das Eiweiß koagulierte und sicherlich teilweise weiter aufgespalten wurde. Erst diese Spaltprodukte könnten die b-Sporidien unterdrückt haben. Das Alkalbuminat dagegen, das beim Kochen nicht mehr gerinnt, gibt auch in höheren Konzentrationen als den sonst angewendeten keine Hemmung. Von den reinen Albumosen- und Pepton-Präparaten und ebenso von den daran reichen Nährpräparaten sind alle mit Ausnahme des Plasmon wirksam. Diese Ergebnisse führen also zu der Anschauung, daß nicht die nativen Eiweißkörper auf die b-Sporidien schädigend einwirken, sondern daß erst ihre Spaltprodukte der Albumosen- und Peptonstufe hemmen. Eine Stütze findet diese Anschauung in den Beobachtungen der Tabelle VIII, daß die verschiedenen Gelatinesorten

3) Diese verdanke ich dem freundlichen Entgegenkommen von Herrn Prof. Ackermann (Würzburg).

Tabelle 14.

				a : b
3 %	Saccharose	2 %	Agar 1 % Kasein nach Hammersten	15 : 15
3 %	"	2 %	" 3 % " " "	16 : 10
3 %	"	2 %	" 1 % Edestin (Merck)	21 : 8
3 %	"	2 %	" 1 % Alkalialbuminat (Grübler)	12 : 10
3 %	"	2 %	" 3 % " "	21 : 9
3 %	"	2 %	" 1 % Deuteroalbumose (Abderhalden)	22 : 10
3 %	"	2 %	" 1 % Protalbumose (Merck)	18 : 11
3 %	"	2 %	" 1 % Dysalbumose (Merck)	17 : 11
3 %	"	2 %	" 0,5 % Seidenpepton (Abderhalden)	17 : 11
3 %	"	2 %	" 0,5 % Gliadinpepton (Abderhalden)	18 : 12
3 %	"	2 %	" 0,5 % Pepton aus Eiereiweiß (Abderhalden)	24 : 6
3 %	"	2 %	" Alkalialbuminatserum nach Klein (4 : 1)	26 : 2
3 %	"	2 %	" 1 % Materna (Dr. Klopfer-Dresden)	23 : 7
3 %	"	2 %	" 1 % Nutrose	22 : 7
3 %	"	2 %	" 2,5 % Urkraft (Oettker-Werke-Bielefeld)	17 : 12
3 %	"	2 %	" 1 % Plasmon	14 : 16
3 %	"	2 %	" 3 % "	10 : 20
3 %	"	2 %	" 0,5 % Pepton (Witte)	66 : 21
3 %	"	2 %	" mit Fleischbrühe als Grundlage	23 : 1
3 %	"	2 %	" kondensierte Milch 1 : 5 verdünnt	23 : 7

in verschiedenem Grade hemmend wirken. Wäre das native Glutin, das den Hauptbestandteil der Handelsgelatine ausmacht, das wirksame Prinzip, so ließe sich diese verschiedene Wirksamkeit schwer einsehen. Der Anschauung aber, daß die Albumosen-Peptonaufspaltung je nach Umständen sehr schwanken kann, stehen keine Schwierigkeiten im Wege. Eine weitere Stütze liegt in den quantitativen Auswertungen der einzelnen Eiweiße. Ein 5 % Gelatinezusatz zum Agar war bereits unwirksam, während die Albumosen und Peptone noch in 0,5 bzw. 0,25 % Zusätzen wirksam sind (siehe Tabelle XV). Hoher Peptongehalt (1 %

Tabelle 15.

3 %	Saccharose	2 %	Agar 1 % Pepton (Witte)	23 : 7
3 %	"	2 %	" 0,5 % Pepton	66 : 21
3 %	"	2 %	" 0,25 % Pepton	15 : 15
3 %	"	2 %	" 0,1 % Pepton	15 : 8
3 %	"	2 %	" 0,01 % Pepton	12 : 17
3 %	"	2 %	" 1 % Nutrose	22 : 7
3 %	"	2 %	" 0,1 % Nutrose	7 : 11

bis 1,5 %) schädigt überhaupt das Wachstum beider Geschlechter. Erst nach ungefähr 1 Monat waren auf den Platten ganz kümmerliche Kolonien gewachsen, — ein Parallelfall zu den Gelatineproben, die überhaupt keine Sporidien aufkommen ließen. So ist die Anschauung zwar nicht direkt bewiesen, doch indirekt durch Vergleich mit anderen Eiweißarten wohl begründet, daß das wirksame Prinzip der Handelsgelatine nicht das native Glutin ist, sondern daß es die in geringen Mengen darin vorhandenen Spaltprodukte des Glutins der Albumosen- oder Peptonstufe darstellen.

Zur äußersten Vorsicht, um Vergleichsergebnisse bei dem doch recht diffizilen Arbeiten mit Eiweißkörpern in der Hand zu haben, wurden noch Versuche mit einer anderen Gallert gebenden Substanz als Agar, der Kartoffelstärke, ausgeführt. 8 % Kartoffelstärke, die durch vorsichtiges Erhitzen auf dem Wasserbade von 70—80° verkleistert wird, gibt eine brauchbare Gallerte, ohne daß Flockenbildung dabei stets zu vermeiden ist. Auch hierbei hemmt der Peptonzusatz (0,5 % das b-Geschlecht — 18:7 — während in reiner Stärkegallerte beide Geschlechter gleichmäßig — 34:19 — auf größere und kleinere Kolonien verteilt sind.

Nachdem die Bedeutung der Eiweißkörper für die Hemmung des b-Geschlechts klargestellt war, ergab sich die Frage, ob nicht noch anderen Stoffen diese Hemmung zukäme. Die Protokolle einiger Stichproben mit organischen Körpern gibt Tabelle XVI wieder. Keiner der untersuchten Stoffe hat eine hemmende Wirkung auf das b-Geschlecht.

Tabelle 16.

Malzagar +	1 % Asparagin	11 : 19
Malzagar +	0,01 % Phenol	9 : 11
Malzagar +	0,005 % Phenol	8 : 19
Malzagar +	1 % Dextrin	9 : 21
Malzagar +	3 % Glyzerin	6 : 23
3 % Mannit	2 % Agar	9 : 20
3 % Inulin	2 % Agar	11 : 19
3 % Maltose	2 % Agar	12 : 8

Ein positives Ergebnis brachten aber entsprechende Versuche mit verschiedenen Salzzusätzen zum Malzagar. Tabelle XVII zeigt, daß von allen untersuchten Salzen allein das Dinatriumphosphat in 2 % Zusatz das Wachstum der b-Kolonien zurückhält. Der Versuch wurde mehrmals mit gleichsinnigem Resultat angestellt. Auffallend ist es, daß das entsprechende Dikaliumphosphat, sowie Ammon-Magnesium-Calciumphosphat ohne Wirkung bleiben. Die Hemmung kommt allein den Na_2HPO_4

zu. Die Tabelle zeigt noch als Nebenbefund, daß bei Zusatz gewisser Salze (5% NaCl, 1% Kaliumferrozyanid) die Hemmung der a-Sporidien, die mitunter dem Malzagar eigen ist, zu einer absoluten Unterdrückung der a-Kolonien gesteigert werden kann.

Dieser Befund ließ den Verdacht aufkommen, daß die Hemmung der Eiweiße überhaupt nur auf ihrem seinerzeit nicht kontrollierten Gehalt an Natriumphosphat beruhe. Für einige der ungereinigten Handelspräparate wird von den Herstellern ein erheblicher Gehalt an Phosphaten angepriesen. In einigen der reinen Eiweiße aber ließ sich auf analytischem Wege kein Phosphat nachweisen. Daneben entkräftete aber ein Versuch mit veraschtem Eiweiß diesen Verdacht. Ein Zusatz von 3% Asche von Materna (vom Hersteller als besonders phosphatreich bezeichnet) zum Zuckeragar brachte ein normales Verhältnis beider Geschlechter — 13:17. Damit ist dieser Einwurf widerlegt.

Tabelle 17.

Malzagar + 2,5 % NaCl	10 : 10
„ + 5 % NaCl	0 : 30
„ + 5 % KCl	6 : 21
„ + 1 % Na ₂ HPO ₄	19 : 11
„ + 2 % Na ₂ HPO ₄	57 : 15
„ + 3 % Na ₂ HPO ₄	54 : 6
„ + 2 % K ₂ HPO ₄	22 : 36
„ + 3 % K ₂ HPO ₄	11 : 19
„ + 1 % KH ₂ PO ₄	15 : 15
„ + 2 % KH ₂ PO ₄	12 : 15
„ + 3 % KH ₂ PO ₄	9 : 20
„ + 0,5 % K ₃ PO ₄	12 : 18
„ + 2 % MgHPO ₄	11 : 19
„ + 3 % MgHPO ₄	20 : 10
„ + 1 % (NH ₄) ₂ HPO ₄	12 : 16
„ + 1 % (NH ₄) ₂ HPO ₄	11 : 13
„ + 3 % K ₂ SO ₄	6 : 23
„ + 3 % KNO ₃	5 : 24
„ + 5 % KClO ₃	6 : 24
„ + 1 % K ₄ Fe(CN) ₆	0 : 18

Alle diese etwas weitschweifigen Exkursionen in die physiologische Chemie haben gleichzeitig die Hauptfragestellung nach sekundären Geschlechtsmerkmalen der Sporidien geklärt. Fest steht, daß verschiedene Eiweißkörper und Dinatriumphosphat in bestimmten Konzentrationen die Kolonien des b-Geschlechtes in ihrem Wachstum gegenüber den a-Kolonien hemmen oder sogar vollkommen unterdrücken. Die beiden

Geschlechter reagieren also unter sonst gleichen Außenbedingungen auf den gleichen Stoff verschieden, unterscheiden sich somit außer in ihrer geschlechtlichen Tendenz noch durch physiologische Eigentümlichkeiten. In Analogie zu den Erscheinungen bei Tieren und höheren Pflanzen ist man berechtigt, auch hier von sekundären Geschlechtsmerkmalen, aber physiologischer Natur zu sprechen. Daß diese Merkmale genotypisch verankert sind, dafür spricht die Beobachtung, daß auch Brandsporenmateriale von *Dianthus chinensis*, die durch Zillig mit Sporidien der Spezialform von *Di. deltooides* infiziert worden war, das typische Bild der Unterdrückung des einen Geschlechts aufwies. Die Passage über einen neuen Wirt und das Durchlaufen des diploiden Brandsporenstadiums hatte also diese Merkmale nicht verwischt. Die Verhältnisse beim Antherenbrand gleichen darin in manchen Beziehungen denen der heterothallischen Mucorineen. Für verschiedene von ihnen hatte schon Blakeslee ein reicheres üppigeres Wachstum des einen Geschlechts (+) festgestellt gegenüber dem anderen (-). Orban (1919) hat dann diese nur bei eingehender Betrachtung bemerkbaren Unterschiede bei *Phycomyces nitens* durch Auswahl besonderer Nährbodenzusammensetzungen noch verschärfen können. So bildete das - Geschlecht auf Malzagar mit Eosinzusatz bereits nach 2 Tagen zahlreiche Sporangien, während der - Stamm noch keine aufwies. Die schärfsten Unterschiede bestanden in der Schnelligkeit der Sporenkeimung. Auf Malzagar mit 18 % KNO_3 oder 7 % NaCl keimen - Sporen überhaupt nicht mehr, während + Sporen ungehindert zu Myzelien auswachsen - ein Verhalten, das an die vollkommene Unterdrückung der b-Kolonien durch gewisse Gelatinesorten erinnert. Ob es möglich ist, das Geschlecht eines *Phycomyces*-Stammes nicht durch Kombination mit Stämmen bekannten Geschlechtes, d. h. auf dem Wege der Geschlechtsprüfung, sondern rein aus seinen sekundären Merkmalen zu bestimmen, hat Orban nicht untersucht. Einige diesbezügliche Versuche beim Antherenbrand seien hier wiedergegeben.

Nach den vorherigen Resultaten hätte man erwarten können, daß die b-Sporidien auf gewissen Gelatinesorten überhaupt nicht wachsen würden. Das war aber nicht der Fall. Bei Beimpfung von Gelatine, die sonst die b-Sporidien vollständig unterdrückte, mit Reinkulturen wuchsen die b-Stämme ebenso gut wie die a-Stämme. Die Impfung einer Gelatine, auf der sonst die b-Kolonien gehemmt waren, mit genau ausgezählten Mischungen beider Geschlechter (Auszählen der Sporidien-Aufschwemmungen im Thoma-Zeiß-Blutkörperchenzählapparat, Mischen der Aufschwemmungen zu gleichen Teilen, Abimpfen von der gründlichst geschüttelten Mischung) lieferte auch nicht das erwartete Bild. Ein Versuch, der von einer Mischung im Verhältnis 110:96 ausging, bot ein Verhältnis von 17:11, ein anderer mit 53:64 ein Verhältnis von 26:32, ohne daß in den Platten die sonst gewohnten scharfen Größenunterschiede aufgetreten wären. Hier mag vielleicht die Kultur auf künstlichem Nährsubstrat, die sich bei den benutzten Stämmen auf über

6 Monate belief, die sekundären Unterschiede verwischt haben. Parallelen dazu könnte man z. B. in der allmählichen Anpassung mancher pathogenen Bakterien wie Meningokokken, Gonokokken usw. an die Kultur sehen. Das gleiche negative Resultat wie die Gelatineversuche gaben Nährböden anderer Zusammensetzung (2 % , 1 % , 0,1 % Pepton; 3 % Glycerin; 2 % Glykokoll; 1,5 % Stärke; 1 % Lävulose; 1 % Inulin; 1 % Milchlzucker; 1 % Traubenzucker; 1 % Harnstoff. Malzagar mit Zusatz von: 1,5 % Deuteroalbumose; 7,5 %, 5 %, 3 % KNO_3 ; 2,5 % Na_2HPO_4 ; 7,5 %, 5 % NaCl ; 1 % $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$). Nie war bei Beimpfung mit je einer Öse einer ganzen Reihe von Stämmen beider Geschlechter ein ausschließliches Wachstum des einen zu beobachten. Besondere Hoffnungen waren auf den Deuteroalbumoseagar gesetzt worden. Auf den Platten der Versuchsreihe XIV waren seinerzeit die Unterschiede zwischen großen und kleinen Kolonien besonders scharf gewesen. Bei oberflächlicher Betrachtung zeigten die 13 Tage alten Platten nur Kolonien von ungefähr gleichem Durchmesser, wie sie sonst als „groß“ bezeichnet wurden. Erst genaueres Hinsehen ließ daneben noch winzigste Pünktchen erkennen, die sich unter dem Mikroskop als Kolonien erwiesen. Diese winzigen Kolonien waren erst nach 28 Tagen zu der Größe herangewachsen, wie sie sonst die gehemmten b-Sporidien zeigten. Aber auch mit diesem Deuteroalbumoseagar ließen sich die Geschlechter nicht unterscheiden. Eine Prüfung der Geschlechtstendenz der Sporidien mittels ihrer sekundären Geschlechtscharaktere läßt sich also im Augenblick vielleicht wegen einer allmählichen Verwischung der Unterschiede durch die Kultur nicht durchführen.

Weiteres Interesse beanspruchte die Frage, ob sich die Sporidien nicht noch durch andere Merkmale sekundärer Art als in ihrem Verhalten gegen Eiweißkörper und Natriumphosphat unterscheiden. Ein weiteres Merkmal haben die obigen Versuche bereits beigebracht. Auf Malzagar tritt gelegentlich das umgekehrte Verhältnis ein als auf Gelatine oder Eiweißagar, das durch NaCl -Zusatz noch verstärkt werden kann. Hier sind dann die a-Sporidien gehemmt oder ganz unterdrückt, die b-Sporidien zu großen Kolonien ausgewachsen. Doch wurde diese Hemmung der a-Sporidien noch nicht einer eingehenderen Untersuchung unterzogen. Einige Stichproben auf weitere sekundäre Merkmale wurden unternommen, lieferten aber keine brauchbaren Resultate. Sie erstreckten sich auf: Widerstandsfähigkeit gegen höhere Temperaturen und Desinfizientien (Phenol), kapillares Steigvermögen in Filtrierpapier und Katalasegehalt. Trotz dieser negativen Ergebnisse besteht eine gewisse Wahrscheinlichkeit, daß geduldiges Suchen weitere sekundäre Geschlechtsmerkmale zutage fördern wird.

Zusammenfassung von Teil II*).

Andeutende Beobachtungen von Kniep (1919) über ein verschiedenes physiologisches Verhalten der beiden Geschlechter der Sporidien von *Ustilago violacea* f. sp. *Dianthus deltooides* wurden dahin erweitert:

*) Zusammenfassung von Teil I siehe S. 18.

1. Impft man Brandsporen auf Malzlösungen, so werden gleichviel Sporidien der beiden Geschlechter gebildet.

2. Isoliert man aus diesen „Brandsporenaussaaten“ die Sporidien mittelst Plattenverfahren mit Malzgelatine, so erhält man je nach Gelatinesorte nur Kolonien des a-Geschlechtes oder beide Geschlechter zu gleichen Teilen, wobei im letzten Falle die b-Kolonien gegenüber den a-Kolonien in ihrem Wachstum bedeutend gehemmt sind.

3. Die gleiche Wirkung, Hemmung der b-Kolonien, erzielt man auch bei Benutzung von Malzagar mit verschiedenen Eiweißzusätzen. Genuines Eiweiß hemmt nicht, Eiweißabbauprodukte der Albumosen- und Peptonstufe sind wirksam, Aminosäuren geben die Hemmung nicht mehr. Gleichen Erfolg erreicht man bei Malzagar mit 2% Na_2HPO_4 -Zusatz, nicht mit dem entsprechenden Kaliumsalz.

4. Es ist wahrscheinlich, daß die Hemmung bzw. Unterdrückung der b-Sporidien durch Gelatine nicht durch das native Glutin, sondern durch ihren Gehalt an Glutinabbauprodukten der Albumosen- und Peptonstufe beruht.

5. Diese Unterschiede im physiologischen Verhalten der beiden Geschlechter haben sich an einem großen Zahlenmaterial genügend konstant erwiesen, um hier von sekundären Geschlechtsmerkmalen physiologischer Natur sprechen zu können.

6. In längere Zeit auf Nährböden gezüchteten Kulturen verwischen sich die anfänglich starken Unterschiede. Es gelingt nicht, mit Hilfe der sekundären Geschlechtsmerkmale die primäre geschlechtliche Tendenz einer lange Zeit gezüchteten Sporidienreinkultur zu bestimmen.

Zum Schluß ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Kniep für die Überlassung des Themas und für das stete Interesse, das er der Arbeit entgegenbrachte, herzlichst zu danken. Herrn Dr. Zillig bin ich für die liebenswürdige Überlassung von reichlichem Brandsporenmateriale ebenfalls zu großem Dank verpflichtet.

Würzburg, Botanisches Institut, Mai 1921.

Literatur.

- Brefeld, O., 1883. Die Brandpilze. Untersuchungen a. d. Gesamtgebiete der Mykologie. Heft 5. Münster i. W.
- Claußen, P., 1912. Zur Entwicklungsgeschichte der Ascomyzeten. *Pyronema confluens*. Zeitschrift für Botanik 4, S. 1.
- Cohnheim, O., 1911. Chemie der Eiweißkörper. Braunschweig. Friedr. Vieweg & Sohn.
- Klebs, G., 1898. Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze I. *Sporodinia grandis* Link. Jahrb. f. Wiss. Bot. 32, S. 1—70.
- Klebs, G., 1899. Jahrb. f. Wiss. Bot. 33.
- Kniep, H., 1918. Über die Bedingungen der Schnallenbildung bei den Basidiomyzeten. Flora N. F. 11—12, S. 380—395.
- Kniep, H., 1919. Untersuchungen über den Antherenbrand (*Ustilago violacea* Pers.). Ein Beitrag zum Sexualitätsproblem. Zeitschr. f. Bot. 11, S. 275—284.

- Orban, G., 1919. Untersuchungen über die Sexualität von *Phycomyces nitens*. Beihefte z. bot. Zentralbl. I. Abtlg. 36, S. 1—59.
- Raciborski, 1896. Über den Einfluß äußerer Bedingungen auf die Wachstumsweise von *Basidiobolus ranarum*. Flora 82, S. 107—132.
- Sadikoff, 1906. Untersuchungen über tierische Leimstoffe. 5. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chemie 38, S. 138.
- Ternetz, Ch., 1900. Protoplasmabewegung und Fruchtkörperbildung bei *Ascophanus carneus* Pers. Jahrb. f. Wiss. Bot. 35, S. 273—309.
- Zillig, H., 1921. Über spezialisierte Formen beim Antherenbrand, *Ustilago violacea* (Pers.). Fuck. Zentr.-Bl. f. Bakteriologie. II. Abt. 53, S. 33—74.

Rassen- und Bakteroidenbildung bei Hemipterensymbionten.

Von Paul Buchner, München.

Zu den interessantesten Erscheinungen des vielseitigen Symbiosegebietes gehören die Fälle, in denen zwei oder gar drei verschiedenartige pflanzliche Organismen gleichzeitig in den Zellen eines tierischen Wirtes leben. Zum Teil handelt es sich dann um ganz heterogene Symbionten, so etwa, wenn in einem Cölenteraten Zooxanthellen, also Cryptomonaden, und Leuchtbakterien zusammentreffen oder, wie bei vielen Homopteren, hefeartige Gebilde mit solchen, in denen wir, wie im folgenden dargetan werden soll, Bakteroiden bildenden Schizomyzeten sehen müssen. Daneben aber begegnen wir bei einer Reihe von Symbiontenträgern der Tatsache, daß in ihnen zwei oder drei einander systematisch sehr nahe stehende Symbionten gedeihen. Pierantoni beschreibt, wie in den Leuchtorganen bzw. akzessorischen Nidamentaldrüsen der Cephalopoden regelmäßig drei morphologisch und physiologisch sich unterscheidende, in gesonderten Bezirken lebende Bakterien zu finden sind, von denen nur ein einziges wirklich leuchtet, und gibt auch von *Lampyris* an, daß hier zweierlei Bakterientypen vorkommen. Ist es bei heterogenen Symbionten selbstverständlich, daß solche eben unabhängig voneinander zu verschiedenen Zeiten aufgenommen wurden, so liegt ähnliches natürlich auch in den letztgenannten Fällen nahe. Daß hier aber noch eine andere Erklärungsmöglichkeit in Frage kommt, lehren Erscheinungen bei Cicadarien und Psylliden, in denen ebenfalls teils sehr häufig (Cicadarien), teils stets (Psylliden) ein Symbiontenpaar gedeiht. Auf die hier vorliegenden, z. T. sehr komplizierten Verhältnisse sei zunächst etwas näher eingegangen¹⁾.

Die in Frage stehenden Symbionten, ich habe vorgeschlagen, sie im Gegensatz zu daneben nicht selten vorkommenden akzessorischen hefeartigen Formen als genuine zu bezeichnen, wohnen stets in eigenen

1) Die nachstehenden Überlegungen stellen einen weiteren Ausbau meiner in „Tier und Pflanze in intrazellulärer Symbiose“ (Berlin 1921) schon mitgeteilten Vorstellungen dar. zu dem mich seitdem gemachte Beobachtungen veranlassen.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Biologisches Zentralblatt](#)

Jahr/Year: 1922

Band/Volume: [42](#)

Autor(en)/Author(s): Bauch Robert

Artikel/Article: [Kopulationsbedingungen und sekundäre Geschlechtsmerkmale bei Ustilago violacea. 9-38](#)