LIBRARY
NEW YORK
BOTANICAL
GARDEN

Über
Ustilago Longissima und ihre Varietät Macrospora.

Von
R. Bauch.

Mit 6 Abbildungen im Text und Tafel III.

Die Entwicklungsgeschichte der Ustilagineen ist im Laufe der letzten Jahre, basierend auf den großzügigen Untersuchungen Brefelds, im allgemeinen hinreichend geklärt worden. Der Normaltypus, wie er sich durch Zusammenarbeit von rein morphologischer, zytologischer und physiologischer Forschung ergibt, und dem die Mehrzahl der Arten der Gattung Ustilago, sowie die Angehörigen der meisten anderen Gattungen der Untergruppe der Ustilaginaceen folgen, ist gegeben in der Ustilago violacea, dem bekannten Antherenbrand. Die Brandspore enthält einen diploiden Kern, der durch Verschmelzung zweier haploider Kerne bei der Sporenreife entstanden ist. Bei der Keimung bildet die Brandspore ein vierzelliges Promyzel, auf das die vier aus einer Reduktionsteilung des diploiden Kernes hervorgegangenen haploiden Kerne verteilt werden. Bei dieser Reduktionsteilung findet die Bestimmung über die Geschlechtstendenzen der einzelnen Kerne und damit über das Geschlecht der Promyzelzellen statt. Jede Promyzelzelle läßt dann hefeartige Sporidien aussprossen, die sich beliebig weiter vermehren. Unter günstigen Außenbedingungen kopulieren zwei Sporidien verschiedenen Geschlechtes miteinander, der Kern der einen wandert samt Plasma in die andere Sporidie über und damit tritt der Pilz in das diploide Paarkernstadium ein. In der Pflanze vermehrt sich das Paarkernstadium durch konjugierte Kernteilungen, erst bei der Reife der Brandsporen verschmelzen die beiden Kerne zum diploiden Kern der ausgereiften Brandspore und damit ist der Entwicklungszyklus geschlossen.

MAY 12 1923

Das Widerspiel von Promyzelbildung und Sporidienkopulation und damit von Reduktionsteilung und Herstellung der Paarkernphase läßt auch den Entwicklungsgang solcher Arten für geklärt erscheinen, die noch nicht spezieller untersucht sind und für die nur rein morphologische Beobachtungen vorliegen. Schwieriger wird die Einordnung unter den Gesichtspunkt des Kernphasenwechsels, wenn eines dieser beiden Stadien nicht bekannt ist. Für den Maisbrand und neuerdings für die Tilletiacee Doassansia sagittariae, von denen eine Sporidienkopulation unbekannt ist, hat Rawitscher nachgewiesen, daß das Paarkernstadium in den jungen Brandlagern der Wirtspflanze ähnlich wie bei den Aecidien der Uredineen durch Auflösung der Wände zwischen zwei Pilzzellen und darauffolgendem Kernübertritt hergestellt wird.

Noch ungeklärt dagegen erscheinen jene Fälle, bei denen ein typisches Promyzel nicht ausgebildet wird. Es sind das einige wenige Arten, die Brefeld von anderen Gesichtspunkten aus zum Teil in der Pro- und Hemiustilago-Gruppe zusammengestellt hat. Der typische Repräsentant dieser Gruppe ist die Ustilago longissima, ein häufiger Brandpilz auf den Blättern von Glyceria-Arten. Er bildet nach der klassischen Schilderung Brefelds bei der Keimung nicht das gewohnte Promyzel aus, sondern von der Spore werden in großer Zahl nacheinander einzellige Sporidien abgeschnürt. Jede Sporidie wächst zu einem anfangs vierzelligen, später mehrzelligen myzelialen Gebilde heran, das danach erst zu neuer Sporidiensprossung übergeht. Die Sporidien können miteinander kopulieren.

Bei diesem Pilz ist also der Eintritt des Paarkernstadiums mit der Kopulation klar gegeben, an jener Stelle des Entwicklungsganges aber, an der sonst das Promyzel ausgebildet wird, liegt eine Abweichung vor. Die Deutung dieses Falles lautet bei verschiedenen Forschern ganz verschieden. Lindau und Paravicini sprechen ein kleines Sterigma, von dem aus die Brandspore die Sporidien abschnürt, als reduziertes Promyzel an, während Schellenberg das Vierzellenstadium der Sporidien als Promyzel ansieht. Brefeld selbst spricht sich darüber nicht ganz klar aus, doch scheint er in seinen letzten Veröffentlichungen eher letzter Ansicht zuzuneigen. Weder der eine noch der

andere Versuch, diese abweichende Entwicklung der Ust. longissima mit dem Normaltyp in Einklang zu bringen, können befriedigen.

So ergaben sich für vorliegende Arbeit die Fragestellungen: Wie läßt sich die Entwicklungsgeschichte der Pro- und Hemiustilago-Arten in das übliche Schema des Kernphasenwechsels einreihen? Welches Entwicklungsstadium ist als Promyzel aufzufassen? An welcher Stelle des Lebenszyklus, bei der Keimung der Spore oder bei dem Auswachsen der Sporidien zu myzelialen, promyzelartigen Gebilden findet die Reduktionsteilung statt?

Eine Lösung dieser Fragen auf zytologischem Wege schien bei der Kleinheit der Objekte von vornherein recht aussichtslos, und spätere Untersuchungen zeigten auch, daß die Ust. longissima das denkbar ungünstigste Objekt ist, um durch den Nachweis von Stadien der Reduktionsteilung darüber zur Klarheit zu kommen. Aber auf Umwegen schien das Problem angreifbar. Der Satz, daß die Bestimmung der geschlechtlichen Tendenz von diözischen Haplonten bei der Reduktionsteilung erfolge, hat sich für die bisher untersuchten Objekte für zutreffend erwiesen und darf mit einigem Recht weitgehend verallgemeinert werden. Dort, wo wir eine Aufspaltung in geschlechtlich differente Haplonten vorfinden, muß eine Reduktionsteilung vorhergegangen sein. Auf unser Problem angewendet, besagt dies: Gelingt es, von der keimenden Brandspore weg die einzelnen Sporidien in ihrer Reihenfolge zu isolieren und auf ihr Geschlecht zu prüfen, so muß sich aus diesen Ergebnissen die Lösung der Frage nach dem Orte der Reduktionsteilung ergeben. Erweisen sich die einzelnen Sporidien als einschlechtlich, so muß die Reduktionsteilung ihrer Bildung vorausgegangen sein, sich also in der Brandspore abgespielt haben. Wären unter den Nachkommen der Sporidien alle beiden Geschlechter vertreten, so würde dies darauf hinweisen, daß die Reduktionsteilung bei der Bildung der promyzelartigen Stadien der Sporidien stattfindet.

Bisher konnte ich die Untersuchungen rein aus der Schwierigkeit heraus, die betreffenden Brandpilzarten (Ustilago longissima,

Ust. bromivora, Ust. Goeppertiana, Ust. grandis, Ust. olivacea, Ust. Vaillantii) in keimfähigem Zustande zu erhalten, nur an zwei Formen durchführen, der Ustilago longissima (Sow.) Tul. und einer ihr sehr nahestehenden, für Europa neuen Art, der Ust. longissima (Sow.) Tul. var. macrospora Davis. Den eigentlichen Versuchen sei einiges über die Entwicklungsgeschichte vorausgeschickt.

Ustilago longissima (Sow.) Tul.

Die Ust. longissima gehört zu den häufigeren Formen unserer Brandpilzflora. Sie bildet in dem zwischen den Adern gelegenen Parenchym der Blätter von Glyceria-Arten langgestreckte Brandlager aus, die durch Platzen der Epidermis frei werden und das olivenbraune bis braunschwarze Sporenpulver leicht verstäuben lassen. Als Wirtspflanzen werden in der Literatur und in den Herbarien genannt: Glyceria aquatica Wahlenberg, Gl. fluitans (L.) R. Br., Gl. plicata Fries, Gl. nemoralis Üchtritz und Körnicke, Gl. remota Fries. Sie ist bisher bekannt aus Europa, Nord- und Südamerika und Asien. In Australien und Afrika ist sie nicht gefunden worden. Die befallenen Pflanzen, besonders Gl. aquatica, kennzeichnen sich neben gesunden durch gelblichgrüne Färbung und rascheres Wachstum. Infizierte Pflanzen gelangen im allgemeinen nicht zur Blüte. Nur ein einziges Mal fand ich in einem größeren Bestande der Gl. aquatica ein blühendes, stark infiziertes Exemplar. Der Pilz greift also tiefgehend in den Chemismus der Pflanze ein. Die Größe der Sporen wechselt nach den Angaben der Literatur zwischen 4 bis 8 μ. Die Durchsicht eines größeren Herbarmaterials ergab als häufigste Werte 4 bis 5 μ. Standorte mit größeren Sporen sind außerordentlich selten. Für die amerikanischen Formen gibt Clinton an, daß sie im allgemeinen größere Sporen besäßen als die europäischen. Die Sporen sind kuglig bis leicht eiförmig mit meist glatter, selten leicht granulierter Membran. Neben den Sporen weisen manche Standorte doppelt bis dreifach so große, blasige Zellen auf, die von Plowright anscheinend zuerst als »pale-cells« bezeichnet wurden. Ihre Anzahl wechselt bei verschiedenen Standorten außerordentlich. Keimungen konnte ich an ihnen nie beobachten. Die frischen

Sporen keimen leicht in Wasser und Nährlösungen. Ihre Keimfähigkeit scheint je nach der Jahreszeit ihrer Bildung verschieden lang erhalten zu bleiben. Anfang Juli 1921 gesammeltes Material war bereits im November 1921 nicht mehr keimfähig. Material vom Mai bis Juni 1922 keimte im Oktober 1922 nicht mehr. Dagegen hielt sich im September bzw. Oktober 1921 gesammeltes Material über den Winter bis März, bzw. Mai 1922. Im Herbst gebildete Brandsporen behalten ihre Keimkraft also länger als im Frühjahr gebildete.

Die eigenen Beobachtungen der Keimung bestätigen das von Brefeld (Bd. 5, S. 104—116) gegebene, oben kurz skizzierte Bild vollständig. Brefeld macht es wahrscheinlich, daß von jeder Brandspore ungefähr 20—24 Sporidien gebildet werden. In seinen Tafeln findet sich die Keimung bis zur fünften Sporidie wiedergegeben. Mir gelang es, die Bildung der siebenten Sporidie direkt zu verfolgen. Jede einzelne Sporidie wächst in der Regel zu einem drei- bis vierzelligen, myzelartigen Gebilde, dem »Fruchtträger«, heran, ehe sie zu neuer Sporidienbildung übergeht. Diese Vierzellenstadien machen einen auffallend promyzelartigen Eindruck (s. Tafel Fig. 39). Die Zellen des Fruchtträgers vermehren sich rasch weiter und schließlich entstehen diese eigentümlich starren, leicht gekrümmten Bildungen, wie sie Brefeld auf Tafel 8 wiedergibt. In manchen, aber seltenen Fällen können die einzelligen Sporidien sich direkt durch Sprossung vermehren, ohne erst in das Fruchtträgerstadium eingetreten zu sein. Die Schilderung Brefelds und die eigenen Beobachtungen laufen dahin zusammen, daß jede Sporidie die Potenz hat, sich zu Fruchtträgern zu entwickeln. Äußere Bedingungen, die im einzelnen erst zu analysieren wären, entscheiden darüber, ob die Potenz realisiert wird oder nicht. Im ganzen habe ich Sporenmaterial von acht verschiedenen Standorten (Umgegend von Berlin, Ostseeküste bei Dievenow in Pommern, Umgegend von Freising) eingehend in seiner Keimung verfolgt und immer dieses gleiche Keimungsbild gefunden. Nur unter ganz extremen Bedingungen, in stark sauren 5—10proz. Zuckerlösungen traten einige Abnormitäten ausgesprochen pathologischer Natur auf. Abb. 2h zeigt eine Spore, die direkt mit einem Suchfaden, in den das gesamte Plasma eingetreten ist, keimt. Gelegentlich werden

auch noch einige Sporidien gebildet, aber die Entwicklung steht in den ungünstigen Nährmedien sehr bald still. Zu einer ganz eindeutigen Auffassung dieser Bilder bin ich nicht gekommen. Aufschluß hätte vielleicht die zytologische Untersuchung geben können, aber leider kamen diese Stadien in gefärbten Präparaten nie zu Gesicht.

Kopulationen treten in Bierwürzetröpfchenkulturen nach 3 bis 4 Tagen auf. Der Vorgang der Kopulation selbst ließ sich mehrfach direkt verfolgen und mit Sicherheit feststellen, daß jeder der Partner aktiv daran beteiligt ist. Jeder bildet, wohl auf chemotropische Reizung hin, einen kleinen end- oder seitenständigen Fortsatz, der nach der Berührung mit dem des anderen verschmilzt. Abb. 2 g entstammt Kopulationsversuchen im hängenden Tröpfchen mit destilliertem Wasser als Medium. 10 Minuten nach Anfertigung der Zeichnung war die Verschmelzung bereits eingetreten. Die morphologische Isogamie liegt hier also in reinster Form vor. Meist treibt auf der Kopulationsbrücke ein kleiner Höcker zu einem Faden aus, in den das Plasma beider Sporidien eintritt. Es sammelt sich in der Fadenspitze an und schiebt sich gewissermaßen durch das Wachstum des Fadenstieles unter Abkammerung von Querwänden vorwärts und kann dadurch weit aus dem Nährbodentröpfchen hinauswandern. Während das Plasma haploider Sporidien je nach seinem Alters- und Ernährungszustande mehr oder minder stark mit Vakuolen durchsetzt ist, erscheint das Plasma dieser paarkernigen »Suchfäden«, denen vermutlich die Rolle der Infektion zufällt, vollkommen homogen und auffallend stark lichtbrechend. In Kopulationsgemischen heben sich die Suchfadenspitzen dadurch scharf von den Sporidien ab und erleichtern die Prüfung von Einsporidienkulturen auf ihr Geschlecht außerordentlich. Sie sind ein Anzeichen, daß eine Kopulation stattgefunden hat, von der man sich durch Verfolgen der Reihen der entleerten Fadenzellen bis zu den leeren Membranen der noch durch die Brücke verbundenen Sporidien hin überzeugen kann. In Bierwürze keimen allerdings auch einzelne Sporidien gelegentlich zu Suchfäden aus, die dann natürlich haploider Natur sind. Unter den für das praktische Arbeiten gewählten Bedingungen tritt dies jedoch nur äußerst selten ein. Unter meinen Protokollen von

mehreren tausend Kombinationen von Einsporidienkulturen finden sich nur drei Fälle, in denen derartige haploide Suchfäden zu konstatieren waren. Das Austreiben der Suchfäden kann entweder in der Mitte der Kopulationsbrücke oder am Ende einer Sporidie erfolgen, wobei dann natürlich das Plasma der einen Sporidie durch die andere hindurchwandern muß. Welche Faktoren darüber im einzelnen Falle entscheiden, läßt sich schwer beurteilen. Bilder »unentschlossener« Suchfäden wie Abb. 21 jedoch, bei denen zuerst ein kurzer Faden von der Brücke aus getrieben wird, dann aber ein neugebildeter endständiger Faden das ganze Plasma aufnimmt, weisen darauf hin, daß hier recht komplizierte Verhältnisse vorliegen. Neben diesem Kopulationstypus, der durch die Suchfäden charakterisiert ist, findet sich in Kombinationsversuchen mitunter ein anderer Modus, die »Wirrkopulationen«, bei dem von den Sporidien eine Anzahl wellig gebogener Fäden ausgehen, die sich mit denen benachbarter Sporidien zu einem schwer entwirrbaren Geflecht verbinden. Die Verflechtung kann so weitgehend sein, daß die gesamte Sporidienmasse ein festes Häutchen bildet. Die Bilder entsprechen ganz denen, wie sie Brefeld in bescheidenem Ausmaße für Ust. grandis (Heft 5, Tafel IX, Fig. 25—26) wiedergibt. Sie treten unter ganz den gleichen Bedingungen auf wie die anderen, zuweilen sogar findet sich auf einem Objektträger, auf dem zwei Kopulationsversuche nebeneinander angelegt sind, in dem einen dieser, in dem anderen jener Modus. Sie stehen auch in keiner Beziehung etwa zu bestimmten Stämmen.

Die Bedingungen zur Kopulation entsprechen ganz denen, wie sie für die Ust. violacea (Bauch 1921) geschildert wurden. Parallel angestellte Versuche verliefen ganz gleichsinnig. Auch hier wieder ist die Grundbedingung der Zutritt von Luftsauerstoff. Daneben spielt die Reaktion des Mediums eine erhebliche Rolle. Die Prüfungen von Einsporidienkulturen auf ihren Geschlechtscharakter wurden am einfachsten auf Objektträgern in großen, mit angefeuchtetem Filtrierpapier ausgelegten Doppelschalen ausgeführt. Als Medium bewährte sich frisch destilliertes Wasser, dem durch Zusatz von $\frac{n}{1}$ NaOH (1 Tropfen auf

20 ccm) eine H-Ionenkonzentration von $p^h = 7{,}0 - 7{,}4$ gegeben wurde.

Das weitere Schicksal der paarkernigen Suchfäden bietet noch einige Besonderheiten. Mitunter kommen nämlich die Suchfäden zu erneuter Sporidienbildung oder der Inhalt der Spitze teilt sich in zwei oder mehrere Portionen, die in den mittleren Teilen des Fadens zurückbleiben, während die Spitze normal unter Abkammerung von Querwänden weiter wächst. Auch derartige »Nachzüglerzellen« können zur Sporidienbildung übergehen. Gelegentlich werden die Sporidien direkt in die Luft abgeschnürt. Nur selten allerdings glückt es, sprossende Suchfäden auf ihre kopulierten Sporidien zurückzuverfolgen und damit ihre diploide Natur sicherzustellen. Für die Longissima gelang dies nur in einem Falle, häufiger aber bei der Macrospora, bei der die Verhältnisse ganz ähnlich liegen. Man sollte nun erwarten, daß die neugebildeten Sporidien sich im Paarkernstadium befänden. Viel Mühe wurde darauf verwendet, derartige Paarkernsporidien zu isolieren, um die Physiologie des Paarkernstadiums zu studieren und damit Einblick in den Stoffaustausch, wie er sich in der Pflanze zwischen Parasit und Wirt abspielt, zu gewinnen. Die Eigentümlichkeit der Suchfäden, aus dem Nährmedium herauszuwachsen, bot dafür eine Handhabe. Setzt man z. B. auf einem Deckgläschen um einen Tropfen kopulierender Sporidien im Kreise sterile Würzetröpfchen, so wachsen die Suchfäden bald in die Würzetröpfchen hinein und bilden hier reichlich Sporidien, die leicht abgeimpft werden können. Aber stets traten in derartigen Kulturen wieder Kopulationen auf. Das hätte man von Paarkernsporidien nicht erwarten dürfen. Das gleiche Resultat lieferte eine andere Beobachtung. Sät man z. B. Brandsporen auf Würzeagarplatten aus, so bilden sich um die Sporen anfänglich runde, weißlich-gelbliche Kolonien, die aus Sporidien und Fruchtträgern bestehen. Bald aber strahlen von diesem Zentrum normale und sporidienbildende Suchfäden in reicher Fülle aus, die die Kolonien mit einem Kranz dichten Geflechtes umgeben. Die Suchfäden verfilzen sich miteinander und die Kolonie ist dann nur äußerst schwierig zu zerteilen oder Stückchen davon abzuimpfen. Impft man sorgfältig von dem äußersten Rande

des Flechtwerkes, das also nur die auswachsenden Suchfäden und die von ihnen gebildeten Sporidien enthält, so treten auch in diesen Kulturen Kopulationen auf. Bei Einsporidienkolonien dagegen fehlen die Suchfädenkränze völlig. Man erhält sie aber, wenn man Mischtröpfchen von Sporidien verschiedenen Geschlechtes auf Würzeagar bringt. Diese Unterschiede ermöglichen es, auf makroskopischem Wege Geschlechtsprüfungen vorzunehmen. Die Erklärung dieser Befunde kann nur darin gesehen werden, daß der fein abgestimmte Mechanismus der konjugierten Kernteilungen hier nicht vor sich gegangen ist, sondern daß unter den Bedingungen der Kultur das Paarkernstadium stets wieder in die Haplophase aufspaltet. Es sei hier gleich vorausgenommen, daß sich bei der zytologischen Untersuchung der Macrospora Bilder finden ließen, die diese Aufspaltung demonstrieren.

Die Kulturen der Longissima auf Nährböden bieten nichts besonderes. Die üppigen, schleimigen, teilweis gefälteten Beläge nehmen in manchen Fällen mit der Zeit eine intensive Braun- bis Schwarzfärbung an, die auf der Einlagerung eines braunen Farbstoffes in die Sporidien beruht. Vielfach verdicken die Sporidien auch ihre Zellmembranen und erhalten damit gemmenartigen Charakter. In frische Nährlösung übertragen wachsen sie normal zu Sporidien und Fruchtträgern heran. Sporenbildungen oder auch nur Andeutungen davon kamen in Kulturen nie zu Gesicht.

Eine Grundvoraussetzung zur Lösung der Fragestellung war das Vorliegen von physiologischer Geschlechtsdifferenzierung. Diese ließ sich durch Kombination von Einsporidienkulturen ohne Schwierigkeiten nachweisen. Doch überraschte die Longissima noch durch eine besondere Komplizierung. Es ließen sich nämlich nicht nur zwei, sondern drei Geschlechtsformen gewinnen, die nach dem Schema der Tabelle 1 miteinander kopulieren. Jeder Stamm reagiert mit zwei dieser Geschlechter. Diese Beobachtung läßt vermuten, daß ähnliche Abweichungen von der normalen Heterothallie, wie sie Kniep (1919 und 1922) für die Hymenomyceten geschildert hat, häufiger vorkommen, als bisher angenommen wurde. Auf die theoretische Bedeutung dieses Falles für das Geschlechtsproblem soll hier nicht einge-

gangen werden. Erwähnt sei noch, daß das Auftreten der Geschlechtsformen bei verschiedenen Standorten wechselt. Es kommen Standorte vor, die alle drei Geschlechter enthalten, daneben aber andere, bei denen nur zwei davon auftreten.

Tabelle 1. Kopulationsschema der Ust. longissima.

	A	B	C
A	—	+	+
B	+	—	+
C	+	+	—

Ustilago Longissima (Sow.) Tul. Var. Macrospora.

Dieser Brandpilz wurde von J. J. Davis auf Glyceria fluitans R. Br. in Racine, Wisconsin gefunden und im Jahre 1897 kurz beschrieben: »Differs from the type in its larger spores, 6—11, mostly 8—9 microns in diameter.« Clinton führt ihn in seiner Brandpilzmonographie von Gl. fluitans R. Br. und Gl. laxa Scribn aus den Staaten Illinois, Maine und Wisconsin an: »Spores similar, somewhat more irregular and angled, apparently smooth, but under an immersion minutely granular, 7—12 μ in length.« In Exsikkatenwerken wurde er ausgegeben von Ellis und Everhart, North American Fungi No. 3225, A. B. Seymour and F. S. Earle, Economic Fungi No. 540 und Supplement C No. 75; Sydow, Ustilagineen No. 253. Angaben über seine Keimung finden sich in der Literatur nicht. Mein Material verdanke ich dem Sammeleifer von Herrn Dr. H. Zillig-Trier, dem auch an dieser Stelle herzlichster Dank gesagt sei. Dem Habitus nach entsprach es vollkommen der Longissima und fiel nur durch die fast schwarze Farbe des Sporenpulvers, die bei der Longissima nur sehr selten zu finden ist, auf. Dagegen unterschied es sich von ihr sofort durch die ungefähr doppelte Sporengröße. Der Vergleich mit dem Originalmaterial der Berliner, Berner, Münchener und Wiener Sammlungen, für dessen liebenswürdige Überlassung ich den Herren Prof. Diels, Prof. E. Fischer, Dr. v. Schoenau, Prof. Zahlbruckner zu Danke verpflichtet bin, ermöglichte die sichere Bestimmung. Die Durchsicht des unter Ust. longissima geführten Materials dieser Sammlungen ergab, daß die Macrospora häufiger vor-

kommt, nur bisher nicht als solche erkannt wurde. Ich kenne sie jetzt von folgenden europäischen Standorten: Grünhaus bei Trier (H. Zillig) auf Gl. plicata Fries; Mariensprung bei Cladow (Sydow. Mycotheca Marchica Nr. 2118) auf Gl. plicata Fries; Nossen in Sachsen (Krieger. Fungi Saxonici Nr. 153) auf Gl. fluitans R. Br. in einigen Exemplaren neben typischer Longissima im Münchener Herbar. Außerdem hat sie Spegazzini in Dec. Myc. Argentiniae Nr. 5 ebenfalls unter der Bezeichnung Ust. Longissima von Pampa del Tuju auf Gl. fluitans R. Br. ausgegeben. In ihrer Verbreitung scheint sie also der Longissima zu folgen. Das Auftreten einer großsporigen Varietät steht unter den Brandpilzen nicht vereinzelt da. Sie sind außerdem bekannt von Ust. bromivora (Tul.) F. v. W. mit var. macrospora Farl, Ust. violacea (Pers.) Fuck. mit var. major Clint und Ust. Vaillantii Tul. mit var. Tourneuxii F. v. W. Möglicherweise stehen Cintractia axicola (Berk.) Cornu zu ihrer var. minor Clint und Ust. hordeicola Speg. zu Ust. hordei (Pers.) K. et Sw. in einem ähnlichen Verhältnis.

Die Keimung der Macrospora ist gekennzeichnet durch drei Besonderheiten. In ihrer wiederholten Sporidienbildung von der Brandspore aus ordnet sie sich dem Longissima-Keimungstypus unter. Mit einer Hervorhebung der ersten Sporidie gegen alle übrigen durch eine besondere Formgestaltung bietet sie ein neues Element innerhalb der Ustilaginaceen. In ihrer leichten Reaktionsfähigkeit auf Außenbedingungen bahnt sie ein vergleichend-morphologisches Verständnis auch der Longissimakeimung an. In Würzetröpfchen bildet sie genau wie die Longissima einen kleinen Keimfortsatz, der zu einer Sporidie aussproßt (Abb. 1a u. b). Die Zahl der von dem Keimfortsatz abgeschnürten Sporidien scheint ebenso groß zu sein wie bei der Longissima. Bis zur Bildung der sechsten Sporidie ließ sich die Entwicklung direkt verfolgen. Zur Zeit der Abschnürung lassen sich an der ersten Sporidie keinerlei Zellwände bemerken (Abb. 1c). Sehr bald danach aber wird in ihr eine Querwand ausgebildet, und die nun zweizellige Primärsporidie geht an ihren Enden zur Sporidiensprossung über (Abb. 1d). In anderen Fällen aber können sich die beiden Zellen durch eine seitliche Brücke miteinander verbinden und so kopulieren, und wachsen

dann zu einem Suchfaden ganz wie die Longissima aus (Abb. 1 f—h). Hier müssen also die Zellen der Primärsporidie geschlechtlich verschieden differenziert sein, und es liegt nahe, hier an eine Einwanderung von zwei Kernen in die Primärsporidie zu denken. Die Folgesporidien, die sich z. T. auch zu mehreren gleichzeitig an dem Keimfortsatz ausbilden können, bleiben alle einzellig. Unter den Abkömmlingen einer Brandspore läßt sich, solange das Bild noch einigermaßen übersichtlich ist, die Primärsporidie

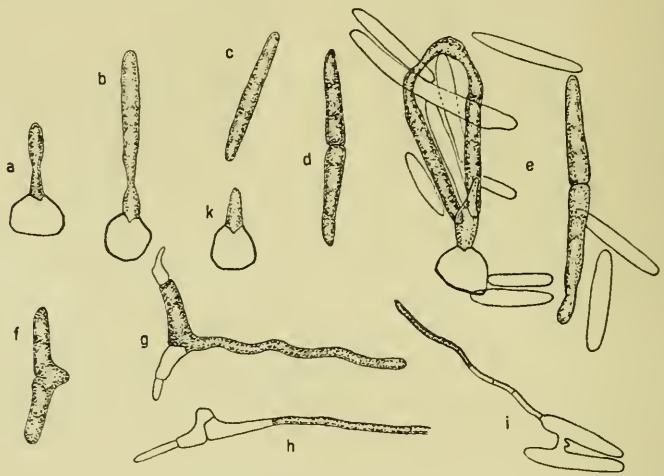


Abb. 1. Ust. longissima var. macrospora. a—c = Bildung der Primärsporidie, d = zweizellige Primärsporidie, e = späteres Bild der Keimung mit zweizelliger Primärsporidie, einzelligen Folgesporidien und Kopulation zwischen zwei Folgesporidien, f—h = Primärsporidien in Hufeisenkopulation und Austreiben des Suchfadens, i = kopulierende Folgesporidien.

durch ihre Zweizelligkeit von den Folgesporidien unschwer unterscheiden (Abb. 1 e). Ein Fruchtträgerstadium wie bei der Longissima wird nicht durchlaufen. Jede Sporidie sproßt stets hefeartig zur Tochtersporidie aus. Diese Keimungsart tritt aber nur unter günstigen Außenbedingungen auf. In Wasser oder in unzureichenden Nährlösungen, wie reinen Kohlehydraten, folgt die Macrospora häufig dem Violacea-Typus. Sie bildet dann ganz normale vierzellige Promyzelien, die entweder seitlich an kleinen Sterigmen Sporidien abschnüren oder die durch seitliche Brücken zu zweien kopulieren und zu Suchfäden auskeimen.

Stets kopulieren dann Zelle 1 mit 2 und 3 mit 4, nie 2 mit 3 oder 1 mit 4. So bildet die Macrospora ein Übergangsglied zwischen den beiden Keimungstypen. Das Verständnis erleichtern besonders solche Fälle, wo Zelle 1 und 2 von 3 und 4 getrennt werden, wie sie gelegentlich vorkommen.

Diesem allgemeinen Bild seien noch einige Einzelheiten angefügt. Die Kopulation verläuft ebenso wie bei der Longissima völlig isogam. Jeder Gamet ist aktiv daran beteiligt. Dies trifft sowohl für Folgesporidien wie auch Primärsporidien zu. Besonders instruktive Bilder lassen sich an diesen durch Wechsel der Außenbedingungen erzielen. So gelang es, durch abwechselndes Einstellen in kalten und warmen Raum Bilder wie Abb. 2c—e zu erhalten. Die ursprünglich kopulationslustigen Zellen haben beide Brückenschläuche getrieben, die aber nicht zur Verschmelzung gekommen sind (Abb. 2c). In Abb. 2e sind die Brückenschläuche zu normaler Sporidienproduktion übergegangen. In Abb. 2d kopuliert die eine Zelle einer Primärsporidie, die sich zur Kopulation mit der anderen angeschickt hatte, schließlich mit einer daneben liegenden Folgesporidie. Bei dem Auswachsen der Suchfäden kammert die protoplasmatische Fadenspitze Quer-

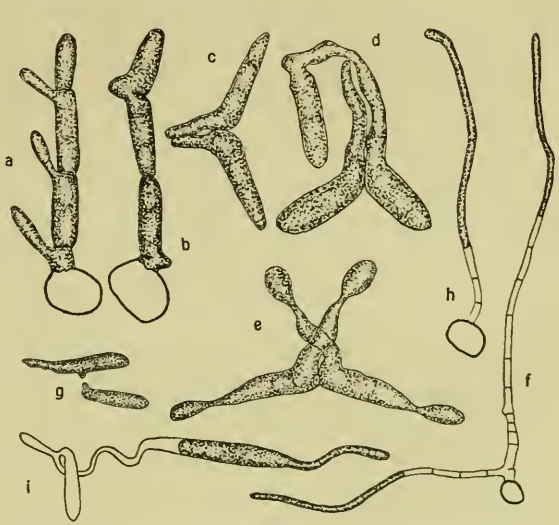


Abb. 2. Ust. longissima var. macrospora. a = Keimung nach dem Violacea-Typus, b = Kopulation der Promycelzellen, c = verzögerte Kopulation von Primärsporidienzellen, d = desgl. Kopulation mit fremder Sporidie, e = Sporidensprossung nach Unterdrückung der Kopulation, f = Suchfäden nach Kopulation von Promycelzellen.
Ust. longissima. g = kopulierende Sporidien, h = abnorme Keimung, i = »unentschlossener« Suchfaden.

wände hinter sich ab. Häufig wird auch am Übergang von Sporidie zum Suchfaden in einer Zelle eine seitliche Wand gebildet, die der leeren Hufeisenbrücke eine auffallende, aber nur äußerliche Ähnlichkeit mit einer Hymenomyzetenschnalle verleiht. Sporidienabschnürung vom Suchfaden kommt hier gleichfalls vor. Hierfür gilt ganz das für die Longissima ausgeführte. In den Kopulationsbedingungen, in der Form und Farbe der Kolonien, in dem Auftreten der Suchfädenkränze um Brandsporenkolonien oder Kolonien, die auf kopulierende Sporidien zurückgehen, gleicht sie der Longissima.

Die geschlechtliche Differenzierung der Macrospora folgt dem normalen Schema der Heterothallie. Die 127 auf ihr Geschlecht geprüften Einsporidienkulturen lassen sich ohne Ausnahmen in zwei Geschlechtsformen trennen, und zwar in einem Verhältnis von 59 A zu 68 B. Sie lassen sich leicht mit den entsprechenden Geschlechtern der Longissima zur Kopulation bringen, und zwar gleichsinnig mit dem Dreierschema der Longissima. Macrospora A kopuliert also mit Longissima B und C, Macrospora B mit Longissima A und C und umgekehrt. Diese Möglichkeit der Bastardierung weist auf die nahe Verwandtschaft der Macrospora zur Longissima hin und läßt es ratsam erscheinen, von einer Trennung der beiden Formen, die auf Grund der Größendifferenz der Sporen und des wesentlich verschiedenen Keimungsverlaufes wohl berechtigt erschien, vorläufig Abstand zu nehmen.

Methodik der Abfischversuche.

Die Lösung der anfangs aufgerollten Fragestellung stand und fiel mit der Möglichkeit, die einzelnen von den Brandsporen abgeschnürten Sporidien in ihrer Reihenfolge zu isolieren. Einiges Herumprobieren führte schließlich zu einer Methodik, die nach der nötigen Übung gute Resultate ergab und vor allem — es handelt sich bei den Brandsporen und jungen Sporidien der Longissima um Gebilde von 4 μ bzw. 9 μ Größe — eine genaueste Kontrolle über Gelingen oder Mißglücken jedes Versuches und damit Ausschaltung von Fehlversuchen gestattete. An besonderen Instrumenten für diese Fischzüge werden benötigt ein »Platinstecher«, »Winkelpipetten« und feinst ausgezogene Glasröhrchen und Glasstäbchen. Der Platinstecher besteht aus einem Platinhohlzylinder von 2,5 mm lichter Weite, wie ihn auch Kniep (1922) verwendet, der aber an einer Objektivfassung montiert ist. Er läßt sich leicht herstellen durch Aufkitten des Zylinders mittels einer Mischung von Wasserglas und Schlemmkreide auf eine Objektivtrichterblende, wie sie zur Abblendung seitlichen Lichtes bei der Dunkelfeldbeleuchtung benutzt wird (s. Leitz-Katalog). Der Stecher wird in den Mikroskoprevolver eingeschraubt und gestattet

ein sicheres Umstechen zentral eingestellter Objekte. Die Winkelpipette ist ein fein ausgezogenes Glasrohr, dessen verengter Teil gegen das Rohr um einen Winkel von ca. 45 Grad abgebogen ist. Der kapillare Teil erhält in einer Entfernung von 2—3 mm von der Öffnung ebenfalls eine leichte Abbiegung, so daß aus der Kapillaröffnung austretende Wassertröpfchen sich an dem Winkelknie ansammeln und von hier durch eine leichte Berührung auf das »Operationsfeld« übertragen werden können, ohne daß durch Kapillarwirkung der Tropfen wieder zurückgesaugt würde. Ein in das Glasrohr eingeschobener Wattebausch verhindert das Eindringen von Mundkeimen beim Ausblasen der Pipette. Glasröhrchen und Glasstäbchen werden in größerer Menge und verschiedener Stärke hergestellt und sterilisiert in Petrischalen vorrätig gehalten. Die Versuche gestalten sich dann folgendermaßen:

1. Verteilen einer dünnen Brandsporenaufschwemmung mit Glasspatel auf Würzeagarplatten. Das günstigste Stadium für die Versuche an der Longissima ist das Zwei- bis Dreisporidienstadium. Die erste Sporidie ist dann bereits zu einem kleinen Fruchtträger herangewachsen, die zweite hat sich stark gestreckt, die dritte ist soeben abgeschnürt. Die Reihenfolge ihrer Entwicklung läßt sich so leicht ablesen.

2. Einstellen isoliert liegender gekeimter Sporen bei schwacher Vergrößerung (Zeiß A, Okular 2) in die Mitte des Gesichtsfeldes, Umstechen mit dem Platinstecher durch Senken des Mikroskoptubus.

3. Abpräparieren der Agarmasse um den ausgestochenen Agarkreis mit Lanzettnadel. Die Spore liegt dann auf der Oberfläche eines isolierten Agarzylinders, dem »Operationsfeld«.

4. Kontrolle des Operationsfeldes bei mittlerer Vergrößerung (Zeiß D, Komp.-Okular 6) auf etwaige Fremdsporen oder Fremdsporidien. Skizzieren des Keimungsbildes, um spätere Irrtümer bei der Bezeichnung der Reihenfolge der Sporidien zu vermeiden.

5. Übertragen eines Wassertröpfchens mit der Winkelpipette auf das Feld und Abpräparieren der ersten Sporidie von der Agaroberfläche bei schwacher Vergrößerung mit Glasstäbchen. Die Sporidie muß frei in der Flüssigkeit schwimmen.

6. Abfischen der Sporidie durch Einsaugen in Kapillarröhrchen. Kontrolle, daß Spore und andere Sporidien nicht mit fortgerissen!

7. Ausblasen der Kapillare auf Deckgläschen, das über hohlgeschliffenem Objektträger zu feuchter Kammer verarbeitet wird.

8. Kontrolle des Deckglaströpfchens auf Vorhandensein der gewünschten Sporidie bzw. Fehlen von Fremdsporidien.

In gleicher Weise werden die weiteren Sporidien und schließlich die Brandspore abgefischt und isoliert. Über jede Brandspore wird genauestes Protokoll geführt. Nach einigen Tagen werden die inzwischen herangewachsenen Kolonien vom Deckgläschen mit keilförmig zugeschnittenen Filtrierpapierstückchen abgesaugt und in Schrägagarröhrchen, die mit einigen Tropfen Würze beschickt sind, überimpft. Von dort aus werden die Kulturen durch Kombination mit Teststämmen auf ihr Geschlecht geprüft. Sporidien, die nicht eingeschlechtig sind, lassen dies bereits in den Deckglaskulturen durch Auftreten von Kopulationen und Suchfäden erkennen. Es ist selbstverständlich, daß alle Manipulationen unter Einhaltung möglichster Asepsis (Sterilisierung aller benötigten Instrumente, Desinfektion des Mikroskoptisches und der Objektive durch vorsichtiges Abreiben mit Alkohol, Desinfektion des Arbeits-

platzes und der Hände) ausgeführt werden. Natürlich können nicht in jedem Versuch lückenlose Serien von erster Sporidie bis zur Brandspore gewonnen werden. Die Aussichten des Gelingens sind beinahe ebenso groß wie die des Mißlingens. Die gelungenen Versuche aber dürfen auf Grund der vielfachen Kontrollen als beweisend angesehen werden. In den Anfangsstadien der Versuche wurden die Kapillaren nicht auf Deckgläschen, sondern auf Agarplatten ausgeblasen und die dort entstandenen Kolonien auf Agarröhrchen überimpft. Hier fiel natürlich die Mikroskopkontrolle der abgefischten Sporidien fort. Als die Resultate dann aber ganz unerwartet ausfielen, wurde die Verfeinerung des Deckgläschenverfahrens dafür eingeführt. Die damit gewonnenen Resultate stimmten aber ganz mit den ersten überein, so daß auch diese berücksichtigt werden konnten.

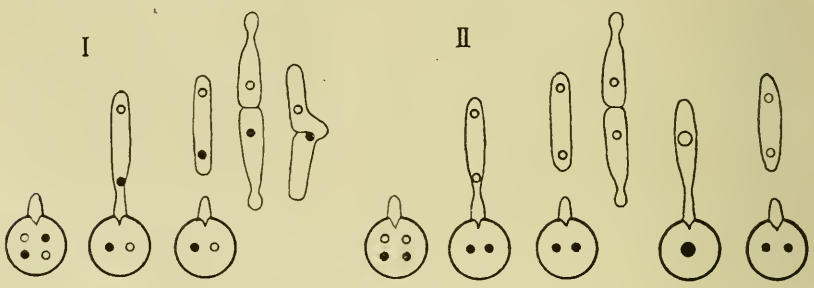


Abb. 3.

Primärsporidie: A + B
Brandspore: A + B

Primärsporidie: A
Brandspore: B

Abfischversuche an der Macrospora.

Die an der Macrospora gewonnenen Ergebnisse bieten das durchsichtigste Bild und seien deshalb zuerst behandelt. Die Ausdeutung, die sich aus dem Überblick der Gesamtresultate ergibt, ist für jeden einzelnen Fall gleich durchgeführt In einer Reihe von Versuchen beschränkte ich mich darauf, die Primärsporidie isoliert von der Brandspore zu züchten. Sie lassen sich in zwei Gruppen einteilen.

Fall I: Sowohl in der Nachkommenschaft der Primärsporidie, wie der Brandspore treten in den Deckglaskulturen Kopulationen auf. Primärsporidie wie Spore müssen also beide Geschlechter enthalten haben. Dabei zeigte es sich, daß auch in Primärsporidien, die sich durch Sprossung vermehrt hatten und nicht durch seitliche Brücken kopulierten, beide Geschlechtstendenzen vorhanden waren. Hier haben also ungünstige Außenbedingungen die Kopulation verhindert. Die Deutung dieses Falles gibt Abb. 3

wieder. Bei der Keimung entstehen aus dem diploiden Brandsporenkern durch die Reduktionsteilung vier Kerne, je zwei von dem einen (weißen) und zwei von dem anderen (schwarzen) Geschlechtscharakter. In die Primärsporidie wandern zwei Kerne ein, ein »weißer« und ein »schwarzer« — sit venia verbo! — in der Brandspore bleiben ebenfalls ein »schwarzer« und ein »weißer« Kern zurück. Es ist klar, daß unter günstigen Bedingungen dann in der Nachkommenschaft von Spore und Sporidie Kopulationen auftreten müssen. Für diesen Fall liegen die Ergebnisse von 20 Versuchen vor.

Fall II: Weder in der Nachkommenschaft der Brandspore noch der Primärsporidie finden sich Kopulationen. Beide ent-

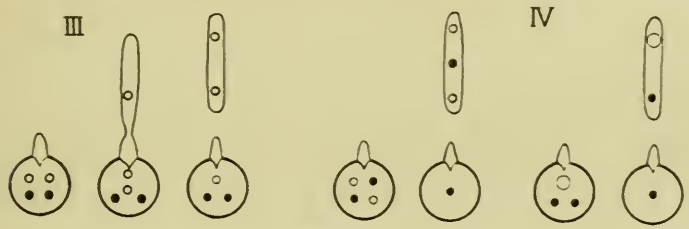


Abb. 4.

Primärsporidie: A oder B
Brandspore: A + B

Primärsporidie: A + B
Brandspore: A oder B

halten nur ein Geschlecht. Bei der Kombination mit Teststämmen erwies sich das Geschlecht der Sporidie als entgegengesetzt dem der Spore. In den drei derartigen Ergebnissen war die Sporidie immer als A, die Spore als B zu bezeichnen. Die Deutung (Abb. 3) wird dahin lauten müssen, daß von den vier Kernen der Reduktionsteilung die beiden »weißen« z. B. in die Sporidie hinauswandern. die beiden »schwarzen« in der Spore zurückbleiben. Der gleiche Effekt würde auch dadurch erzielt. daß einer der beiden aus dem ersten Teilungsschritt der Reduktion heraustretenden Kerne in die Sporidie wanderte, der andere in der Spore bliebe, und danach erst bei beiden die zweite Teilung durchgeführt würde.

Fall III: Hier liegen die Verhältnisse komplizierter. Die Primärsporidie ist eingeschlechtlich, je einmal A und B. Die Brandspore enthält alle beiden Geschlechter. Wenn wir die

Auswanderung von zwei Kernen in die Primärsporidie als etwas Gesetzmäßiges ansprechen dürfen — und dazu besteht bei der steten Zweizelligkeit der Primärsporidie aller Grund — so bleibt nur die Deutung übrig, daß sich die beiden auswandernden »weißen« Kerne vor der Wanderung in der Brandspore durch Teilung vermehrt haben (Abb. 4).

Fall IV: Hier sind die Geschlechter gerade entgegengesetzt verteilt. Die Sporidie enthält beide Geschlechter, also A + B, die Brandspore nur eines, und zwar in zwei Versuchen das A-Geschlecht, in zwei das B-Geschlecht. Für die Erklärung dieses Ergebnisses kommen drei Möglichkeiten in Betracht. Einmal könnten in die Sporidie drei Kerne hineinwandern (Abb. 4). Sie würde dann zwei »weiße« und einen »schwarzen« Kern enthalten, während in der Spore der andere »schwarze« Kern zurückbleibt. Die zweite Möglichkeit wäre in einem verschieden schnellen Ablauf der Reduktionsteilung zu sehen. Einer der beiden aus dem ersten Teilungsschritt hervorgehenden Kerne würde in die Sporidie wandern, bevor er seine zweite homöotypische Teilung erledigt hat und sie in der Sporidie ausführen, während der andere sie normal in der Brandspore durchführt. Einen Tochterkern würde dieser an die Sporidie abgeben, der andere würde in der Spore bleiben. Schließlich wäre noch an ein Zugrundegehen eines der vier aus der Reduktion hervorgehenden Kerne zu denken. Eine rein theoretische Entscheidung darüber, welche dieser Möglichkeiten die meiste Wahrscheinlichkeit für sich hat, fällt schwer. Auf Grund der zytologischen Befunde, auf die später eingegangen werden soll, möchte ich mich dahin entscheiden, daß die beiden ersten Fälle nebeneinander vorkommen, der letzte dagegen auszuscheiden ist.

Das Abfischen weiterer Sporidien als der ersten ist bei der Macrospora dadurch erschwert, daß an dem Keimfortsatz der Spore die Folgesporidien meist zu zweit oder zu mehreren zugleich ausgebildet werden. Eine Entscheidung über ihre Reihenfolge wird dadurch unmöglich. Nur in wenigen Versuchen lagen die Verhältnisse so klar, daß die zweite Sporidie noch mit Sicherheit isoliert werden konnte.

Fall V: Er ist dadurch gekennzeichnet, daß die Primärsporidie zweigeschlechtlich (A + B) ist, die zweite Sporidie und

die Spore eingeschlechtlich sind, und zwar enthält die Sporidie in beiden Versuchen das B-Geschlecht, die Spore das A-Geschlecht. In der Auslegung schließt sich dieses Ergebnis eng an die von Fall I an (Abb. 5). Nach dem Abschnüren der Primärsporidie sind in der Brandspore noch je ein »weißer« und ein »schwarzer« Kern vorhanden. Der eine davon wandert in die zweite Sporidie und der andere bleibt in der Spore zurück. Von diesem stammen die sämtlichen weiteren Sporidien der Brandspore ab.

Fall VI: Hier enthält die Primärsporidie beide Geschlechter (A + B), die zweite Sporidie ist eingeschlechtlich (B), in der Brandspore bleiben aber beide Geschlechter (A + B) zurück.

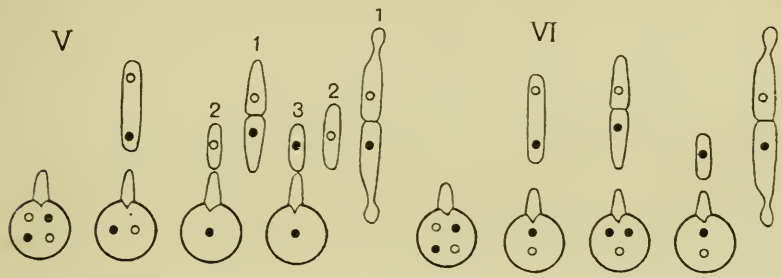


Abb. 5.

Primärsporidie: A + B
Zweite Sporidie: B
Brandspore: A

Primärsporidie: A + B
Zweite Sporidie: B
Brandspore: A + B

Für diesen Fall liegen ebenfalls zwei Versuche vor. Die Deutung wird hier das Prinzip von Fall III, die Kernvermehrung, heranziehen müssen (Abb. 5). Nach Abschnürung der Primärsporidie hätte sich ein »schwarzer« Kern in der Brandspore geteilt. Einer seiner Tochterkerne würde in die zweite Sporidie übertreten und in der Spore bliebe dann ein »schwarzer« und ein »weißer« Kern zurück.

Die Erklärung der Versuchsergebnisse stützt sich in erster Linie auf die Voraussetzung, daß die Aufspaltung der geschlechtsbestimmenden Faktoren bei der Reduktionsteilung vor sich gehe. Es ist hier nicht der Ort, das ganze Beweismaterial, das experimentelle und deskriptive biologische Forschung dafür beigebracht haben, anzuführen. Sie dürfte zur Zeit wohl unbestritten sein. Eine einheitliche Erklärung der komplizierten Verhältnisse bei

unserem Organismus scheint mir nur mit ihrer Hilfe möglich. Schwieriger dagegen ist die Entscheidung, welcher Schritt der Reduktionsteilung im speziellen die Verteilung der Geschlechtsfaktoren bewirkt, ob die Reduktion einem hetero-homöotypischen oder einem homöo-heterotypischen Schema folge. Würden nur die Ergebnisse von Fall I allein vorliegen, so könnten sie auch mit der Annahme zufriedenstellend geklärt werden, daß der zweite Teilungsschritt die Aufspaltung der Gene bewirke. Einmal könnte wieder die Brandspore der Ort sein, an dem sich beide Teilungen abspielen, und von ihr würden die zwei verschiedenen Kerne an die Primärsporidie abgegeben. Die einzelnen Phasen könnten aber auch getrennt verlaufen. Die erste Teilung in der Spore lieferte dann zwei Kerne, von denen jeder noch die A- und B-Tendenz besitzt. Würde nun der eine Kern in die Sporidie wandern, der andere in der Spore verbleiben und würde erst nach diesem Ortswechsel die geschlechtsbestimmende zweite Teilung einsetzen, so würden dadurch gleichfalls Spore wie Sporidie je zwei Kerne verschiedener Tendenz erhalten. Es entfiele somit die oben benötigte Annahme der Auswanderung von zwei Kernen in die Primärsporidie. Fall II dagegen, bei dem Spore wie Sporidie eingeschlechtlich sind, läßt sich mit einem homöo-heterotypischen Schema nicht ohne weiteres in Übereinstimmung bringen. Erst weitere Hilfshypothesen, wie Degeneration von Kernen bestimmter Tendenz z. B., müßten zur Stütze herangezogen werden. Diese würden sich in gleicher Weise auf Fall III und IV erstrecken müssen, bei denen Primärsporidie bzw. Brandspore eingeschlechtlich sind. Demgegenüber scheint die oben gemachte Voraussetzung, die die Aufspaltung der geschlechtsbestimmenden und damit auch sämtlicher Faktoren in den ersten Schritt der Reduktionsteilung verlegt, die einfachere und ungezwungenere zu sein. Für sie bleibt allerdings nichts anderes übrig, als für die Fälle mit zweigeschlechtlichen Primärsporidien das Einwandern von zwei Kernen verschiedener Tendenz zu postulieren. Der Gedanke von Kernwanderungen würde aber nichts so Absonderliches sein, da wir sie auch für andere Brandpilze annehmen müssen. Rawitscher (1922) hat neuerdings für Cintractia Montagnei darauf hingewiesen und mit zytologischen Bildern belegt. Die weiteren Erklärungs-

prinzipien, die Kernvermehrung in der Brandspore vor dem Hinauswandern und evtl. ein Einwandern von drei Kernen ergeben sich daraus zwanglos von selbst. Fassen wir kurz zusammen, so fordert die Interpretation der Versuchsresultate eine Reduktionsteilung des diploiden Brandsporenkerns in vier haploide bei der Keimung der Brandspore, ein Auswandern von zwei Kernen in die Primärsporidie und gelegentlich eine Vermehrung der Sporidienkerne vor dem Hinauswandern. Sie läßt für seltenere Fälle die Entscheidung zwischen der Auswanderung von drei Kernen oder eines Kernes, der den zweiten Teilungsschritt noch nicht erledigt hat, offen.

Die zytologische Untersuchung konnte für diese gedanklichen Forderungen fast lückenlos das Beweismaterial beibringen. Sie litt allerdings lange Zeit unter technischen Schwierigkeiten der Färbung. Die Zellen der Macrospora enthalten Granula, die den Farbstoff ebenso stark speichern wie die Kerne, ihn aber womöglich noch langsamer abgeben, so daß eine Differenzierung von Kern und Plasma nicht erreicht werden konnte. Alle Variationen der Fixierung, der Beiz-, Wässerungs-, Färbungs- und Differenzierungszeiten waren dem tückischen Objekt gegenüber machtlos. Erst bei tastenden Versuchen, diese Granula vor der Färbung aus dem Plasma herauszulösen, wurden günstige Resultate erzielt. Nachdem Pepsin- und Trypsinverdauungsversuche, die eiweißartige Granula hätten lösen müssen, fehlgeschlagen waren, lag es nahe, an eine lipoidartige Natur der Granula zu denken. Eine 24stündige Ätherbehandlung im 25°-Thermostaten war der Helfer in der Not, der die Kerne in schönster Klarheit hervortreten ließ. Später zeigte es sich, daß auch 5—6stündiges Verweilen darin genügt. Diese Methode schließt sich also eng an die von Kniep (1921) empfohlene Aufklebemethode mittels Celloidin-Äther an. Das Brandsporenmaterial wurde in üblicher Weise auf dünn mit Würzeagar überzogenen Objektträgern ausgesät, im gewünschten Keimungsstadium mit konzentrierter, heiß gesättigter Sublimatlösung in Ermangelung der zur Zeit in größeren Mengen unerschwinglichen Osmiumsäure 15 Minuten lang fixiert und das Sublimat sorgfältig ausgewaschen. Die Sublimatfixierung lieferte genügend gute Bilder, die sich von vergleichsweise mit Flemmingscher

Lösung fixierten Präparaten nicht wesentlich unterschieden. Nach leichtem Übertrocknen kamen die Objektträger in wasserfreien Äther und wurden nach Passage der Alkoholreihe wie üblich nach Heidenhain gefärbt. Die Beiz- und Färbzeit wurde nicht länger als 5 Minuten ausgedehnt, die Beize dagegen ca. 15 Minuten ausgewaschen.

Die wichtigsten Bilder sind in Tafel I zusammengestellt. Die Kerne bestehen aus einem stark gefärbten Nukleolus, um den meist ein farbloser, von dem leicht granulierten Plasma sich deutlich abhebender Hof, der die Kernhöhle darstellt, zu erkennen ist. In Fig. 1 sehen wir in der jungen Primärsporidie einen Kern, der von der Spore aus eingewandert ist. Er erreicht sehr schnell die Spitze der Sporidie (Fig. 2), und ihm folgt aus der Spore ein zweiter Kern (Fig. 3). Dieser schlüpft durch das schmale Verbindungsstück zwischen Keimfortsatz und Sporidie hindurch, und die Sporidie enthält jetzt zwei Kerne (Fig. 5—7). Von der Brandspore wandert ein dritter Kern dicht hinter dem zweiten aus (Fig. 5—11). In der Regel schnürt sich aber die Primärsporidie ab, ehe der dritte Kern in sie eingetreten ist (Fig. 8—12). Er liegt dann an der Spitze des Keimfortsatzes und tritt von hier in die zweite Sporidie über (Fig. 8—12, 16). Diese Stadien sind überaus häufig und lassen es möglich erscheinen, daß der dritte Kern gelegentlich die Primärsporidie noch vor ihrer Abtrennung erreicht. Für Fig. 6 scheint diese Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen. Wir hätten damit die dreikernige Primärsporidie, wie wir sie zur Deutung des Falles IV annehmen mußten. Bilder, die Sporidien mit drei Kernen zeigten, wurden in einigen Fällen auch gefunden (Fig. 22—23). Doch möchte ich diese als Folgesporidien, nicht als Primärsporidien auffassen. Dafür spricht die seitliche Insertion der Sporidien und die eckige Form des Keimfortsatzes. In günstigen Fällen lassen sich in dem System von Primärsporidie und Brandspore vier Kerne nachweisen (Fig. 4—5, 9—12). Die Abschnürung beginnt mit dem Zurücktreten des Protoplasmas aus dem dünnen Verbindungsstück, das schließlich durchtrennt wird (Fig. 8—10). Frisch abgeschnürte, noch einzellige Primärsporidien enthalten zwei Kerne. Bilder wie Fig. 9—10 sind außerordentlich häufig anzutreffen,

die Durchwanderungsstadien des zweiten Kernes natürlich seltener. Nach der Abtrennung bildet sich nun in der Primärsporidie die Querwand aus (Fig. 11), und die beiden Zellen gehen entweder zur Sporidiensprossung (Fig. 12—13) oder zur Kopulation durch eine seitliche Brücke über. Der Kopulation folgt der Kernübertritt und die Bildung des paarkernigen Suchfadens (Fig. 14—15). Die späteren Sporidien sind in der Regel einkernig (Fig. 17). Als Ausnahmen wurden nur die oben bereits erwähnten Fig. 22—24 gefunden. Das nahe Zusammenliegen der beiden Kerne in Fig. 23—24 deutet wohl darauf hin, daß sie soeben aus einer Teilung hervorgegangen sind. Vielleicht sind die dreikernigen Sporidien auch ein Hinweis, daß in den Abfischversuchen noch nicht alle Möglichkeiten der Kernwanderungen erfaßt sind. Während und nach der Abschnürung der Primärsporidie können bereits weitere Teilungen der in der Spore zurückgebliebenen Kerne einsetzen. Belege dafür geben Fig. 18—21 wieder. Besonders interessant ist Fig. 21. Hier hat eine Spore, die nach dem Violacea-Typus gekeimt hat, im ganzen fünf Kerne. Der Kern der Spore dürfte durch Teilung eines der Promyzelkerne, vermutlich des der unteren Promyzelzelle, entstanden sein. Die Violacea-Keimungen selbst bieten nichts Besonderes. Entweder ist die Spore entleert und vier Kerne sind auf die Promyzelzellen verteilt, oder ein Kern bleibt in der Spore zurück und die übrigen sind auf ein dreizelliges Promyzel verteilt. Die Suchfäden enthalten im allgemeinen zwei Kerne (Fig. 40). Gelegentlich findet man aber darin drei und auch vier. In Fig. 41—42, die Ausschnitte aus Suchfäden wiedergeben, dürften die beiden zusammenliegenden Kerne vor kurzem aus der Teilung eines der Paarkerne hervorgegangen sein. Der Mechanismus der konjugierten Kernteilungen ist hier nicht in Tätigkeit getreten. Dreikernige Suchfäden sind in älteren Keimungspräparaten keine besondere Seltenheit. In einem Falle ließ sich auch ein Suchfaden finden, der zur Sporidienbildung übergegangen war. Er ist in Fig. 43 wiedergegeben. Seine Lage war so bezeichnend, daß eine Verwechslung etwa mit gewöhnlichen Sporidien, die zufällig in Zusammenhang geblieben wären, ausgeschlossen ist. Von den gekeimten Brandsporen treiben die Suchfäden weit in den umgebenden

Agar aus und bilden in ihrer Masse einen förmlichen Strahlenkranz um die Sporen. Sie liegen dann vollkommen übersichtlich und frei von den durch die Agarschicht fixierten Sporidien. An einer solchen Stelle lag dieser Suchfaden ungefähr vier Gesichtsfelder von der Sporidienmasse entfernt. Seine Zugehörigkeit zu einem Paar kopulierter Sporidien ließ sich in dem dichten Geflecht anderer Suchfäden nicht feststellen. Da aber in den Kulturversuchen die Macrospora nie haploide Suchfäden gebildet hatte, darf er mit Sicherheit als einem paarkernigen Suchfaden entstammend angesprochen werden.

In einigen Fällen ließ die Interpretation der Abfischversuche verschiedene Möglichkeiten zu. Es kam noch das Auswandern von Kernen nach dem ersten Schritte der Reduktionsteilung, bzw. eine Degeneration von Kernen in Betracht. Fig. 25 gibt ein Stadium wieder, in dem in der Brandspore und in der Primärsporidie je ein Kern zu sehen ist. In einem anderen Falle war in aller Klarheit eine Teilung eines Einzelkernes der Primärsporidie zu konstatieren (Fig. 26). In einem weiteren Bilde enthielt die Primärsporidie einen in der Teilung befindlichen Kern und einen zweiten (Fig. 27). In der Brandspore war leider etwas undeutlich ein dritter Kern zu erkennen, der in die Zeichnung seiner Unschärfe halber nicht aufgenommen wurde. Ich glaube nicht fehl zu gehen, wenn ich in Fig. 25 bis 26 die Realisierung der zweiten Erklärungsmöglichkeit von Fall II und in Fig. 27 die von Fall IV der Abfischversuche sehe. Die Übereinstimmung der aufgestellten Schemata mit diesen Kernbildern ist offenbar. Bilder, die auf eine Degeneration einzelner Kerne hindeuten würden, wurden nicht gefunden. In Fall IV kommt also sicher die eine Möglichkeit des Schemas, das Hinauswandern eines Kernes vor vollendeter Reduktion, vor, die andere, das Einwandern von drei Kernen in die Primärsporidie, erscheint nicht ausgeschlossen. Sie finden sich vermutlich beide nebeneinander.

Die theoretisch erschlossenen Verhältnisse der Kernwanderungen wären somit fast alle zytologisch belegt oder wahrscheinlich gemacht. Nur das Stadium direkt nach der Reduktion, bei dem in der Spore vier Kerne zu finden sein müßten, bildet eine Lücke in der Beweisführung. Für den Nachweis

dieses frühesten Keimungsstadiums bietet die Macrospora erhebliche Schwierigkeiten. Die Brandsporen sind dann noch erfüllt mit stark färbbaren Körnchen, die auch trotz der Ätherbehandlung eine scharfe Differenzierung der Kerne unmöglich machen. Erst während des Austreibens der Primärsporidie scheinen sie entweder auf diese mit verteilt zu werden oder sie werden auch bei der Keimung abgebaut und verbraucht. Erst in diesem Stadium erhält man klaren Einblick in die Spore selbst. In ungekeimten Sporen kann man nur eine dunkle zentral gelegene Masse, also doch wohl den diploiden Kern, ohne irgendwelche Differenzierung von Nucleolus und Kernmembran erkennen. Nur in einem glücklichen Falle ließen sich in einer Brandspore, die noch keinen Keimfortsatz getrieben hatte, zwei Kerne mit deutlichem Nucleolus erkennen (Fig. 28). Man wird diese Kerne als in der Reduktion befindlich, und zwar im Stadium nach der ersten Teilung auffassen müssen.

Abfischversuche an der Longissima.

Für die Versuche wurde Sporenmaterial von zwei verschiedenen Standorten benutzt. Der eine Standort (Vötting bei Freising) war rein zweigeschlechtlich mit den Geschlechtstypen A und B. Der andere (Krampnitzsee, nördlich von Potsdam bei Berlin) enthielt unter 100 untersuchten Einsporidienkulturen der Geschlechter A und C auch einmal das B-Geschlecht. Das Auftreten der C-Stämme war also so selten, daß es angängig erschien, auch dieses Material praktisch als zweigeschlechtlich zu betrachten. Die Kleinheit des Objektes und die vielfachen Schwierigkeiten der Methodik ließen nur in wenigen Fällen ganze Reihen von erster, zweiter, dritter Sporidie und Brandspore gewinnen. In vielen Versuchen blieben die Reihen lückenhaft und nur einzelne ihrer Glieder kamen schließlich zur Geschlechtsprüfung. Manchmal ließ es sich auch nicht vermeiden, daß zwei Sporidien gleichzeitig, meist erste und zweite, in den Kapillaren gefangen wurden. Da aber für jede Sporidie festzustellen war, in welcher Reihenfolge sie von der Brandspore abgeschnürt worden war, und da sich für jede Brandspore ermitteln ließ, wieviel Sporidien sie bereits gebildet hatte, so boten diese Einzelresultate eine gute zahlenmäßige

Ergänzung der gelungenen Reihen. So beziehen sich die Gesamtresultate auf Abfischversuche an 69 einzelnen Brandsporen.

Die Ergebnisse sind mit wenig Ausnahmen einheitlich. Wird nur die erste Sporidie gefischt und die Brandspore für sich kultiviert, so treten unter den Nachkommen beider Kopulationen auf. Sie enthalten also beide Geschlechter (s. Tabelle 2). Werden erste und zweite Sporidie und die Brandspore (nach Abschnürung von zwei Sporidien also) getrennt gezüchtet, dann ergibt sich das Bild von Tabelle 3. Die erste Sporidie ist wie vorher zweigeschlechtlich, ebenso auch die zweite Sporidie. Die Brandspore dagegen ist jetzt eingeschlechtlich. Tabelle 4, bei der auch die dritte Sporidie noch isoliert wurde, gibt die gleichen Resultate für die erste und zweite Sporidie. Dritte Sporidie und Brandspore sind eingeschlechtlich, und zwar besitzen sie stets das gleiche Geschlecht. Tabelle 5 ist eine Zusammenstellung der Gesamtresultate unter Einbeziehung der Sporidien und Brandsporen aus lückenhaften Reihen. Sie stimmt prinzipiell vollkommen mit den vorhergehenden überein. Die Ausnahmen von diesen einheitlichen Ergebnissen beziehen sich auf zwei Reihen und zwei Einzelsporidien. Versuch 160 gab folgendes Ergebnis: 1. Sporidie A + B, 2. Sporidie A, 3. Sporidie A + B, Brandspore A. Versuch 176 lieferte: 1. Sporidie A + B, 2. Sporidie B, Brandspore B. Von den zwei Einzelsporidien war die eine, die erste Sporidie, rein eingeschlechtlich C, die andere, eine zweite, vom A-Charakter. Beide entstammten dem Potsdamer Material, die Reihen dem Vöttinger Material.

Diese Ergebnisse schienen anfangs, als die Parallelversuche an der Macrospora noch nicht zum Vergleich zur Verfügung standen, reichlich überraschend und undurchsichtig und einer einheitlichen Auslegung im Hinblick auf die Fragestellung der Arbeit zu trotzen. Vor allem schienen sie nicht darüber Aufschluß zu geben, ob die Aufspaltung der Sexualgene und damit die Reduktionsteilung bei der Keimung der Spore oder bei der Bildung des Fruchtträgers erfolge. Aber das an der Macrospora bewährte Erklärungsprinzip, die Einwanderung von zwei Kernen in die Sporidien, brachte sie dem Verständnis näher. Es wandern hier also nicht nur in die erste, sondern auch in die zweite Sporidie zwei Kerne verschiedener Ge-

Tabelle 2. Erste Sporidie und Brandspore nach Abschnürung der ersten Sporidie isoliert gezüchtet.

Versuch	1. Sporidie	Brandspore
67.	A — C	A — C
81.	A — C	A — C
82.	A — C	A — C
85.	A — C	A — C
144.	A — B	A — B
155.	—	A — B

Tabelle 3. Erste Sporidie, zweite Sporidie und Brandspore nach Abschnürung der zweiten Sporidie isoliert gezüchtet.

Versuch	1. Sporidie	2. Sporidie	Brandspore
54.	A — C	A — C	A
157.	A — B	A — B	B
162.	A — B	A — B	A
182.	A — B	A — B	A
184.	A — B	A — B	B
192.	A — B	A — B	A

Tabelle 4. Erste, zweite, dritte Sporidie und Brandspore nach Abschnürung der dritten Sporidie isoliert gezüchtet.

Versuch	1. Sporidie	2. Sporidie	3. Sporidie	Brandspore
68.	A — C	A — C	A	A
147.	A — B	A — B	B	B
161.	A — B	A — B	B	B
178.	A — B	A — B	A	A
193.	A — B	A — B	B	B
194.	A — B	A — B	B	B

Tabelle 5. Gesamtresultate aus vollständigen und lückenhaften Reihen der Abfischversuche an der Ust. longissima (Ausnahmen s. Text).

	Gesamtzahl	Geschlechter beim Potsdamer Material	Geschlechter beim Vöttinger Material
1. Sporidie	38	16 × A + C	22 × A + B
2. „	31	10 × A + C	21 × A + B
3. „	15	2 × A 1 × C	5 × A 7 × B
Brandspore nach Abschnürung der 1. Sporidie	6	4 × A + C	2 × A + B
„ „ „ „ 2. „	15	2 × A 1 × C	5 × A 7 × B
„ „ „ „ 3. „	18	1 × A 1 × C	7 × A 9 × B
1. und 2. Sporidie zusammen	13	4 × A + C	9 × A + B
2. „ 3. „ „	1	—	1 × A + B
1., 2. und 3. Sporidie zusammen	1	—	1 × A + B
3. Sporidie und Brandspore zusammen . . .	3	1 × A 1 × C	1 × B

schlechtstendenz ein. In die dritte und die weiteren Sporidien wandert nur ein Kern ein, möglicherweise auch zwei, aber dann stets von gleicher Geschlechtstendenz. Abb. 6 veranschaulicht diese Erklärung. Aus ihr ist leicht eine weitere interessante Beziehung abzulesen. Die keimende Brandspore enthält nach der Reduktion wieder vier Kerne, je zwei »weiße« und »schwarze«. Ein »weißer« und ein »schwarzer« Kern wandern in die erste Sporidie hinaus. Vor dem Auswandern des zweiten Kernpaares in die zweite Sporidie teilt sich nun ein Kern (im Schema der »schwarze«). Einer der Tochterkerne wandert in die zweite Sporidie zusammen mit dem ungeteilt gebliebenen »weißen« Kern. Der andere »schwarze« Tochterkern bleibt in der Brandspore zurück, und von ihm leiten sich die Kerne sämtlicher späteren Sporidien ab. Es muß also ein besonderer korrelativer Mechanismus dafür sorgen, daß die Kerne der einen Tendenz sich vor der Wanderung teilen, daß die Kerne der anderen Tendenz aber stets, ohne eine Vermehrung zu erfahren, in die beiden ersten Sporidien wandern. Würden auch sie zur Teilung kommen, so müßte auch in den Sporidien nach Abschnürung der zweiten alle beiden Geschlechtstendenzen auftreten. Das war in den Versuchen nie der Fall. Welche Momente im einzelnen darüber entscheiden, daß die Kerne dieser Tendenz hinauswandern, die der andern sich teilen, ob es Bedingungen der Außenwelt oder innere Ursachen sind, darüber lassen die vorliegenden Versuche kein Urteil zu. Das Verhältnis der Geschlechter der Sporidien nach Abschnürung der zweiten Sporidie betrug bei dem Potsdamer Sporenmaterial 13 A : 19 B. Es dürfte sich wohl an einem größeren Versuchsmaterial als ein 1 : 1-Verhältnis erweisen. Bei dem Vöttinger Material liegen nur kleinere Zahlen vor, 5 A : 2 C.

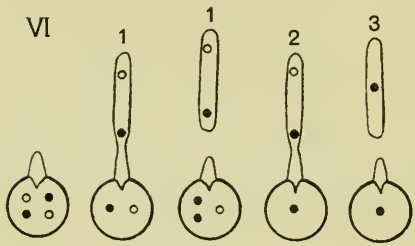


Abb. 6.
Erste Sporidie: A + B
Zweite Sporidie: A + B
Dritte Sporidie: A oder B
Brandspore: A oder B

Die Ausnahmen in den Versuchsergebnissen lassen sich dieser Auslegung einfügen. Für Versuch 160 müßte man annehmen, daß der zweite nach Abschnürung der ersten Sporidie in der Spore verbleibende Kern der Geschlechtstendenz, die in diesem Falle zur Teilung determiniert ist, durch irgendeine Störung die zweite Sporidie nicht mehr vor ihrer Abschnürung erreicht hat, sondern erst bei der Abschnürung der dritten Sporidie aus der Spore austritt. Für Versuch 176 bliebe ebenso wie für Fall III bei der Macrospora die Entscheidung offen, ob in die erste Sporidie drei Kerne oder ein Kern im ersten Schritt der Reduktionsteilung eingewandert sind oder ob einer der Reduktionskerne zugrunde gegangen ist. Über die beiden Ausnahme-Einzelsporidien läßt sich kein bestimmter Schluß ziehen.

Fassen wir die Hauptpunkte dieser Ausdeutung der Versuchsergebnisse zusammen, so ist zu postulieren: 1. Reduktionsteilung des diploiden Brandsporenkernes in der Brandspore, 2. Auswanderung von zwei Kernen sowohl in die erste wie zweite Sporidie. Die Entscheidung darüber, ob in die späteren Sporidien nur einer oder evtl. ebenfalls zwei Kerne einwandern, muß offen gelassen werden.

Die genaue zytologische Verfolgung der Keimung der Longissima ist besonders erschwert durch die Unmöglichkeit, erste und zweite und spätere Sporidien ihrer Form nach sicher zu unterscheiden. So muß besonderer Wert auf das Abpassen des gewünschten Keimungsstadiums bei der Fixierung gelegt werden. Für die Bildung der ersten Sporidie gelingt dies ohne Schwierigkeit. Die Kerne der Longissima bestehen wie bei der Macrospora aus dem stark färbbaren Nucleolus und der eigentlichen Kernhöhle, die den Farbstoff leicht abgibt. In stärker differenzierten Präparaten ist sie nur als ungefärbter Hof um den Nucleolus herum zu erkennen. Die Größe des Nucleolus reicht fast an die untere Grenze der Auflösungskraft der Objektive heran. Sie macht es auch unmöglich, Mitosen klar zu erkennen. Fig. 29 gibt ein junges Keimungsstadium wieder, bei dem ein Kern aus dem Keimfortsatz in die erste Sporidie schlüpft. Er ist in diesem Falle als ganzes gefärbt. In Fig. 30 sehen wir ihn an der Spitze der Sporidie. Ihm folgt von der Spore her ein zweiter Kern, der in die Sporidie noch vor ihrer Abtrennung eintritt (Fig. 31—33). In Fig. 31

sind deutlich innerhalb der Spore noch zwei weitere Kerne zu finden. Die erste Sporidie wird zweikernig abgeschnürt, und man findet sie in etwas älteren Präparaten bereits etwas vergrößert frei vor (Fig. 34). Die Zweikernigkeit der ersten Sporidie steht somit außer Zweifel. Der Nachweis einer Zweikernigkeit der zweiten Sporidie wird unsicher durch die Schwierigkeit, dieses Keimungsstadium genau abzupassen. Die Sporen keimen nicht alle gleichmäßig, und einzelne Sporen haben bereits mehrere Sporidien gebildet, während andere erst im Beginn der Keimung sind. Auch auf die gegenseitige Lagerung von Sporidien zur Spore kann man sich nicht recht verlassen, da beim Fixieren und Auswaschen der Fixierflüssigkeit stets mit dem Abschwimmen von Sporidien oder Sporen zu rechnen ist. Die Identifizierung einer bestimmten Sporidie als zweite wird dadurch so unsicher, daß ich die mir vorliegenden Bilder nicht als absolut zwingendes Beweismaterial ansprechen möchte. Doch glaube ich, daß das tatsächliche Vorliegen der postulierten Zweikernigkeit bei der ersten Sporidie die auf dem gleichen Wege erschlossene Zweikernigkeit der zweiten Sporidie höchst wahrscheinlich macht. Bilder dreikerniger Sporidien oder solcher wie Fig. 27 der Macrospora, wie sie die Deutung des Versuches 176 erforderte, ließen sich nicht auffinden. Das erscheint bei der Seltenheit derartiger Ausnahmen nicht besonders verwunderlich. Für das Zutreffen der oben gegebenen Deutung kann also nur die Parallele, die bei der Macrospora vorliegt, ins Feld geführt werden. Einfacher ist es, die späteren Keimungsstadien zu treffen. Wartet man mit der Fixierung, bis eine größere Anzahl von Fruchtträgern ausgebildet sind, so kann man mit ziemlicher Sicherheit annehmen, daß die jetzt erst von der Spore abgeschnürten Sporidien dritte oder spätere sind. Sie enthalten nur einen Kern (Fig. 35—36). In diesen Präparaten läßt sich auch die Ausbildung der Sporidien zu Fruchtträgern verfolgen. Man findet Sporidien mit zwei sehr nahegelagerten Kernen (Fig. 37), die wohl vor kurzem durch Teilung entstanden sind. Ebenso werden Bilder wie Fig. 38 zu deuten sein, bei der die beiden zusammenliegenden Kerne Schwesterkerne sein dürften. In manchen Fällen teilen sich auch zwei Kerne anscheinend gleichzeitig, so daß sie eine

konjugierte Teilung vortäuschen können. Schließlich findet man die promyzelartigen ersten Fruchtträgerstadien, von denen Fig. 39 eines mit schon weiterer Teilung der Kerne wiedergibt. Die Kopulation und die Suchfädenbildung bieten nichts Besonderes oder Abweichendes gegenüber der Macrospora. Erwähnt sei nur, daß auch hier dreikernige Suchfäden, der erste Beginn der Aufspaltung in die Haplophase, gelegentlich zu konstatieren waren. Die sichere Feststellung des Vierkernstadiums in der Spore scheiterte aus den gleichen Gründen wie bei der Macrospora.

Diese Schilderung der Zytologie der Longissima steht in einem Gegensatz zu zwei Angaben der Literatur. Paravicini (1917) bildet eine keimende Brandspore ab, an der eine einkernige Sporidie und ein Keimfortsatz mit einem Kern an der Spitze zu sehen ist (Tafel II, Fig. 31 und 32). Er bezeichnet diese als erste Sporidien. Seine Präparationsweise (Ausstreichen von gekeimtem, fixiertem Material auf mit Eiweißglyzerin bestrichene Objektträger) scheint mir nicht die Gewähr dafür zu bieten, daß es sich hier wirklich um erste Sporidien handelt. Seine Fig. 36 und 38, die die Kopulation fast ovaler Sporidien bzw. Ketten ovaler, zweikerniger Sporidien darstellen, weichen so von dem morphologischen Bilde der Longissima ab, daß ich es für zweifelhaft halten möchte, ob sie überhaupt in den Entwicklungsgang der Longissima hineingehören. Rawitscher (1922) gibt an, daß die Reduktionsteilung bei der Longissima in dem »Promycelschlauch«, der vermutlich einer ersten Sporidie entsprechen dürfte, stattfindet. Herr Dr. Rawitscher hatte die Liebenswürdigkeit, mir seine Zeichnungen und einige Präparate zu überlassen, wofür auch hier bestens gedankt sei. Bei einer solchen Keimungsart wäre es ausgeschlossen, daß die Sporen weitere Sporidien bilden könnten. Rawitscher hat seinerzeit den weiteren Entwicklungsgang wegen der Kleinheit der Kerne nicht untersucht, so daß sich darüber nichts ermitteln ließ. Auf Grund der Erfahrungen über die Verteilung der Geschlechter bei verschiedenen Fundorten und von Beobachtungen an anderen Brandpilzen, die auf eine weitgehende Rassenbildung innerhalb gut umrissener Arten hinweisen, möchte ich es nicht für ausgeschlossen halten, daß auch in diesem Falle eine Rasse mit abweichender Keimung vorlag.

Schlußbetrachtungen.

Das prinzipiell Neue, das die vorstehenden Untersuchungen ergeben haben, ist die Feststellung, daß die Primärsporidie der Macrospora und die erste und zweite Sporidie der Longissima von der Spore aus je zwei Kerne mitbekommen. Die zweikernigen Sporidien der Longissima unterscheiden sich von den später gebildeten einkernigen Sporidien morphologisch in keiner Weise. Die Eigentümlichkeit jeder Longissimasporidie, zu Fruchtträgern auszuwachsen, verdeckt gewissermaßen den Unterschied der beiden Sporidiensorten, indem die beiden Kerne der ersten und zweiten Sporidie ebenso auf die Zellen des Fruchtträgers verteilt werden, wie dies mit den aus Mitosen hervorgehenden Tochter- und Enkelkernen des einen Kernes der dritten und folgenden Sporidien geschieht. Bei der Macrospora dagegen fehlt die Potenz zur Fruchtträgerbildung, und hier machen sich auch die zweikernigen Sporidien gegenüber den einkernigen durch ihre besondere Form bemerkbar. In jenen häufigsten Fällen nun, bei denen die beiden Kerne verschiedene geschlechtliche Tendenz besitzen, unterscheiden sich die soeben abgeschnürten zweikernigen Sporidien scheinbar nicht wesentlich von dem eigentlichen Paarkernstadium, das durch einen Sexualakt, die Kopulation, zustande kommt. Hier wie dort liegen in einer Zelle zwei Kerne, denen man in bezug auf ihre Sexualfaktoren verschiedene Genotypen zuschreiben muß. Stets aber sehen wir, daß die zweikernigen Sporidien eine trennende Zellwand zwischen ihren beiden Kernen ausbilden. Sofort danach können diese beiden Zellen seitliche Brücken treiben und die gleichen Kerne kommen jetzt in dem Suchfaden in einem gemeinsamen Plasma wieder zusammen. Die Konstanz, mit der dieser komplizierte Umweg eingeschlagen wird, weist darauf hin, daß zwischen den beiden Stadien, der zweikernigen Sporidie und dem paarkernigen Suchfaden, doch tiefgreifende Unterschiede prinzipieller Natur bestehen müssen. Rein entwicklungsgeschichtlich betrachtet sind sie dadurch unterschieden, daß die im Suchfaden zusammentretenden Kerne jeder für sich in einer eigenen Zelle, in einem abgegrenzten Plasma, sich befanden, während die Kerne der Sporidien noch nicht zur Ausbildung einer jedem Kern eignen Zelle gekommen waren. Sie sind ja

erst vor kurzem durch die Reduktionsteilung entstanden und lagen mit den anderen beiden Kernen zusammen in dem Plasma der Spore. Dieser Entwicklungsunterschied scheint auch den Wesensunterschied der beiden Stadien zu charakterisieren. Der Besitz einer eignen Zelle gestattet es dem Kern, mit einer abgegrenzten Plasmaportion in Wechselbeziehungen zu treten und seine speziellen genotypischen Anlagen darauf auswirken zu lassen. Man wird nicht fehlgehen mit der Annahme, daß hierbei auch die Sexualfaktoren des Kernes in Richtung einer sexuellen Differenzierung auf das Plasma einwirken werden. Zum Eintritt des Sexualaktes, zur Ausbildung des Paarkernstadiums genügen also nicht einfach Kerne mit verschiedener geschlechtlicher Tendenz, sondern es ist dazu auch sexuell differenziertes Plasma nötig. Für den Standpunkt, der »einen wesentlichen Zug der Befruchtungsvorgänge in einer sexuellen Verschiedenheit der Gametenkerne« sieht (Hartmann 1918), ist die Notwendigkeit des Umweges über das kerneigne Plasma nicht einzusehen. Vielmehr scheint der vorliegende Fall für jene Anschauung zu sprechen, die in den Kernen wohl die Träger von differenten Geschlechtsfaktoren sieht, der aber die Kerne selbst nicht, sondern nur ganze Zellen »geschlechtlich differenziert« (s. G. Hertwig 1921, dort weitere Literatur). Hinzugefügt sei noch, daß diese Erwägungen nicht nur für die Ust. longissima und macrospora Geltung haben, sondern sich ebenso auf die Brandpilze mit vierzelligen Promycelien beziehen können.

Bei der Macrospora können die zweizelligen Primärsporidien sofort nach Ausbildung der kerneigenen Zellen kopulieren. Ob sie dies tun oder nicht, hängt nur von Bedingungen der Außenwelt ab. Für die sexuelle Differenzierung des Plasma hat eine einzige Zellgeneration genügt. Bei der Longissima dagegen treten in Fruchtträgern mit Kernen verschiedener Tendenz nie seitliche Brücken auf. Erst weitere Nachkommen der Fruchtträgerzellen können zur Kopulation miteinander kommen. Von welcher Sporidiengeneration ab die Kopulationsmöglichkeit besteht, läßt sich leider nicht feststellen. Für die Erklärung dieses verschiedenen Verhaltens kämen zwei Gedankengänge in Betracht. Einmal könnte der Longissima vollkommen die Fähig-

keit fehlen, Hufeisenkopulationen auszubilden. Dieser Mangel wäre dann genotypisch durch Modifikation oder völliges Fehlen eines Genes bedingt. Es könnte aber auch sein, daß die Wechselwirkung zwischen Kern und Plasma in einer Zellgeneration noch nicht genügt, um die zur Kopulation nötige sexuelle Differenzierung des Plasmas herzustellen. Erst bei einer längeren Einwirkung des Kernes auf das Plasma im Laufe mehrerer Zellgenerationen würde dieser Zustand erreicht werden. Es ist schwer, solange wir nichts darüber wissen, ob die Fähigkeit, Hufeisenkopulationen zu bilden, genotypisch bedingt ist oder nicht, sich für die eine oder die andere der beiden Annahmen zu entscheiden. Ein Weg zur Entscheidung läge in Bastardierungsversuchen zwischen der Longissima und der Macrospora, die ja durch ihre gegenseitige Kopulationsfähigkeit ermöglicht sind. Für die zweite Möglichkeit würde die Beobachtung Burgeffs (1916) sprechen, daß die jungen Urmycelien des Phycomyces nicht sofort in sexuelle Reaktionen miteinander eintreten, sondern erst nach einem gewissen Alter des Mycels dazu befähigt sind. Möglicherweise kann dieser Gedankengang auch eine Erklärung der »neutralen« Stämme heterothallischer Mucorineen bieten, soweit diese nicht heterokaryotischer Natur sind. Man müßte dann an Störungen der Wechselbeziehungen zwischen Kern und Protoplasma denken.

Kehren wir nun zu der Fragestellung, von der die Arbeit ausging, zurück. Es ist also sichergestellt, daß die Reduktionsteilung der Longissima bei der Keimung der Brandspore stattfindet. Eine Reduktionsteilung bei der Ausbildung der äußerlich promycelartigen Fruchtträger kann nicht angenommen werden. Dadurch steht die Longissima in vollkommener Übereinstimmung mit der Entwicklung der anderen Ustilaginaceen und bietet dem Verständnis vom Standpunkte des Kernphasenwechsels keinerlei Schwierigkeiten. Die Besonderheiten der Longissima, die den Vergleich ihrer Entwicklung mit dem Normaltyp der Violaceakeimung erschwerten und die zur Fragestellung der Arbeit führten, beruhten darin, daß wir das morphologische Bild des Promycels, das uns sonst eine vorausgegangene Reduktionsteilung anzeigt, an einer anderen Stelle des Lebenszyklus vorfanden. Es ist jetzt klar, daß die pro-

mycelartigen Fruchtträger der Longissima und die Promycelien des Violacea-Keimungstypus keine homologen Gebilde sind. Für die Lehre vom Kernphasenwechsel sind Promycelzellen ebenso wie Basidiosporen und Ascosporen jene Zellen, die die aus einer Reduktionsteilung hervorgegangenen Kerne aufnehmen. Dieser Definition nach sind Promycelzellen natürlich auch bei der Longissima vorhanden. Der Unterschied besteht nur darin, daß die Hervorhebung dieser Zellen gegenüber späteren Vermehrungszuständen des Pilzes durch eine besondere Formgestaltung, eben im Promycel des Violacea-Typus und homolog dazu als Basidiosporen und Ascosporen, hier fehlt. Hinzu kommen noch andere Abweichungen von der normalen Brandpilzkeimung, die durch ihr Zusammentreffen das Außergewöhnliche an der Longissima darstellen. Es sind dies neben der Formgleichheit von Promycelzellen und späteren Vermehrungsstadien der Zerfall der Promycelien in ihre einzelnen Zellkomponenten und die wiederholte Bildung von Sporidien von einer Brandspore aus. Der einfachste Fall der Entwicklung eines Brandpilzes mit diesen Abweichungen wäre ungefähr so vorzustellen. In der Brandspore haben wir vier haploide, reduzierte Kerne, je zwei vom A- und B-Charakter. In die erste Sporidie tritt z. B. ein Kern mit der A-Tendenz ein, in die zweite ein B-Kern, in die dritte wieder ein A-Kern. Die Spore enthält jetzt noch einen B-Kern. Er teilt sich in der Spore, der eine Tochterkern wandert in die vierte Sporidie hinein, der andere bleibt weiter in der Spore und gibt an jede neue Sporidie einen seiner Abkömmlinge ab. In diesem Falle müßten also alle Sporidien eingeschlechtlich sein und von der vierten Sporidie ab alle das gleiche Geschlecht besitzen. So ungefähr hätte man sich auch a priori die Kernverteilungen bei der Longissima vorstellen können, wenn man die Reduktionsteilung in die Spore verlegte. Die Macrospora schließt sich diesem Idealbilde noch am engsten an. Sie ist nur dadurch von ihm unterschieden, daß in ihre erste Sporidie gleich zwei Kerne einwandern. Die Longissima dehnt die Tendenz zur Auswanderung von zwei Kernen noch weiter bis auf die zweite Sporidie aus. Es erscheint aber nicht ausgeschlossen, daß der Prototyp der Kernwanderungen bei anderen Arten in

der Tat verwirklicht ist. Besonders wahrscheinlich ist dies für Ust. Goeppertiana und Ust. olivacea, die beide nur einzellige Sporidien von der Spore aus bilden. Die Umwandlung der Sporidien zu Fruchtträgern bei der Longissima könnte demgegenüber etwas Sekundäres sein, bedingt durch die Mehrkernigkeit der Sporidien, wie es ja bei der Macrospora der Fall ist. Schwer scheint es, auf Grund der vorliegenden Tatsachen jetzt schon zu entscheiden, ob der Longissima-Typus als primär und primitiv oder als sekundär und abgeleitet aufzufassen ist, oder ob beide Typen Endstadien nebeneinander hergehender, selbständiger phylogenetischer Entwicklungsreihen darstellen. Die Tendenzen zu einer der Besonderheiten des Longissima-Typus, sowohl zur Formgleichheit von Promycelzellen und Sporidien wie zum Zerfall der Promycelien und zu einer mehrfachen Sporidienbildung von der Brandspore aus, finden wir auch bei Angehörigen des Violacea-Typus. Es sei hier nur auf die Ust. maior verwiesen, die nach der Schilderung Brefelds (1895) drei ihrer Promycelzellen konstant von der Spore abstößt, während die vierte in der Spore bleibt und von dort aus reichlich Sporidien bildet. Die Macrospora mit ihrer Fähigkeit je nach Außenbedingungen dem einen oder dem anderen Typus zu folgen, scheint ja ein Bindeglied zwischen beiden zu sein. Doch kann sie nicht darüber Auskunft geben, in welcher Richtung der Entwicklungsgang verlaufen ist. Eine Entscheidung darüber ließe sich treffen, wenn es gelänge, von einem der beiden Typen einen Anschluß zu niederen Pilzgruppen zu finden. Neben der Untersuchung anderer Brandpilzarten des Longissima-Typus können wir vielleicht auch von einer genetischen Analyse der beiden Gruppen, zu der die Longissima und Macrospora eine erste Möglichkeit bieten, und von einer kausalen Einsicht in die entwicklungsphysiologische Seite jeder einzelnen Besonderheit des Longissima-Typus einiges zur Klärung der phylogenetischen Beziehungen erwarten.

Zusammenfassung.

Durch Kombination einer Prüfung des sexuellen Verhaltens der einzelnen von der Spore bei der Keimung gebildeten Sporidien und von zytologischer Untersuchung ließ sich für die

Ustilago longissima und Ustilago longissima var. macrospora folgendes Bild ihres Entwicklungsganges gewinnen:

1. Die Reduktionsteilung findet bei beiden bei der Keimung der diploiden Brandspore statt. Beide schnüren von einem Keimfortsatz eine große Anzahl von Sporidien ab. Bei der Macrospora wandern in die erste Sporidie zwei Kerne hinein. Diese sind in der Regel von verschiedener geschlechtlicher Tendenz, so daß in der Nachkommenschaft dieser Sporidie Kopulationen auftreten können. Die Zweikernigkeit der ersten Sporidie findet ihren morphologischen Ausdruck in ihrer Zweizelligkeit. Die späteren Sporidien erhalten stets nur einen Kern und unterscheiden sich demgemäß durch ihre Einzelligkeit von der ersten Sporidie. Bei der Longissima wandern in die erste und zweite Sporidie zwei Kerne hinaus, während die späteren Sporidien nur einen Kern erhalten. Die verschiedene Wertigkeit der Sporidien tritt dadurch, daß jede Sporidie sich zu mehrzelligen, mycelialen Gebilden, den Fruchtträgern, umbildet, morphologisch nicht in Erscheinung.

2. Das Paarkernstadium wird bei beiden Arten durch Kopulation von Sporidien, bei der Macrospora auch der zwei Zellen der ersten Sporidie hergestellt. Unter den Bedingungen der Kultur kann das Paarkernstadium wieder in seine haploiden Komponenten aufspalten. Bei der Kopulation sind beide Partner gleichmäßig durch Austreiben von Kopulationsschläuchen beteiligt.

3. Die Fruchtträger der Longissima und wahrscheinlich auch die anderer Angehöriger der Pro- und Hemiustilagogruppe Brefelds sind nicht mit Promycelien homologisierbar.

4. Die Macrospora nimmt eine interessante Mittelstellung zwischen der typischen Promycelkeimung der meisten Ustilagoarten und der Sporidienkeimung der Longissima ein. Je nach Außenbedingungen folgt sie bald der einen, bald der anderen Keimungsart.

5. Bei der Longissima findet sich eine Abweichung von der Normalform der Heterothallie. Bei ihr lassen sich drei durch ihre geschlechtliche Reaktionsfähigkeit unterschiedene Sporidiensorten auffinden.

Die Arbeit wurde im Sommer 1921 im Bakteriologischen Laboratorium der Universitätskinderklinik Berlin begonnen. Für die Überlassung eines Arbeitsplatzes bin ich Herrn Geheimrat A. Czerny zu bestem Danke verpflichtet. Sie wurde im Hauptteile im Gärungsphysiologischen Institut der Hochschule Weihenstephan durchgeführt. Herrn Prof. Dr. H. Schnegg bin ich für seine Anteilnahme verbunden. Herrn H. Sydow-Berlin schulde ich Dank für die Einsicht in schwer erreichbare amerikanische Literatur.

Freising-Weihenstephan, Oktober 1922.

Zitierte Literatur.

Bauch, R., Kopulationsbedingungen und sekundäre Geschlechtsmerkmale bei Ustilago violacea. Biol. Zentralbl. 1922. **42**, 9—38.

Brefeld, O., Untersuchungen auf dem Gesamtgebiete der Mycologie. Heft 5. (Brandpilze I.) Leipzig. 1883.

—, Heft 12. (Brandpilze III.) Münster i. W. 1895.

—, Heft 15. (Die Brandpilze und die Brandkrankheiten V.) Münster i. W. 1912.

Burgeff, H., Untersuchungen über Variabilität, Sexualität und Erblichkeit bei Phycomyces nitens Kuntze. Flora. N. F. 1915. **8**, 353—448.

Clinton, G. P., North American Ustilagineae. Proceed. Boston Soc. of Nat. History. 1904. **31**, 329—529.

Davis, J. J., Wisconsin Parasitic Fungi. Transact. Wisc. Acad. Sci. Arts Lett. 1897. **11**, 174.

Hartmann, M., Ergebnisse und Probleme der Befruchtungslehre im Lichte der Protistenforschung. Die Naturwissenschaften. 1918. **6**, 349—355, 368—373.

Hertwig, G., Das Sexualitätsproblem. Biol. Zentralbl. 1921. **41**, 49—87.

Kniep, H., Über morphologische und physiologische Geschlechtsdifferenzierung. Verh. Phys.-med. Gesellsch. Würzburg. 1919. **46**, 1—18.

—, Über Urocystis Anemones (Pers.) Winter. Zeitschr. f. Bot. 1921. **13**, 289—311.

—, Über Geschlechtsbestimmung und Reduktionsteilung. Verh. Phys.-med. Gesellsch. Würzburg. 1922. **47**, 1—29.

Lindau, G., Ustilagineen in Kryptogamenflora der Mark Brandenburg. 1914.

Paravicini, E., Untersuchungen über das Verhalten der Zellkerne bei der Fortpflanzung der Brandpilze. Ann. mycologici. 1917. **15**, 57—96.

Plowright, Ch. B., A Monograph of the British Uredineae and Ustilagineae. London. 1889.

Rawitscher, F., Beiträge zur Kenntnis der Ustilagineen. Zeitschr. f. Bot. 1912. **4**, 673—706.

—, Beiträge zur Kenntnis der Ustilagineen II. Ebenda. 1922. **14**, 273—296.

Schellenberg, C., Die Brandpilze der Schweiz in Beitr. z. Kryptogamenflora der Schweiz. 1911.

Tafelerklärung.

Tafel III.

Die Figuren der Ust. macrospora wurden mit Hilfe der Leitz-Fluoritimmersion $^1/_{12}$ a und Zeichenokular 2, die der Ust. longissima mit Fluoritimmersion und Kompensationsokular 6 unter Benutzung des Abbeschen Zeichenapparates hergestellt.

Fig. 1—28. Ustilago longissima var. macrospora.

Fig. 1—2. Einwanderung des ersten Kernes in die Primärsporidie.

Fig. 3—7. Einwanderung des zweiten Kernes in die Primärsporidie. Der dritte Kern tritt in den Keimfortsatz.

Fig. 8. Abtrennung der Primärsporidie.

Fig. 9—10. Soeben abgeschnürte, zweikernige Primärsporidien.

Fig. 11—13. Ausbildung der Zellwand und Beginn der Sprossung der Primärsporidie.

Fig. 14—15. Kopulierende Primärsporidien, Ausbildung des Suchfadens.

Fig. 16. Keimfortsatz nach Abschnürung der Primärsporidie.

Fig. 17. Folgesporidie. Typisch ist die seitliche Insertion der Sporidie an dem Keimfortsatz.

Fig. 18. Kernvermehrung in der Brandspore bei Abschnürung der Primärsporidie.

Fig. 19—20. Kernvermehrung in der Brandspore nach Abschnürung der Primärsporidie.

Fig. 21. Kernvermehrung bei Keimung nach dem Violacea-Typus.

Fig. 22—23. Dreikernige Folgesporidien.

Fig. 24. Primärsporidie und zweite Sporidie. Die beiden Kerne der zweiten Sporidie vermutlich soeben durch Teilung entstanden.

Fig. 25. Kernauswanderung nach dem ersten Schritt der Reduktionsteilung.

Fig. 26. Zweiter Schritt der Reduktion in der Primärsporidie.

Fig. 27. Desgl. In der Spore noch ein weiterer, etwas undeutlicher Kern.

Fig. 28. Brandspore mit zwei Kernen in der Reduktion.

Fig. 29—39. Ustilago longissima.

Fig. 29—30. Erste Sporidie. Einwandern des ersten Kernes.

Fig. 31—33. Desgl. Einwandern des zweiten Kernes.

Fig. 34. Erste Sporidie soeben abgeschnürt.

Fig. 35—36. Spätere Sporidien.

Fig. 37—38. Mehrkernige spätere Sporidien im Auswachsen zu Fruchtträgern.

Fig. 39. Vierzelliger Fruchtträger. Kerne bereits in weiterer Vermehrung.

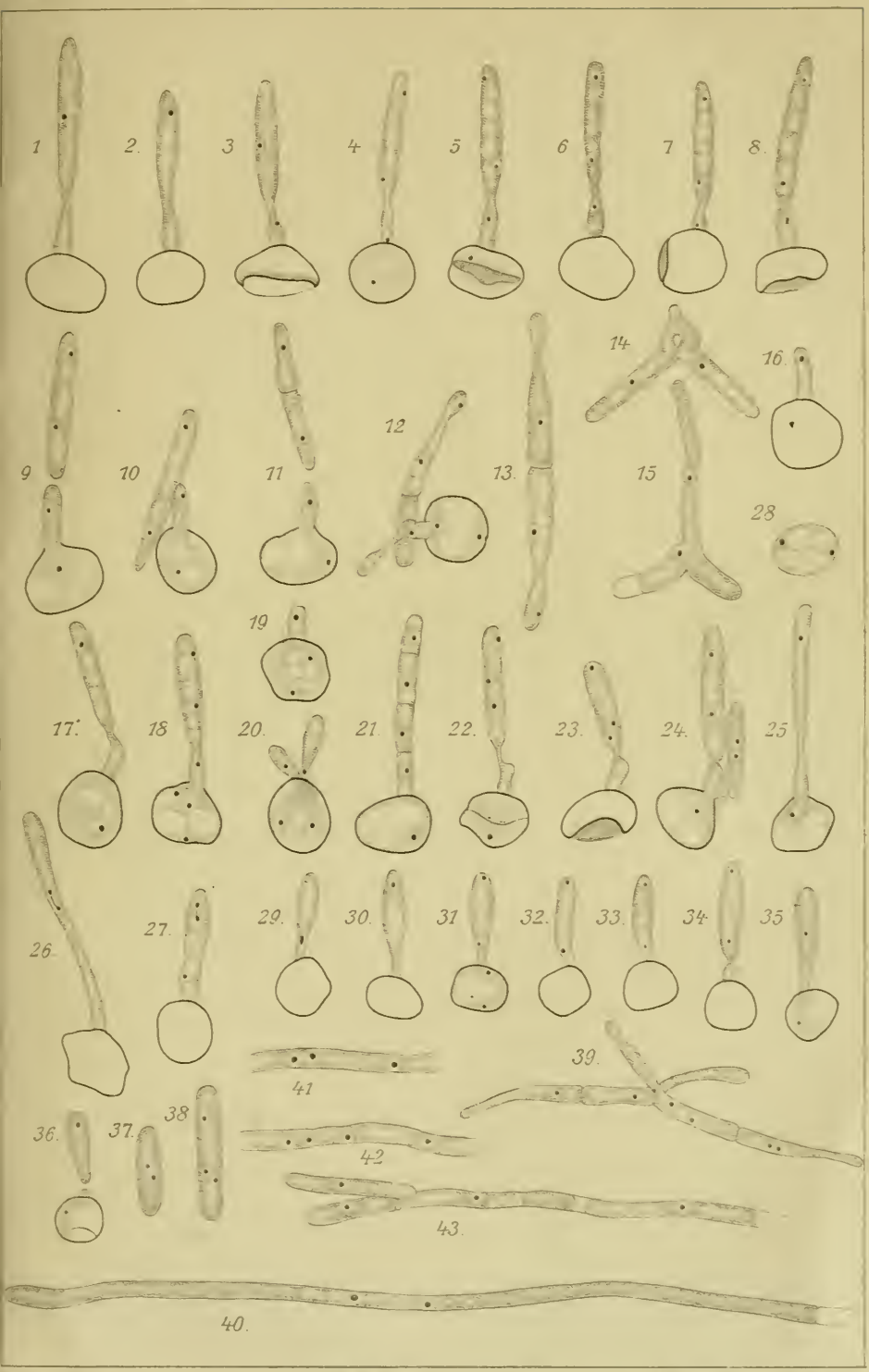
Fig. 40—43. Ust. longissima var. macrospora.

Fig. 40. Paarkerniger Suchfaden.

Fig. 41. Dreikerniger Suchfaden.

Fig. 42. Vierkerniger Suchfaden.

Fig. 43. Sporidienbildender Suchfaden. Aufspaltung in die Haplophase.


1
2.
3
4
5
6
7
8.
9
10
11
12
13.
14
15
16.
28
17.
18
19
20.
21.
22.
23.
24.
25
26.
27.
29.
30.
31
32.
33.
34
35
36.
37.
38
39.
40.
41
42
43.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Zeitschrift für Botanik

Jahr/Year: 1923

Band/Volume: 15

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

Artikel/Article: Über Ustilago Longissima und ihre Varietät Macrospora. 241-279