

Beiträge zur Biologie von *Diploceras hypericinum* (Ces.)

Autor(en): **Blumer, S.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **45 (1936)**

PDF erstellt am: **21.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-30319>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Beiträge zur Biologie von *Diploceras hypericinum* (Ces.).

Von S. Blumer.

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Bern.)

Eingegangen am 5. Februar 1936.

Im September 1932 fand ich oberhalb Sigriswil auf Stengeln von *Hypericum montanum* einen Pilz, der durch seine eigenartigen Sporen mit Anhängseln an beiden Enden sofort auffiel, und der nach diesen Merkmalen auch leicht bestimmt werden konnte. Es handelte sich um *Diploceras hypericinum* Ces., eine gut charakterisierte Melanconiacee aus der Gruppe der Phaeophragmiae. Der Pilz scheint bis jetzt selten gefunden worden zu sein, über seine Biologie ist überhaupt noch nichts bekannt. Es stellte sich in erster Linie die Frage, ob *Diploceras* auf die Gattung *Hypericum*, auf der dieser Pilz bis jetzt ausschliesslich gefunden wurde, spezialisiert ist. Im weiteren war es von Interesse, die Ernährungsphysiologie dieses in der Natur scheinbar ziemlich stark spezialisierten Pilzes zu untersuchen. Es wurden in den Jahren 1933 und 1934 zahlreiche Infektionsversuche ausgeführt, während 1935 hauptsächlich das kulturelle Verhalten studiert wurde.

Diese Untersuchungen konnten mit Hilfe eines Stipendiums durchgeführt werden, das mir der Vorstand der Stiftung zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung an der bernischen Hochschule gewährte und wofür ich hiermit meinen besten Dank ausspreche. Ferner danke ich Herrn Dr. O. Morgenthaler, Liebefeld, in dessen Institut diese Untersuchungen begonnen wurden, und besonders dem Direktor des Botanischen Institutes der Universität, Herrn Prof. Dr. Schopfer, für seine wertvollen Anregungen. Herr Obergärtner H. Schenk übernahm die Pflege meiner zahlreichen Versuchspflanzen, wofür ich ihm ebenfalls bestens danke.

1. Morphologie und Verbreitung des Pilzes.

Diploceras hypericinum bildet auf den Stengeln von *Hypericum*-Arten kleine, zuerst gelbliche, dann schwarze Flecken, die oft strichförmig verlängert sind. Die Infektionen sind nicht auffällig und können oft nur mit starker Lupenvergrößerung sicher festgestellt werden. Der Pilz ist wohl deshalb vielfach übersehen worden. Das Mycel verbreitet sich ausschliesslich in den äussersten, mehr oder weniger stark ver-

korkten Zellschichten. Lebende Zellen werden nach meinen Beobachtungen nicht befallen. Der Pilz ist also als Saprophyt zu betrachten.

Die Sporen (Konidien) entstehen in dichten Lagern, durch welche die Epidermis zuerst aufgewölbt und später meist aufgerissen wird. Die Sporophore sind dichtgedrängte, kurze Hyphen, die meist einem mehr oder weniger gut ausgebildeten stromatischen Geflecht entspringen

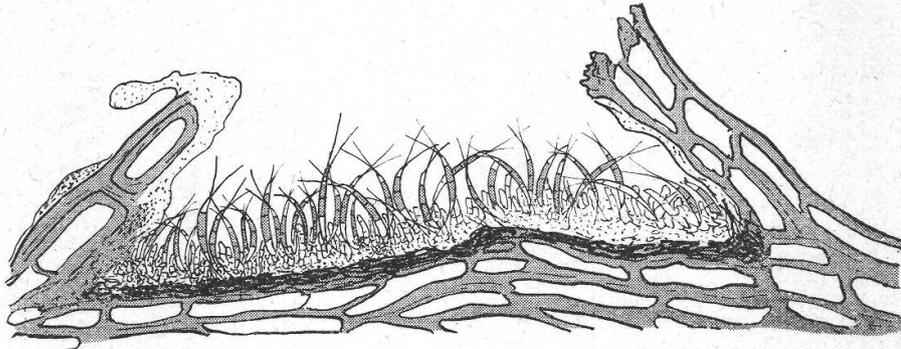


Fig. 1.

Lager von *Diploceras hypericinum* in einem Stengelquerschnitt von *Hypericum perforatum*. Aus einem Infektionsversuch. (Vergr. zirka 380.)

(Fig. 1). Die Sporen sind vierzellig, in der Grösse sehr variabel, 16 bis 24 μ lang, 3—6 μ breit. Sie sind meistens etwas gekrümmt, nicht selten sichelförmig gebogen. Die beiden mittleren Zellen sind etwas grösser als die äusseren und in reifen Sporen stets gebräunt, während die Endzellen hyalin bleiben. An jedem Ende der Spore entspringen zwei bis drei fadenförmige, hyaline Anhängsel (in der Literatur auch als Borsten oder Geisseln bezeichnet) von sehr verschiedener Länge. In Kulturen treten am Ende der Anhängsel gelegentlich kopfige Verdickungen auf. Seltener sind sie in der Mitte etwas angeschwollen. Die Anhängsel scheinen zur Hauptsache aus einer schleimartigen Substanz zu bestehen, die sich mit Jodjodkali schwach gelblich färbt. Ob diese Anhängsel durch einen Plasmastrang mit der Endzelle verbunden sind, konnte nicht sicher nachgewiesen werden. Dafür spricht die Tatsache, dass die Endzellen in reifen Zellen kein Plasma mehr führen und normalerweise keine Keimschläuche bilden. Sie scheinen sich in der Bildung der Anhängsel zu erschöpfen.

Auf Bierwürze und Malzagar wächst der Pilz gut, wenn auch nicht besonders schnell, und bildet die typischen Sporen aus. Dagegen konnte der Vorgang der Sporenbildung auf Agar nicht genau beobachtet werden, da bei den üblichen Fixierungs- und Färbemethoden die Anhängsel abfallen. Oft bilden sich unter der Oberfläche des Agars dichte Hyphenknäuel, die ungefähr den « Pseudopykniden » entsprechen, die Leininger (12) für *Pestalozzia* beschrieben hat. Es scheint, dass die Sporen in diesen Fällen nicht auf Sporenträgern, sondern durch Zerfall

der Hyphen entstehen können. Auf der Oberfläche des Agars erscheinen, oft in konzentrischer Anordnung, schwarze Sporenhaufen (Acervuli), in denen grosse Mengen von Sporen gebildet werden.

Bei der Kultur in Nährlösungen entstehen die Sporen entweder in dichten Knäueln, die makroskopisch als schwarze Punkte erkennbar sind (Fig. 2 A), oder an kurzen Seitenzweigen gewöhnlicher Hyphen

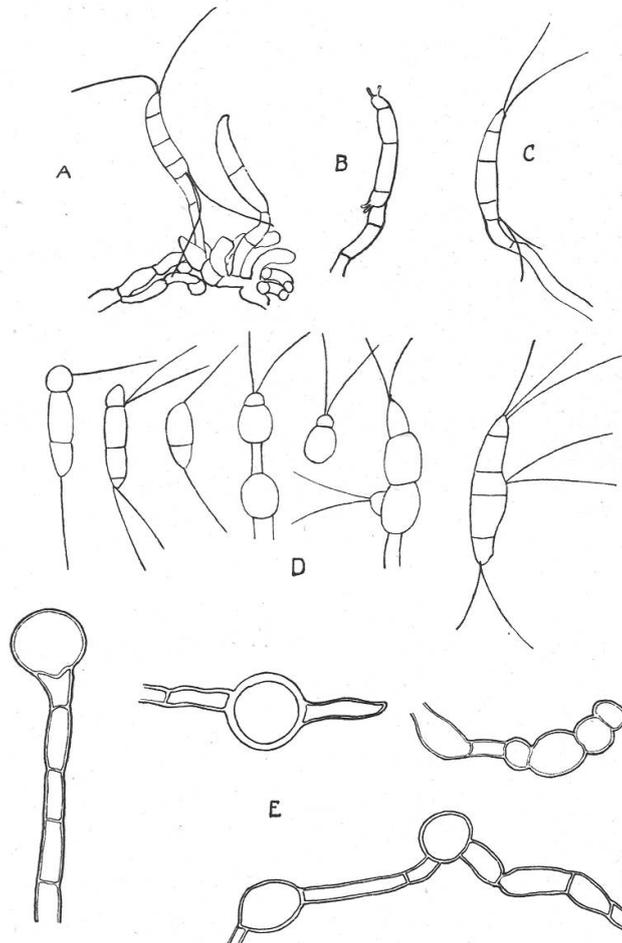


Fig. 2.

A. Sporenbildung am Rande eines Hyphenknäuels. — B. Junge Spore. — C. Normale Spore mit Träger. — D. Monströse Sporen. — E. Gemmen. (Vergr. zirka 560.)

(Fig. 2 B und C). Es ist nicht das Ziel dieser Arbeit, aus der grossen Mannigfaltigkeit in der Sporenbildung von *Diploceras* Rückschlüsse auf die Berechtigung des Saccardo'schen Systems der Fungi imperfecti zu ziehen. Dieses System gilt für Normalfälle und will übrigens kein natürliches System sein, sondern lediglich eine Möglichkeit zur Bestimmung geben.

Während auf *Hypericum*-Stengeln ausschliesslich, und auf Agar vorwiegend die beschriebenen *normalen Sporen* ausgebildet werden,

treten in flüssigen Medien Gebilde auf, die alle Übergänge von einfachen Mycelanschwellungen bis zur normalen Spore darstellen. Am Mycel bilden sich terminale oder interkalare Anschwellungen. Einzelne Glieder runden sich ab, ihre Wand wird verdickt und oft sehr stark gebräunt. Unter bestimmten Kulturbedingungen löst sich fast das gesamte Mycel in solche Gebilde auf, die in den folgenden Ausführungen als *Gemmen* bezeichnet werden (Fig. 2 E). Man könnte sie auch als Chlamydosporen auffassen. Diese Gemmen, die oft in dichten, harten, sclerotienartigen Lagern auftreten, sind nichts anderes als unvollkommene Sporenbildungen, bei denen die Einzelzellen ihre Selbständigkeit bewahrt haben. Die Grösse der Gemmen ist sehr variabel, ihr Durchmesser kann 5—20 μ betragen. Sie ertragen eine ziemlich starke Austrocknung und können nach Wiedereintritt günstiger Bedingungen wieder zu Mycelien auswachsen. Nicht selten sieht man Gemmen, die von benachbarten Zellen aus durchwachsen werden.

Die häufig auftretenden Übergänge zwischen Gemmen und normalen Sporen werden im folgenden als *monströse Sporen* bezeichnet. Sie unterscheiden sich von den Gemmen durch das Auftreten von Anhängseln, die aber sehr verschieden inseriert sein können (Fig. 2 D). Von den normalen Sporen unterscheiden sie sich hauptsächlich durch die lockere Verbindung der einzelnen Zellen. Die Form, Anordnung und Zahl der Einzelzellen ist sehr variabel. In seltenen Fällen kann es vorkommen, dass sich auf demselben Sporophor zwei oder mehr Sporen bilden, die sich nicht voneinander trennen. Es entstehen dann nicht nur an den beiden Enden, sondern auch in der Mitte der Spore Anhängsel (Fig. 2 D).

Die Keimung der Sporen erfolgt im hängenden Tropfen schon in Leitungswasser, doch bleiben die Keimschläuche kurz. Viel intensiver ist die Keimung in Zuckerlösungen oder in Dekokten von Pflanzen. Die beiden mittleren Zellen der Spore bilden oft mehrere Keimschläuche, die in allen Richtungen auswachsen. Unter Umständen treten sie auch zwischen Mittel- und Endzelle heraus, wodurch diese auf die Seite gedrängt oder ganz losgelöst werden.

Die jungen Hyphen sind dünn und hyalin mit ziemlich reichlicher Verzweigung, später werden sie braun, derbwandig und stark septiert. Unter bestimmten Bedingungen sind die Zellen des Mycels von Öltropfen erfüllt. In älteren Kulturen erfolgt oft eine starke Schleimabsonderung der Hyphen. Diese sind oft von einem körnigen Schleimantel umgeben, der so dick ist wie die Hyphe selbst.

Diploceras gehört nach der Sporenbildung und der Sporenform in die Verwandtschaft der Gattung *Pestalozzia*. Unser Pilz wurde vom ersten Entdecker, *Cesati*, deshalb auch in diese Gattung gestellt. *Allescher* (1) trennte nach dem Vorgange von *Saccardo* die Formen, deren Sporen an beiden Enden Anhängsel besitzen, als beson-

dere Gattung *Hyaloceras* ab. In dieser werden nach der Zahl der Anhängsel zwei Untergattungen aufgestellt, *Euhyaloceras* mit je einem Anhängsel und *Diploceras* mit mehr als einem Anhängsel. In diese letztere Gruppe wird unser Pilz als *Hyaloceras hypericinum* (Ces.) Sacc. gestellt.

Die dicke (4), der sich auf die Untersuchungen v. Hoehnels stützt, betrachtet *Hyaloceras* als synonym zu *Monochaetia*. Nach seiner Gruppierung wird die Gattung *Diploceras*, mit Anhängseln an beiden Enden der Sporen, den Gattungen *Hyaloceras* und *Pestalozzia* gegenübergestellt, bei denen die Sporen nur an einem Ende ein resp. mehrere Anhängsel tragen. Diese Trennung erscheint mir sicher berechtigt, da in dem von mir untersuchten Stamm von *Diploceras* nur in sehr seltenen Fällen Sporen auftraten, die nur an einem Ende Anhängsel trugen, ob- schon ja sonst in der Sporenform alle möglichen Abweichungen beobachtet wurden.

Clements und Shear (3) stellen die Gattung *Diploceras* zu den Hyalophragmiae der Melanconiales. Da jedoch die Mittelzellen der Sporen fast immer mehr oder weniger stark gebräunt sind, kann ich dieser Gruppierung nicht beipflichten, um so mehr als dadurch die Gattungen *Pestalozzia* und *Diploceras*, die morphologisch und kulturell weitgehend miteinander übereinstimmen, voneinander getrennt würden.

Die Gattung *Diploceras* besteht nur aus einer Art, *D. hypericinum*, die bis jetzt ausschliesslich auf *Hypericum*-Arten gefunden wurde. Bis jetzt sind mir aus der Literatur und aus Herbarien folgende Nährpflanzen bekannt geworden :

Hypericum perforatum L. aus Oberitalien (Cesati), Holland (Oudemans), Deutschland (Die dicke) und Schweden (leg. Eliasson, Herb. Bot. Inst. Bern).

H. quadrangulare auct. aus Deutschland (Die dicke).

H. humifusum L. aus Deutschland (Allescher), Holland (Oudemans).

H. Androsaemum L. aus der Schweiz (Montagny, 14. 9. 1908, leg. D. Cruchet, ex Herb. P. Cruchet).

H. montanum L. aus der Schweiz (Bergli bei Sigriswil, 25. 9. 1932, leg. S. Blumer). Mit Material von diesem Standort wurden sämtliche Infektionsversuche und Kulturen ausgeführt.

Diploceras hypericinum scheint also in ganz Europa auf verschiedenen *Hypericum*-Arten vorzukommen. Dagegen erscheint es mir nicht wahrscheinlich, dass der Pilz auf Pflanzen aus andern Gattungen übergeht, die auffälligen Sporen wären sicher schon beobachtet worden, auch wenn die Infektionen leicht übersehen werden können.

2. Infektionsversuche.

Als Versuchspflanzen dienten 27 verschiedene *Hypericum*-Arten, sowie zahlreiche Pflanzen aus andern Familien. Es wurden folgende Infektionsmethoden angewendet :

1. Überbrausen der Pflanzen mit Sporensuspensionen in Wasser.
2. Überbrausen der Pflanzen mit Sporensuspensionen in Nährlösungen (0,05 % Magnesiumsulfat, 0,15 % Monokaliumphosphat, 0,2 % Pepton, 0,5 % Maltose).
3. Auftragen von Sporensuspensionen in Wasser auf verletzte Stellen, die markiert wurden.
4. Befestigung von Agarstückchen mit dem wachsenden Pilz auf verletzten oder unverletzten Pflanzenteilen.

Im ganzen wurden im Laufe von zwei Jahren 12 Versuchsreihen ausgeführt. Es wurden dazu 341 Pflanzen der Gattung *Hypericum* und 84 Pflanzen aus andern Familien verwendet. Die Ergebnisse entsprechen leider nicht dem Aufwand an Zeit und Arbeit. Infektionen mit typischen Sporenlagern, aus denen der Pilz wieder isoliert werden konnte, erhielt ich auf folgenden Pflanzen :

<i>H. perforatum</i> L.	$\frac{1}{12}$ ¹	(Infektionsmethode 1).
<i>H. tetrapterum</i> Fr.	$\frac{2}{12}$	(Methoden 2 und 3).
<i>H. Kotschyianum</i> Boiss.	$\frac{1}{12}$	(Methode 2).
<i>H. Androsaemum</i> L.	$\frac{1}{15}$	(Methode 3).
<i>H. hircinum</i> L.	$\frac{1}{14}$	(Methode 3).
<i>H. Moserianum</i> Andr.	$\frac{1}{12}$	(Methode 4).

Von den auf *Hypericum*-Arten ausgeführten Versuchen hatten also nur etwa 2 % positiven Erfolg, während die Infektionsversuche auf andern Pflanzen ohne Ausnahme negativ verliefen. In allen Fällen wurden nur an den Stengeln, nie an Blättern Infektionen beobachtet. Die einzelnen Methoden, die angewendet wurden, scheinen ziemlich gleichwertig zu sein. Ob für das Zustandekommen einer Infektion eine Verwundung nötig ist, lässt sich nicht mit Sicherheit feststellen. Bei Anwendung der vierten Infektionsmethode erhielt ich in einigen Fällen eine schwache Entwicklung des Pilzes ohne Bildung der charakteristischen Lager. Die Prüfung dieser Fälle ergab, dass der Pilz sich nur entwickelte, wenn sich Bakterien im Agar angesiedelt hatten, die in dem darunter liegenden Wirtsgewebe eine lokale Fäulnis erzeugten. Auf diesen Faulstellen entwickelte sich das *Diploceras*-Mycel ähnlich wie auf sterilisierten Stengeln, ohne aber normale Sporen zu bilden.

¹ Der Nenner des Bruches bezeichnet die Zahl der mit dieser Pflanze ausgeführten Versuche. Der Zähler gibt an, wie viele dieser Versuche positiven Erfolg hatten.

Nach diesen Versuchen erscheint eine Spezialisierung des Pilzes innerhalb der Gattung *Hypericum* nicht sehr wahrscheinlich. Die in den Versuchen befallenen Arten gehören drei Sektionen der Gattung an. Den negativen Ergebnissen auf den verschiedenen Pflanzen aus andern Familien dürfen wir wohl angesichts des geringen Befalls von *Hypericum* selbst nicht allzu grosse Bedeutung beimessen. Da der Pilz aber auch in der Natur nur auf *Hypericum* gefunden wurde, so darf wohl angenommen werden, dass er auf diese Gattung spezialisiert ist.

Es rechtfertigt sich, in diesem Zusammenhange auf die Verhältnisse bei der nahe verwandten Gattung *Pestalozzia* hinzuweisen. La Rue (11) hat von *P. Guepini*, die als Erreger verschiedener Krankheiten zahlreicher tropischer Kulturpflanzen bekannt ist, eine grosse Zahl von Klonen isoliert, die sich durch Merkmale der Sporen und ihrer Anhängsel unterscheiden. Einige dieser Klone scheinen auf bestimmte Wirte beschränkt zu sein, während andererseits auf gewissen Nährpflanzen verschiedene Klone des Pilzes vorkommen. Über die Pathogenität der einzelnen Klone äussert sich La Rue nicht, doch scheint es nach der Literatur sicherzustehen, dass namentlich in den Tropen verschiedene *Pestalozzia*-Arten als primäre Erreger von Pflanzenkrankheiten in Frage kommen. G ä u m a n n (8) hat eine *Pestalozzia* aus der *funerea*-Gruppe als Erreger einer bösartig verlaufenden Krankheit des Wurzelhalses junger Nussbäume festgestellt, wobei allerdings ungünstige Bodenverhältnisse die Disposition für den Befall schaffen. Mit Rassen aus derselben Artengruppe, die die bekannten Einschnürungskrankheiten der Koniferen verursachen sollen, führte C. M. D o y e r (6) zahlreiche Infektionsversuche aus, die jedoch ausnahmslos negativ verliefen. Sie betrachtet deshalb die Arten der Gattung *Pestalozzia* als Saprophyten, die im Krankheitsverlauf erst sekundär auftreten. Nach den bisherigen Untersuchungen muss man aber wohl annehmen, dass innerhalb der meisten Arten parasitische und saprophytische Rassen vorkommen. Meine Versuche mit *Diploceras hypericinum* zeigen, dass diese Art eigentlich als Saprophyt gelten muss, dagegen zeigen sich in der deutlichen Spezialisierung auf die Gattung *Hypericum* Anklänge an das Verhalten parasitischer Pilze.

3. Kultur auf festen Substraten.

Es sollte in diesen Versuchen festgestellt werden, ob die durch die Infektionsversuche wahrscheinlich gemachte Spezialisierung auf die Gattung *Hypericum* sich auch auf sterilisierten Pflanzenteilen zeigt. Stengel und Zweigstücke von *Hypericum* (verschiedene Arten), *Rosa*, *Pirus communis*, frisch geerntete Roggenhalme und altes Roggenstroh wurden in Petrischalen, die mit Filtrierpapier ausgekleidet und mit destilliertem Wasser befeuchtet wurden, im Autoklaven sterilisiert. Auch Scheiben

von gewöhnlichem Flaschenkork wurden auf diese Weise behandelt und mit dem Pilz beimpft.

Auf sterilisierten *Hypericum*stengeln zeigte sich ein sehr gutes Wachstum mit etwas weisslichem Luftmycel und reichlicher Sporenbildung. Eigentliche stromatische Lager, wie sie bei der Infektion lebender Pflanzen vorkommen, entstanden nie. Von den infizierten Stengeln wucherte der Pilz auch auf das Filtrierpapier über, das von den aus den Stengeln heraus diffundierenden Stoffen durchtränkt war. Gutes Wachstum mit Bildung von Pseudopykniden (nach *Leininger*) zeigte sich auch auf Rosen- und Birnbaumzweigen, sowie auf Roggenhalmen. Auf sterilisiertem Roggenstroh war das Wachstum bedeutend schwächer. Es schien, dass der Pilz nur da in die Halme eintreten konnte, wo die Epidermis durch Uredolager von *Puccinia graminis* aufgerissen war. *Diploderas* breitete sich besonders in diesen Rostlagern aus und bildete spärlich normale Sporen. Bemerkenswert ist ferner das ziemlich gute Wachstum auf Kork. Auch hier wurden reichlich Sporen gebildet, dagegen fand ich nie stromatische Lager.

Diese Versuche zeigen also, dass die Spezialisierung des Pilzes auf sterilisierten Pflanzenteilen aufgehoben ist. Dies beruht wohl darauf, dass durch die Sterilisation die Gewebe so aufgeweicht wurden, dass die Hyphen ohne weiteres eintreten konnten. Möglicherweise wurden durch die Sterilisation auch bestimmte Nahrungsstoffe für den Pilz aufgeschlossen. Das relativ gute Gedeihen auf sterilisiertem Kork ist sehr bezeichnend, da der Pilz in der Natur fast ausschliesslich in den ziemlich stark verkorkten Rindenzellen vorkommt. Dies beweist, dass er offenbar die im Kork vorhandenen Gerbstoffe aufzuschliessen und auszunützen vermag.

4. Kultur in Nährlösungen.

a) Kohlenstoffquellen.

Der Pilz wurde in einer möglichst einfachen Nährlösung kultiviert, die als Grundbestandteile 0,05% $MgSO_4$ und 0,15% KH_2PO_4 enthielt. Als Stickstoffquelle wurde entweder 0,15% Asparagin oder 0,2% Pepton für bakteriologische Zwecke (Merck) beigelegt. Für die in Tabelle 1 zusammengestellten Versuche wurden die Kohlehydrate in der Konzentration von 1% beigegeben, während in spätern Versuchen nur noch 0,5% beigelegt wurden. Für den ersten Versuch mit Asparagin als N-Quelle wurde eine Nährlösung von der erwähnten Zusammensetzung; ohne Pufferung verwendet, die durch Zugabe von 0,1 n Natronlauge auf das Anfangs-pH von 6,4 eingestellt wurde. Dauer des Versuches 37 Tage. In der Reihe mit Pepton als N-Quelle wurde eine Phosphatpufferlösung nach *Clark* (vgl. *Dorner*, 5) mit Zugaben von Magnesiumsulfat und Pepton verwendet. Anfangs-pH = 6,4. Dauer des Versuches 26 Tage.

Tabelle 1.
Wachstum mit verschiedenen Kohlenstoffquellen.

C-Quelle	N-Quelle		Pepton in gepufferter Lösung pH 6,4			Sporenform ²
	Asparagin in ungepufferter Lösung pH 6,4		pH nach 26 Tagen	Trockengewicht des Mycels	NH ₃ ¹	
	pH nach 37 Tagen	Titrierbare Säure 0,1 NaOH auf 10 ccm Lösung		mg		
Glyzerin	7,2	0,2	6,4	43,2	+	G., MSp., NSp.
Xylose	4,6	1,45	6,1	69,4	—	G.
Arabinose	6,0	1,1	6,2	61,2	?	G. selten MSp.
Rhamnose	6,1	1,1	6,3	17,2	+	G., MSp., NSp.
Sorbit	6,8	0,65	6,2	66,4	—	G.
Mannit	6,6	0,85	6,2	53,4	?	G.
Laevulose	5,9	1,25	6,1	126,8	—	G.
Glukose	5,6	1,35	5,6	110,8	—	G.
Mannose	5,4	1,35	5,8	87,2	—	G.
Galaktose	5,7	1,3	6,2	111,5	—	G.
Saccharose	6,1	1,15	5,8	94,6	—	G.
Maltose	5,5	1,3	5,8	110,0	—	G.
Laktose	7,1	0,5	6,5	37,4	++	G., MSp., NSp.
Raffinose	6,2	1,05	6,1	79,2	—	G.
Inulin	7,4	0,35	6,5	17,8	++	G., MSp., NSp.
Dextrin	5,4	1,5	6,2	103,0	—	G.
Stärke	5,9	1,3	6,0	127,0	—	G., MSp., NSp.
Salicin	5,0	1,45	5,9	41,4	—	G.
Cellobiose	5,9	1,2	6,3	104,2	+	G., MSp., NSp.
Ohne C	6,3	1,0	6,5	12,8	++	NSp., MSp.

¹ Nachweis durch Nesslerisches Reagens.
² G. = Gemmen, MSp. = monströse Sporen, NSp. = normale Sporen (vgl. Fig. 2).

Aus dem Trockengewicht des gebildeten Mycels ist ersichtlich, dass Stärke, Laevulose, Galaktose, Glukose, Maltose, Cellobiose und Dextrin als gute Kohlenstoffquellen bezeichnet werden dürfen. Mittelmässiges Wachstum erfolgte auf Saccharose, Raffinose, Mannose, Xylose, Sorbit, Arabinose und Mannit. Geringes Wachstum ergab sich auf Glyzerin, Salicin, Laktose, Rhamnose und Inulin.

In den meisten Kulturen bildete sich ziemlich reichlich Säure, was sowohl im Absinken der pH-Werte, als auch in der Zunahme der titrierbaren Säure zum Ausdruck kommt. In ungepufferten Nährlösungen besteht ein ziemlich guter Parallelismus zwischen der potentiellen Azidität und dem Wachstum des Pilzes, so dass man innerhalb bestimmter Grenzen die Menge der gebildeten Säure als Maßstab für das Gedeihen der Kultur benützen könnte. Wenn diese Übereinstimmung in Tab. 1 nicht überall zum Ausdruck kommt, so ist hier darauf hinzuweisen, dass es sich um zwei Versuche mit verschiedenen Stickstoffquellen handelt.

Es geht aus den Tabellen 1, 3 und 5 hervor, dass *Diploceras* auch in Lösungen ohne Zusatz besonderer Kohlenstoffverbindungen einigermaßen gedeiht. In diesen Fällen ist es klar, dass sowohl Pepton als Asparagin nicht nur als Stickstoff-, sondern auch als Kohlenstoffquellen in Betracht kommen. Dies wurde schon 1899 von Klebs (10 b) an *Saprolegnia mixta* festgestellt. Der Abbau der Aminosäuren muss in diesen Fällen naturgemäss rascher vor sich gehen, als wenn diese nur als N-Quellen dienen, und es müssen sich die Abbauprodukte auch stärker geltend machen. Aus diesem Grunde ist die Ammoniakbildung, die in allen Kulturen ohne besondere C-Quelle auftrat, ohne weiteres verständlich. Wenn Ammoniakbildung auch in den Kulturen mit Glycerin, Laktose und Inulin auftrat, so ist wohl anzunehmen, dass der Pilz diese Stoffe nicht oder nur teilweise zu verwerten vermag und deshalb seinen Kohlenstoff aus den Aminosäuren bezieht. Auch die relativ geringen Mycelgewichte sprechen dafür, dass die Ernährung des Pilzes mangelhaft ist. Dies trifft indessen für den Versuch mit Cellobiose nicht zu. Hier bildete sich in der Kulturlösung Ammoniak, obschon das Wachstum des Pilzes sehr gut war, was schon im hohen Mycelgewicht zum Ausdruck kommt.

b) Stickstoffquellen.

Die in Tab. 2 angeführten Daten beziehen sich auf einen Versuch mit einer gepufferten Nährlösung nach Clark, Anfangs-pH = 6,4. Als Kohlenstoffquelle wurde 0,5% Maltose beigefügt. Dauer des Versuches : 26 Tage.

Tabelle 2.
Versuch mit verschiedenen Stickstoffquellen.

N-Quelle 0,2%	pH am Ende des Versuches	Trockengewicht des Mycels mg	Sporenbildung
Asparagin	6,4	9,2	G., MSp., NSp.
Ammoniumsulfat	6,4	1,4	G., MSp.
Ammoniumnitrat	6,4	2,0	G., MSp.
Ammoniumtartrat	6,4	2,0	G., MSp.
Ammoniumzitrat	5,7	3,8	G.
Kaliumnitrat	6,3	4,0	G., MSp.
Pepton für bakt Zwecke . .	6,1	119,8	G.
Pepton Witte	6,1	45,6	G.
Kontrolle ohne N	6,4	3,8	G., MSp., NSp.

Derselbe Versuch, aber mit Glukose, resp. Salicin als C-Quelle, hatte früher übereinstimmende Ergebnisse gebracht, doch waren damals die Mycelgewichte nicht bestimmt worden. Es zeigt sich, dass alle verwen-

deten Ammoniumverbindungen für den Pilz ungeeignete Stickstoffquellen darstellen. Einzelne, wie z. B. Ammoniumsulfat, -Nitrat und -Tartrat scheinen sogar eine hemmende Wirkung auszuüben. Auch Asparagin ist im Vergleich zu Pepton eine ungeeignete Stickstoffquelle. Bemerkenswert ist in diesem Versuch der Unterschied im Mycelgewicht in den Lösungen mit Pepton für bakteriologische Zwecke und Pepton Witte, das kein Tryptophan enthält. Weitere Untersuchungen über die Bedeutung verschiedener Aminosäuren und Peptone für die Stickstoffversorgung von *Diploceras* sind im Gange.

c) Wasserstoffionenkonzentration.

Versuche mit gepufferten Nährlösungen (Phthalat- und Phosphatpuffer nach Clark) mit Pepton und Maltose im Bereiche von pH 2,2 bis pH 8,0 zeigten ein ziemlich deutliches Optimum des Wachstums bei pH 6,4. Auf der sauren Seite war die Abnahme ziemlich regelmässig bis pH 3,6, wo noch eine Spur von Wachstum festzustellen war. Auf der alkalischen Seite war die Abnahme etwas weniger regelmässig. Bei pH 7,0 war das Wachstum noch ziemlich gut, erst bei pH 8,0 ist eine starke Abnahme bemerkbar.

Es wurde schon erwähnt, dass der Pilz bei Anwesenheit zusagender Kohlehydrate reichlich Säure bildet. Wenn diese fehlen, bildet sich durch den Abbau der Aminosäuren Ammoniak. Beide Vorgänge sind

Tabelle 3.
Säure- und Ammoniakbildung in ungepufferten Nährlösungen.

C-Quelle 1%	N-Quelle	Wachstum	Aktuelle Azidität		Potentielle Azidität 0,1 n NaOH resp. HCl auf 10 ccm Lösung
			Beginn des Versuchs	nach 30 Tagen	
Glyzerin .	Asparagin	+	6,0	6,0	ccm 0,15 NaOH
	Pepton	+++	6,0	6,5	0,4 HCl
Xylose . .	Asparagin	+	6,0	5,5	0,25 NaOH
	Pepton	+	6,0	4,9	0,3 NaOH
Glukose .	Asparagin	+	6,0	5,8	0,25 NaOH
	Pepton	+++	6,0	3,9	0,85 NaOH
Maltose .	Asparagin	+	6,0	—	—
	Pepton	+++	6,0	3,1	1,4 NaOH
Laktose .	Asparagin	+	6,0	5,9	0,1 NaOH
	Pepton	++	6,0	6,5	0,35 HCl
Inulin . .	Asparagin	+	6,0	6,9	0,55 HCl
	Pepton	++	6,0	7,0	0,6 HCl
Salicin . .	Asparagin	+	6,0	5,2	0,4 NaOH
	Pepton	+++	6,0	3,4	0,7 NaOH
Ohne C . .	Asparagin	+	6,0	7,0	0,7 HCl
	Pepton	+	6,0	7,0	0,6 HCl

um so intensiver, je besser der Pilz wächst. So geht z. B. aus Tab. 3 hervor, dass in Lösungen mit Pepton überall mehr Säure, beziehungsweise mehr Ammoniak gebildet wird als in solchen mit Asparagin als Stickstoffquelle. Auch die Schwankungen in der Wasserstoffionenkonzentration sind mit Pepton entsprechend grösser. Diese Prozesse führen in ungepufferten Lösungen schliesslich dazu, dass das Wachstum wegen der ungünstigen Wasserstoffionenkonzentration überhaupt sistiert wird, so z. B. mit Maltose und Salicin (Tab. 3).

Die Säure- und Ammoniakbildung führte aber auch in den gepufferten Lösungen, besonders in den Phosphatpuffern, zu unliebsamen Störungen des pH. Tabelle 4 zeigt, dass die Verschiebungen zwar in beiden Richtungen geringer sind, doch können sie bei gutem Wachstum des Pilzes (Glukose) immerhin noch bis 0,7 pH-Einheiten ausmachen. Die Tabelle zeigt ferner, dass bei Verwendung von Kohlehydraten, die ein gutes Wachstum des Pilzes ermöglichen, ein deutliches Maximum des Mycelgewichtes bei Lösungen mit einem Anfangs-pH von 6,4 besteht (Glukose und Maltose). Ist jedoch die Kohlenstoffquelle für den Pilz ungenügend, wie bei Glyzerin und Inulin, so zeigt sich im Mycelgewicht kein ausgeprägtes Maximum.

Tabelle 4.

Veränderung des pH und Mycelgewicht in Phosphatpufferlösungen mit Pepton.

C-Quelle	pH zu Beginn des Versuches											
	6,2		6,4		6,6		6,8		7,0		7,2	
	pH und Mycelgewicht in mg nach 26 Tagen											
Glukose	5,5	97,6	5,85	134,6	6,2	119,2	6,45	112,6	6,7	97,4	6,85	61,2
Maltose	6,2	99,0	5,8	114,0	6,4	83,0	6,6	95,4	6,7	86,2	6,9	62,2
Salicin	5,7	42,6	6,1	38,8	6,4	53,8	6,6	45,2	6,9	41,0	7,0	28,2
Glyzerin	6,5	42,0	6,6	39,0	6,8	36,0	6,95	43,2	—	—	7,4	32,8
Inulin	6,6	21,6	6,7	20,2	6,8	20,4	7,0	21,2	7,2	20,8	7,4	23,4

d) Sporenbildung.

Bei gutem Wachstum treten in flüssigen Medien meist ausschliesslich Gemmen auf. Monströse und normale Sporen entstehen, wenn das vegetative Wachstum gehemmt wird. Eine Ausnahme von dieser Regel bilden, wie aus Tab. 1 hervorgeht, nur die Kulturen mit Stärke und Cellobiose als Kohlenstoffquelle, wo auch bei gutem vegetativen Wachstum Sporen gebildet wurden. Tab. 2 zeigt, dass auch bei ungenügender Stickstoffversorgung überall Sporen gebildet werden.

Es bestehen ferner gewisse, im einzelnen noch nicht geklärte Parallelen zwischen pH der Kulturlösung und Sporulation. Sporenbildung trat in allen Versuchen regelmässig ein, wenn das pH der Lösung nach der

alkalischen Seite hin verschoben wurde, also bei Ammoniakbildung. Da diese nur dann stark auftritt, wenn der Pilz in Ermangelung einer zureichenden Kohlenstoffquelle den Kohlenstoff der Aminosäuren verwertet, sind alle diese Fälle auch durch schwaches Wachstum des Pilzes charakterisiert. Schwaches Wachstum erfolgt aber auch bei sehr hoher Wasserstoffionenkonzentration (pH 3—4), doch tritt dann nie Sporenbildung ein. Bei starker Säurebildung bildet der Pilz auch bei geringem vegetativen Wachstum keine Sporen.

Um die Frage zu prüfen, ob die Sporenbildung durch geringe Wasserstoffionenkonzentration oder durch besondere stoffliche Einwirkung des Ammoniaks ausgelöst wird, wurde der in Tab. 4 zusammengefasste Versuch ausgeführt. Er bestätigt zunächst einmal die Ergebnisse zahlreicher früherer Versuche, indem auch hier auf Glukose, Maltose und Salicin Säure gebildet und damit auch die Wasserstoffionenkonzentration erhöht wurde. Das Gegenteil war bei Zugabe von Glycerin und Inulin der Fall. Sporen wurden nun ausschliesslich auf Glycerin und Inulin gebildet. Eine Herabsetzung der Wasserstoffionenkonzentration bis zu einem Anfangs-pH von 7,2 vermochte also auf Glukose, Maltose und Salicin noch nicht Sporenbildung auszulösen, während dies auf Glycerin und Inulin schon bei einem Anfangs-pH von 6,2 regelmässig der Fall war. Ob bei noch stärkerer Herabsetzung der Wasserstoffionenkonzentration auch auf Glukose, Maltose und Salicin Sporenbildung erfolgen würde, wurde nicht systematisch untersucht. Einzelne Beobachtungen bei den Versuchen zur Feststellung des optimalen pH sprechen gegen diese Annahme. In diesen Versuchen, die mit Maltose ausgeführt wurden, bildeten sich auch in den Grenzbezirken des Wachstums auf der alkalischen Seite (Anfangs-pH 8—9) nie normale Sporen. Die Annahme, dass die Sporulation direkt mit der Ammoniakbildung zusammenhängt, erscheint mir deshalb wahrscheinlicher. Sie wird auch durch die in Tab. 1 zusammengestellten Ergebnisse bestätigt. Auch hier trat mit einer einzigen Ausnahme Sporenbildung nur da auf, wo die Nesslerische Ammoniakprobe positiv ausfiel. Diese Ausnahme betrifft die Stärke, auf der die Kulturen überhaupt ein ganz abweichendes Aussehen hatten. Die Annahme, dass die Sporulation durch stoffliche Einwirkung gewisser C-Quellen, wie Glycerin, Laktose und Inulin bedingt werde, braucht wohl kaum in Erwägung gezogen zu werden, da auch in Kontrollversuchen ohne Zusatz von Kohlehydraten reichlich Sporen gebildet wurden (Tab. 1).

*e) Wirkung von pflanzlichen Dialysaten und Dekokten
auf das Wachstum des Pilzes.*

Um die Frage zu untersuchen, ob im Stengel von *Hypericum* oder in andern Pflanzen irgendwelche Stoffe vorhanden sind, die das Wachstum des Pilzes fördern, wurden einige Versuche mit Dialysaten und De-

kokten ausgeführt. Die Dialysate wurden folgendermassen hergestellt: Einige unverletzte Stengelstücke oder Blätter wurden für 12—16 Stunden in destilliertes Wasser eingelegt und bei 2—4° gehalten. Dann wurde die Flüssigkeit abgegossen, filtriert und den Kulturlösungen zugefügt, worauf im Autoklav sterilisiert wurde. Diese Dialysate enthielten keine direkt reduzierenden Substanzen. Nach Hydrolyse waren nur ganz minime Spuren reduzierender Substanzen, die auch bei Verwendung von 100 ccm Dialysat nicht quantitativ erfasst werden konnten, nachzuweisen. Der Trockenrückstand betrug 3—6 mg in 50 ccm Dialysat. Er ist in Wasser löslich, aber nicht in Äther und Azeton. Nach der negativ ausgefallenen Ninhydrinprobe enthält er keinen Aminostickstoff.

Zugabe von 1 ccm Hypericumdialysat (ca. 0,12 mg) zu 50 ccm einer für den Pilz ungünstigen Nährlösung bewirkten eine deutliche Förderung des Wachstums. Es gelang mit Zusatz von Dialysaten, den Pilz auch in Nährlösungen zu kultivieren, die den Stickstoff in Form von Ammoniumsalzen enthielten, während dies, wie Tab. 2 zeigt, ohne Dialysat nicht gelang. Auch bei Verwendung von Kaliumnitrat und Asparagin zeigte das Dialysat eine deutlich fördernde Wirkung. Diese Ergebnisse scheinen darauf hinzuweisen, dass in den Dialysaten trotz des negativen Ausfalls der Ninhydrinprobe gewisse stickstoffhaltige Substanzen vorhanden sind.

Im Hinblick auf die Spezialisierung des Pilzes wurde ferner untersucht, ob das *Hypericum*-Dialysat eine spezifische Wirkung auf das Wachstum des Pilzes ausübt. Es zeigt sich aber, dass in der Wirkung der Dialysate verschiedenster Herkunft keine deutlichen Unterschiede festzustellen sind. So wirkten z. B. Dialysate von *Rosa rugosa* und *Papaver Rhoeas* stärker fördernd als solche von *Hypericum*, was sich auch in stärkerer Säurebildung durch den Pilz äusserte. Es ergeben sich also aus diesen Versuchen keinerlei Anhaltspunkte für das Vorkommen spezifischer, wachstumsfördernder Stoffe in *Hypericum*-Stengeln und -Blättern, die die bestehende Spezialisierung erklären könnten.

Viel stärker wachstumsfördernd wirkten naturgemäss die Dekokte, d. h. die filtrierten Abkochungen von Blättern und Zweigen verschiedener Pflanzen, die auch ohne Zugabe besonderer Stoffe für sich allein eine genügende Nährlösung darstellten. Auch hier war keine spezifische Wirkung des *Hypericum*-Dekoktes festzustellen.

5. Glukoside als Kohlenstoffquellen.

Es geht schon aus Tab. 1 hervor, dass *Diploceras* mit Salicin als C-Quelle ziemlich gut gedeiht. Dabei ist zu bemerken, dass in den ersten Tagen das Wachstum auf Salicin sogar bedeutend besser ist als z. B. auf Glukose. Es lag nun nahe, zu untersuchen, wie sich der Pilz auf andern Glukosiden und verwandten Stoffen verhält. Diese Substanzen stellen

bekanntlich entweder Reservestoffe oder Exkrete der Pflanzen dar und kommen besonders in den Geweben der Rinde vor, also in denselben Zellen, aus denen auch *Diploceras* die Stoffe zu seinem Aufbau bezieht.

Tab. 5 zeigt, dass ausser Salicin auch Phloridzin, Aesculin, β -Methylglukosid, Tannin und Arbutin als vollwertige Kohlenstoffquellen zu betrachten sind. Die hohen Mycelgewichte, die mit Phloridzin erhalten wurden, sind allerdings mit etwelcher Reserve zu betrachten. Es scheint mir nicht ausgeschlossen, dass dieser Stoff irgendwie mit einer stickstoffhaltigen Substanz verunreinigt war. Anders lässt sich das abnorm hohe Mycelgewicht mit Asparagin als Stickstoffquelle kaum erklären.

Tabelle 5.

Mycelgewichte auf Glukosiden nach 30 Tagen in Phosphatpufferlösungen Anfangs-pH 6,4.

Kohlenstoffquelle	Mycelgewicht in mg	
	Pepton 0,2 %	Asparagin 0,15 %
Ohne C	23,0	5
Glukose 0,5 %	145,2	29,2
Salicin 0,5 %	58,5	8,4
α -Methylglukosid 0,5 %	42,8	9,5
β -Methylglukosid 0,5 %	120,4	12,6
Amygdalin 0,5 %	12,4	3
Arbutin 0,5 %	88,2	20,2
Aesculin 0,5 %	133,8	22,8
Phloridzin 0,5 %	155,6	163,0
Saponin 0,5 %	44,8	19,4
Digitalin 0,5 %	0	0
Tannin 0,5 %	110,6	55,8
Tannin 1 %	0	0
Tannin 2 %	0	0

In den ersten 14 Tagen des Versuchs wuchs der Pilz auf β -Methylglukosid, Salicin, Aesculin und Arbutin am besten, während sich auf Glukose und Phloridzin eine etwas langsamere, aber gleichmässiger Entwicklung zeigte. Auch auf Amygdalin war in den ersten Tagen gutes Wachstum festzustellen. Wahrscheinlich wurde die weitere Entwicklung durch die entstandenen Spaltungsprodukte gehemmt. Dass eine Spaltung stattfand, zeigte schon der auffällige Geruch nach Benzaldehyd. Es ist wohl als sicher anzunehmen, dass der Pilz auch auf Salicin und Arbutin durch die aus der enzymatischen Spaltung resultierenden Aglukone in seiner Entwicklung gehemmt wurde. Mit Tannin 0,5 % zeigt sich umgekehrt eher in den ersten Tagen eine Hemmung, während später das Wachstum sehr gut war. Die Lösungen mit Salicin, Arbutin, Aesculin und Tannin wurden mit der Zeit wohl durch die Wirkung oxydierender

Enzyme dunkel gefärbt und trübe. Auf Phloridzin entstand eine leuchtend rote, später rotbraune Färbung.

Die Wuchsform des Pilzes zeigte sozusagen auf jedem Glukosid einen andern Aspekt. Auf Salicin, Aesculin, Arbutin und Tannin bildeten sich mehr oder weniger kompakte braune Decken, oft mit einem Anflug von Luftmycel. Auf β -Methylglukosid entstanden stark gefärbte Gemmen, die auf dem hellen Mycel braune Streifen bildeten. Auf Phloridzin bildete sich eine kompakte Mycelmasse, ähnlich wie auf Agar, aber ohne Sporen. In Salicin, Arbutin und Aesculin erfolgte starke Schleimbildung.

Der Wert der Glukoside als C-Quellen für *Diploceras* ist also sehr ungleich, doch ist hervorzuheben, dass eine relativ grosse Zahl dieser Stoffe als vollwertige Kohlenstoffquellen betrachtet werden kann. Schon früher wurde nachgewiesen, dass *Diploceras* auch auf Kork einigermassen gedeiht. Wir dürfen diese beiden Tatsachen wohl dahin deuten, dass dieser Pilz für das Leben auf verkorkten Rindenzellen, die reich an Glukosiden und Gerbstoffen sind, vorzüglich angepasst ist.

Dass einzelne Glukoside gute Nahrungsstoffe für Pilze darstellen, ist schon mehrfach festgestellt worden. So hat Klebs (10 b) nachgewiesen, dass Coniferin für *Saprolegnia mixta* eine der besten C-Quellen ist, während Aesculin, Salicin, Saponin, Arbutin und Phloridzin für diesen Pilz weniger günstig waren. Für *Sporodinia* dagegen wirkt Aesculin mit Rohrzucker oder Pepton zusammen am günstigsten (Klebs, 10 a). Andererseits stellte Brunstein (2) fest, dass kein Glukosid für die von ihm untersuchten Pilze einen vollwertigen Nährstoff darstellte. Vielleicht ist dies zum Teil durch seine Versuchsanordnung bedingt.

Wenn ein Pilz ein bestimmtes Glukosid nicht auszunützen vermag, so kann dies einmal dadurch bedingt sein, dass ihm die entsprechenden Enzyme zur Spaltung fehlen. Es kann aber, wie in unserem Falle, auf Amygdalin eine teilweise Spaltung erfolgen, aber die entstehenden Aglukone können auf die weitere Entwicklung des Pilzes hemmend einwirken. Es dürfen deshalb die Ergebnisse aus Kulturversuchen mit reinen Lösungen nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse in der Natur übertragen werden. In der Natur lebt der Pilz in einem Gemisch aller möglicher Substanzen. Es ist klar, dass dann die Wirkung seiner Enzyme nicht dieselbe ist wie in einseitig zusammengesetzten Lösungen. So hat Josephson (9) nachgewiesen, dass die enzymatische Spaltung des Salicins nicht nur durch das aus der Spaltung resultierende Saligenin, sondern auch durch zahlreiche andere Stoffe, z. B. durch Zusatz von Glukose, mehr oder weniger gehemmt wird.

Um einige Anhaltspunkte zu gewinnen, wie sich der Pilz gegenüber Glukosiden verhält, wenn gleichzeitig auch Glukose in der Nährlösung vorhanden ist, wurde der folgende Versuch eingeleitet: Es wurden drei Reihen von Erlenmeyerkolben mit je 100 ccm einer gepufferten Pepton-

lösung (pH 6,4) angesetzt. Die erste Reihe enthielt als C-Quelle 1% Salicin, die zweite Reihe 1% Salicin plus 1% Glukose und die dritte 1% Glukose. Jede Reihe bestand aus 17 Kolben. Jeden zweiten oder dritten Tag wurde der Inhalt eines Kolbens auf reduzierende Zucker als Glukose berechnet (Methode Bertrand) und qualitativ auf Saligenin (Methode Jorissen) untersucht. Einer quantitativen Bestim-

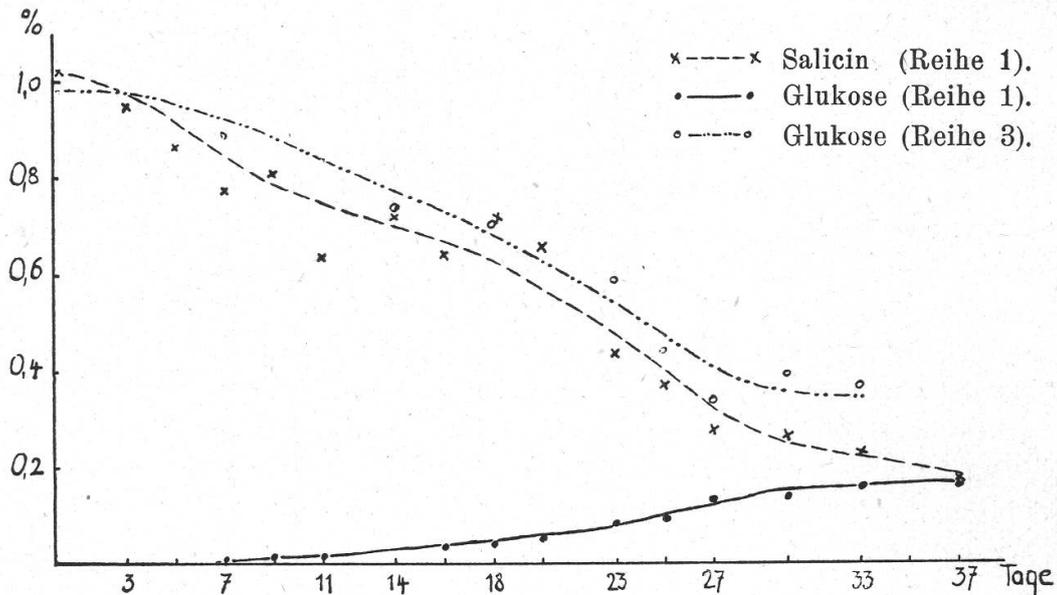


Fig. 3.

Glukose- und Salicingehalt der Kulturlösung in Reihe 1 (1% Salicin) und in Reihe 3 (1% Glukose).

mung des Saligenins, die eigentlich absolut nötig wäre, stellten sich verschiedene Hindernisse entgegen. Schon Brunstein (2) hat nachgewiesen, dass bei der Salicinspaltung durch Pilze das Saligenin sofort zu Salicylaldehyd und Salicylsäure weiter oxydiert wird. Ob dies auch bei *Diploceras* der Fall ist, wurde nicht mit Sicherheit festgestellt, erscheint aber doch wahrscheinlich. Die mehr oder weniger fortgeschrittene Oxydation müsste natürlich für eine quantitative Bestimmung des Saligenins eine erhebliche Fehlerquelle darstellen. Ein weiteres Hindernis, das einer quantitativen, kolorimetrischen Bestimmung des Saligenins entgegensteht, ist die Tatsache, dass die Nährlösung mit zunehmendem Alter der Kultur immer mehr durch die Tätigkeit oxydierender Fermente gefärbt und getrübt wird.

Um die Menge des noch in der Lösung vorhandenen Salicins festzustellen, wurden 10 ccm der Kulturflüssigkeit abfiltriert und dieser Menge 1 ccm eines 0,5%igen, käuflichen Emulsinpräparates beigelegt. Diese Mischung wurde vier Tage bei Zimmertemperatur gehalten und dabei jeden Tag 10 Minuten auf zirka 55° erwärmt. Damit sollte einerseits die Enzymwirkung, die bei 56—58° optimal ist, gefördert werden,

und gleichzeitig konnten damit störende Bakterieninfektionen vermieden werden. Nach vier Tagen wurde der Zuckergehalt bestimmt. Die Differenz zwischen der direkt bestimmten Zuckermenge und der nach Emulsinwirkung vorhandenen Menge konnte dann in Salicin umgerechnet werden. An unbeimpften Lösungen war zu Beginn des Versuches festgestellt worden, dass nach drei Tagen das Salicin praktisch zu 100% gespalten ist. Leider zeigte es sich im Laufe des Versuches, dass die Wirksamkeit des Emulsinpräparates in den Kulturlösungen sehr ungleich war, besonders in der Reihe mit Salicin und Glukose. Dies erscheint eigentlich begreiflich, wenn man bedenkt, dass in der Lösung das Gleichgewicht zwischen Glukosid und den Spaltungsprodukten immer wieder verschoben wurde, und dass diese letztern auch die Wirksamkeit des Emulsinpräparates herabsetzten.

Am 18. Tag des Versuchs wurde die Emulsinlösung an einer unbeimpften Nährlösung geprüft, wobei sich eine etwas geringere Wirksamkeit als zu Beginn des Versuchs ergab, doch lag die Abnahme noch innerhalb der Fehlergrenzen. Da ich aber befürchtete, das Präparat könnte weiterhin an Wirksamkeit abnehmen, wurde für die Analysen vom 20. Tag an eine neue Emulsinlösung hergestellt. Es zeigte sich aber am Schluss des Versuches, dass diese zweite Lösung weit weniger haltbar war als die erste. Die Zahlen für den Gehalt an reduzierenden Zuckern nach Emulsineinwirkung in Tab. 6 sind also besonders vom 20. Tage an recht unsicher und ebenso die daraus berechneten Werte für das noch vorhandene Salicin. Dagegen kann die erste Kolonne jeder Reihe, d. h. die Werte für den in der Lösung vorhandenen reduzierenden Zucker, als zuverlässig gelten, da diese Analysen zum Teil mehrfach wiederholt wurden. Es wurde für diese Berechnung auch die Verdunstung der Kulturflüssigkeit, die sich bei so langer Versuchsdauer störend bemerkbar macht, in Berücksichtigung gezogen. Dass die gefundenen Werte nicht eine « ideale » Kurve ergeben, ist ohne weiteres verständlich, da in den einzelnen Kolben bedeutende Unterschiede im Wachstum des Pilzes festzustellen waren.

In Reihe 1 (1% Salicin) zeigte sich bis zum 5. Tage keine Spur von reduzierenden Zuckern. Vom 7. bis zum 14. Tage sind die Mengen von Glukose noch sehr gering, sie konnten nur nachgewiesen werden, wenn 80 ccm der Lösung zum Zuckernachweis verwendet wurden. Dagegen zeigte sich schon am dritten Tage eine deutliche Saligeninreaktion. Dies zeigt, dass die Spaltung des Salicins sofort einsetzt, dass aber die entstehende Glukose vom Pilz immer wieder verbraucht wird. Nun geht aber aus den Kurven der Mycelgewichte (Fig. 4) hervor, dass sich der Pilz in den ersten Tagen des Versuches auf Salicin allein weitaus am besten entwickelt, bedeutend besser als auf Glukose allein. Daraus lässt sich schliessen, dass die aus der Spaltung entstehende Glukose in statu nascendi vom Pilz besser ausgenützt werden kann als vorgebildete Glu-

kose. In diesem ersten Stadium stehen enzymatische Aktivität und Wachstum des Pilzes im richtigen Verhältnis, d. h. der Pilz spaltet nur soviel des Glukosids, als er zum Wachstum und zur Atmung braucht, oder umgekehrt: er braucht die durch die Spaltung entstandene Glukose fortwährend auf.

Die Saligeninreaktion wird im Verlaufe des Versuches immer stärker. Das Saligenin, das sich immer mehr in der Kulturlösung anreichert, hemmt das Pilzwachstum, so dass etwa vom 11. Tage an die enzymatische Tätigkeit dem Pilzwachstum vorausseilt. Aus dieser Störung des Gleichgewichts zwischen Wachstum und enzymatischer Tätigkeit ergibt sich nun eine so starke Hemmung der Entwicklung des Pilzes durch das Saligenin, dass die Kurve des Mycelgewichtes überhaupt nicht mehr ansteigt. Aus Fig. 3 ist ersichtlich, dass in Reihe 3 (1% Glukose) die Glukose ungefähr im gleichen Masse abnimmt, wie in Reihe 1 das Salicin. Dabei ist aber das Mycelgewicht in reiner Glukose nach 34 Tagen etwa viermal so gross als in Salicin (Fig. 4). In der Glukoselösung wurde also der verbrauchte Zucker für den Aufbau des Mycels und zur Atmung verwendet, während in Salicin das eintrat, was F i s c h e r und G ä u m a n n (7, S. 365) als « Luxusabbau » oder « Raubbau » durch Enzymwirkung bezeichnen.

Betrachten wir endlich die Ergebnisse von Reihe 2 (1% Salicin plus 1% Glukose), so ist zunächst einmal festzuhalten, dass auch hier, trotz der Anwesenheit von Glukose, doch Salicin gespalten wird. Die Saligeninreaktion war in dieser Reihe vom 9. Tage an deutlich, vom 16. Tage an ziemlich stark. Allerdings blieb die Intensität der Reaktion in jedem Falle weit hinter der in Reihe 1 beobachteten zurück. Die enzymatische Spaltung wird also, wie J o s e p h s o n (9) gezeigt hat, auch unter den besondern Bedingungen dieses Versuches durch die Glukose gehemmt. Diese Hemmung ist naturgemäss in den ersten Tagen, wo die Menge des vom Pilz gebildeten « Emulsins » noch sehr klein ist, am stärksten. Nach der weiter oben angedeuteten Hypothese kann *Diploceras* die Glukose in statu nascendi am besten verwerten. Da ihm diese in Reihe 2 durch die Hemmung der Spaltung in den ersten Tagen nicht zur Verfügung steht, ist das Wachstum zuerst geringer als im Versuch mit Salicin. Die Mycelgewichte in Reihe 2 sind zuerst kaum grösser als in Reihe 3 (Fig. 4). Im weitern Verlauf wirkt sich aber die Hemmung der Spaltung durch die Glukose für den Pilz günstig aus, indem dadurch eine zu grosse Anreicherung des für den Pilz schädlich wirkenden Saligenins nicht eintritt. Es tritt hier also kein « Luxusabbau » ein. Dagegen bleibt die fördernde Wirkung der durch die Spaltung des Glukosids entstehenden Glukose bestehen. Sie bewirkt, dass die Mycelgewichte in der Reihe mit Salicin plus Glukose deutlich höher sind als in Glukose allein (Fig. 4). Diese Schlüsse haben natürlich nur unter der Annahme Gültigkeit, dass das von mir verwendete Salicin

Tabelle 6.
Zuckerbestimmungen in gepufferter Salicin- und Glukoselösung.

Alter der Kultur	Reihe 1 (1% Salicin)				Reihe 2 (1% Salicin, 1% Glukose)				Reihe 3 1% Glukose
	Direkt reduzierende Zucker	Reduzierende Zucker nach Emulsineinwirkung	Differenz	Salicin	Direkt reduzierende Zucker	Reduzierende Zucker nach Emulsineinwirkung	Differenz	Salicin	Glukose
Tage	mg	mg	mg	%	mg	mg	mg	%	%
0	0	644,0	644,0	1,022	907,0	1525	618,0	0,980	0,954
3	0	593,0	598,0	0,95	860,8	1484,8	624	0,990	0,921
5	0	543,3	543,3	0,862	865,3	1370,0	504,7	0,801	
7	ca. 10	499,7	489,7	0,777	878,8	1326,0	447,2	0,709	0,892
9	18,1	530,1	512,0	0,812	795,4	1087,4	292,0	0,463	
11	15,6	418,0	402,4	0,638	786,9	1066,2	279,3	0,443	0,804
14	18,7	476,9	458,2	0,727	807,5	1018,0	210,5	0,334	0,737
16	32,7	440,8	408,1	0,647	652,8	965,9	313,0	0,497	
18	41,0	470,0	429,0	0,680	684,0	1087,4	403,4	0,640	0,708
20	52,6	471,2	418,6	0,644	592,2	791,5	199,3	0,316	
23	84,6	364,8	280,2	0,444	392,6	617,5	224,9	0,357	0,598
25	95,9	329,2	233,3	0,370	304,8	479,2	174,4	0,277	0,443
27	130,7	306,0	174,3	0,276	297,6	729,1	431,5	0,684	0,342
30	132,5	301,8	169,3	0,268	336,2	590,9	254,7	0,404	0,395
33	157,3	307,1	149,8	0,237	202,3	265,0	62,7	0,100	0,371
35					283,4	256,7	0	0	
37	156,4	258,5	102,1	0,162	223,6	292,6	69,0	0,109	

(Siegfried) nicht irgendwelche wachstumsfördernde Verunreinigungen enthielt, wofür ich zur Zeit keine Anhaltspunkte habe.

Es lassen sich aus diesem Versuche einige Folgerungen auf das Leben des Pilzes auf seinem natürlichen Substrate ziehen. Es zeigte sich zunächst, dass gewisse Glukoside für den Pilz sehr gute C-Quellen darstellen, die auch angegriffen werden, wenn einfache und für die Ernährung günstige Kohlehydrate (Glukose) in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Unter einseitigen Kulturbedingungen entsteht ein Missverhältnis zwischen Enzymtätigkeit und Wachstum des Pilzes, indem die Enzymtätigkeit zu stark wirkt. Als Folge davon ergibt sich eine Anreicherung der für den Pilz schädlichen Aglukone der Glukoside. Auf natürlichen Substraten wird die Wirksamkeit der Enzyme durch mancherlei andere Stoffe herabgesetzt, so dass ein « Luxusabbau » wohl kaum vorkommt. Zudem ist zu beachten, dass z. B. das Optimum für die Salicinspaltung bei pH 4,4 liegt, dass sich aber *Diploceras* bei pH 6,4 am besten entwickelt. An den natürlichen Standorten des Pilzes muss

also die Wirksamkeit des « Emulsins » schon durch die Bedingungen der Wasserstoffionenkonzentration an sich sehr stark herabgesetzt sein, ganz abgesehen davon, dass auch die Temperaturbedingungen an natürlichen Standorten für die Spaltung ungünstig sein müssen. Eine zu intensive enzymatische Spaltung der Glukoside erscheint also im natürlichen Milieu des Pilzes höchst unwahrscheinlich. Damit fällt eine Hem-

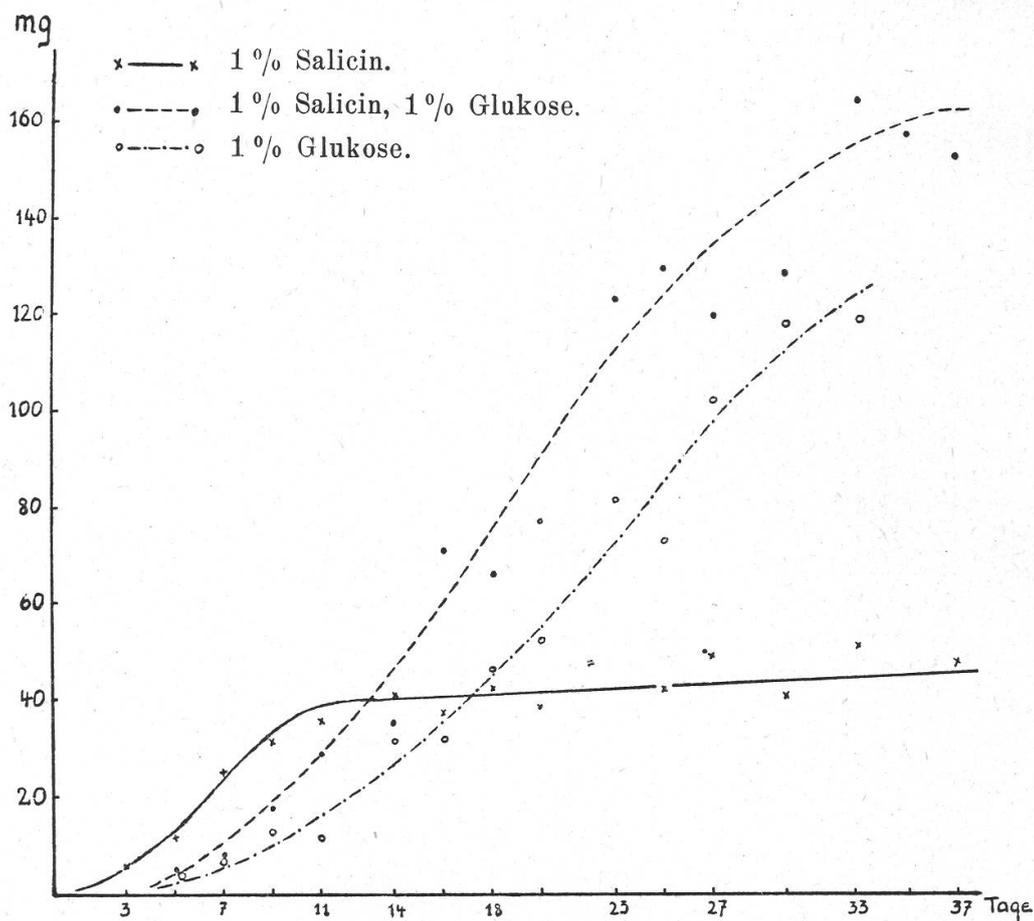


Fig. 4.

Trockengewicht des Mycels in gepufferter Peptonlösung pH 6,4.

mung des Pilzwachstums durch die Spaltungsprodukte der Glukoside kaum in Betracht, während andererseits eine Förderung des Wachstums durch bestimmte Glukoside sich auswirken kann.

Diploceras gedeiht also auf zahlreichen Polysacchariden und Glukosiden, die zuerst enzymatisch gespalten werden müssen, bevor sie für den Pilz verwertbar sind. Dies setzt eine ausgiebige Enzyymbildung voraus. Es seien deshalb hier anhangsweise noch einige Versuche zur Feststellung der enzymatischen Aktivität erwähnt.

Getrocknetes Mycel wurde im Mörser zerrieben und daraus eine Aufschwemmung in destilliertem Wasser hergestellt. 1 ccm dieser Aufschwemmung wurde auf 10 ccm einer 0,5%igen Lösung der Kohle-

hydrate und Glukoside beigefügt und die Mischung bei Zimmertemperatur zwei Tage stehengelassen. Hierauf wurde mit der Bertrandschen Methode festgestellt, ob durch die Enzymwirkung eine Vermehrung der reduzierenden Zucker erfolgt sei.

Am auffälligsten war die Spaltung in Amygdalin, Salicin, β -Methylglukosid, Phloridzin und Arbutin, was auf die starke Wirkung einer oder mehrerer β -Glukosidasen (« Emulsin ») zurückgeführt werden muss. Bedeutend weniger werden Saccharose, α -Methylglukosid und Raffinose gespalten. Keine Spaltung ergab sich mit Laktose und Inulin, womit das geringe Wachstum auf diesen Substanzen seine Erklärung findet. Merkwürdigerweise wurden aber auch Stärke und Cellobiose, auf denen nach Tab. 1 gutes Wachstum erfolgt, nicht gespalten.

Zusammenfassung.

1. *Diploceras hypericinum* ist ein auf die Gattung *Hypericum* spezialisierter Pilz aus der Verwandtschaft der Gattung *Pestalozzia*. Er befällt auf der Nährpflanze die stark verkorkten Rindenzellen des Stengels und ist als Saprophyt zu betrachten.
2. Dialysate und Dekokte von Stengeln und Blättern förderten das Wachstum des Pilzes stark, doch war keine spezifische Wirkung von *Hypericum*-Dialysaten festzustellen.
3. Der Pilz gedeiht auf zahlreichen Kohlehydraten und Glukosiden und sogar auf Kork. Er ist also für das Leben in Rindenzellen, die reich an Reserve- und Exkretstoffen sind, angepasst.
4. Verschiedene Glukoside stellen ausgezeichnete Kohlenstoffquellen dar. Sie werden auch in Gegenwart von Glukose gespalten. Glukose übt eine deutlich hemmende Wirkung auf die enzymatische Spaltung des Salicins aus. Das hat zur Folge, dass sich das für den Pilz schädliche Aglukon weniger anhäuft, so dass der Pilz in einem Gemisch von Glukosiden und Glukose besser wächst als auf Glukose allein. Es wird angenommen, dass die aus der enzymatischen Spaltung der Glukoside hervorgehende Glukose in statu nascendi eine deutlich wachstumsfördernde Wirkung auf den Pilz ausübt.
5. Als beste Stickstoffquelle erwies sich Pepton. Bei ungenügenden Kohlenstoffquellen dienen die Aminosäuren auch als Kohlenstoffquellen, wobei mehr Ammoniak gebildet wird, während auf zusagenden Kohlehydraten und Glukosiden die Säurebildung überwiegt.
6. *Diploceras* bildet in flüssigen Medien Gemmen, die eine primitive Sporenbildung darstellen, monströse und normale Sporen. Die letzteren treten bei mangelhafter Ernährung auf, wenn das pH der Kulturlösung durch Ammoniakbildung nach der alkalischen Seite hin verschoben wird.

Literatur.

1. Allescher, A. Fungi imperfecti in Rabenhorsts Kryptogamenflora Bd. 1, VII. Abt. S. 706—708. 1903.
 2. Brunstein, A. Über Spaltungen von Glykosiden durch Schimmelpilze. — Beihefte Bot. Centralblatt 10 : 1—50. 1901.
 3. Clements, F. E. and C. L. Shear. The Genera of Fungi. New York, 1931.
 4. Diedicke, H. in Kryptogamenflora der Mark Brandenburg, Bd. IX (Pilze VII) S. 887. 1915.
 5. Dorner, W. Methoden zur Untersuchung von Bakterienreinkulturen. Hannover, 1933.
 6. Doyer, C. M. Untersuchungen über die sogenannten Pestalozzia-Krankheiten und die Gattung Pestalozzia De Not. — Mededeelingen Phytopath. Laborat. « Willie Commelin Scholten », Bäärn 9 : 1—72. 1925.
 7. Fischer, Ed. und E. Gäumann. Biologie der pflanzenbewohnenden parasitischen Pilze. Jena 1929.
 8. Gäumann, E. Über eine Pestalozzia-Krankheit der Nussbäume. — Mitteil. der schweiz. Zentralanstalt für das forstl. Versuchswesen 14 : 195—200. 1927.
 9. Josephson, K. Enzymatische Spaltung von Glukosiden. — Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiolog. Chemie 147 : 1—154. 1925.
 10. Klebs, G. a) Zur Physiologie und Fortpflanzung einiger Pilze. I. Sporodinia grandis. — Jahrb. f. wissenschaftl. Bot. 32 : 1—70. 1898.
b) II. Saprolegnia mixta De Bary. — L. c. 33 : 513—593. 1899.
 11. La Rue, C. D. The results of Selection within pure Lines of Pestalozzia Guepini Desm. — Genetics 7 : 142—201. 1922.
 12. Leininger, H. Zur Morphologie und Physiologie der Fortpflanzung von Pestalozzia palmarum Cooke. — Zentralbl. f. Bakteriologie II. Abt. 29 : 3—35. 1911.
-