

Zeitschrift: Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse
Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft
Band: 60 (1950)

Artikel: Chitin und Zellulose in Pilzzellwänden
Autor: Frey, Rudolf
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-42128>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 08.02.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Chitin und Zellulose in Pilzzellwänden

Von *Rudolf Frey*

Ausgeführt im Pflanzenphysiologischen Institut der ETH und im Röntgenlaboratorium am Mineralogischen Institut der ETH und an der EMPA

Eingegangen am 28. Februar 1950

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	199
1. Bedeutung der Zellwandchemie für die Stammesgeschichte der Pilze	199
2. Die Nachweismethoden für Chitin und Zellulose	202
II. Röntgenanalytische Untersuchungen	205
A. Material und Methode	205
1. Herkunft und Kultur der untersuchten Pilze und Algen	205
2. Die röntgenanalytische Methode	207
B. Ergebnisse der Röntgenanalyse	209
1. Untersuchung der Pilze und Algen mit angeblichem Nebeneinander von Chitin und Zellulose	209
2. Das Vorkommen von Chitin und Zellulose im System der Pilze . .	211
3. Ein merkwürdiger kristalliner Zellstoff bei Pilzen und Algen . .	219
III. Vergleich der röntgenanalytischen Ergebnisse mit mikrochemischen Reaktionen	221
IV. Besprechung der Ergebnisse	224
V. Zusammenfassung	226
Literaturverzeichnis	227
Tafel mit Diagrammen	206

I. Einleitung und Problemstellung

1. Bedeutung der Zellwandchemie für die Stammesgeschichte der Pilze

Die Phylogenie der Pilze ist auch heute noch nicht restlos abgeklärt; immer wieder werden neue Ableitungen versucht, namentlich in der Klasse der Phycomycetes (11, 13, 14, 17, 56). Im wesentlichen stehen sich zwei Ansichten gegenüber:

1. Die Mehrzahl der Systematiker stellt sich vor, daß die Pilze durch Chlorophyllverlust aus mehreren Organismengruppen polyphyletisch entstanden seien und daß sich die einzelnen Pilzgruppen selbständig weiterentwickelt hätten.
2. Eine andere Ansicht beruht auf der Annahme einer einzigen, im großen ganzen zusammenhängenden Entwicklungsreihe, die von

primitiven einzelligen Organismen bis zu den höchsten Pilzen aufsteigt.

Die phylogenetischen Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Pilzgruppen werden meist nach entwicklungsgeschichtlichen und morphologischen Gesichtspunkten beurteilt. Als erster versuchte F. von Wettstein (55) daneben auch den Zellwandchemismus mit in Betracht zu ziehen. Er stellt zunächst die grundsätzliche Frage, ob die chemische Zusammensetzung der Zellwand überhaupt als Merkmal von systematisch-phylogenetischer Bedeutung gelten könne. Auf Grund durchaus modern anmutender Erwägungen kommt er zum Schluß, daß chemische Merkmale eine gewisse systematische Bedeutung beanspruchen dürfen. Das Auftreten von Chitin hält er für ein wertvolles Merkmal, weil es nicht direkt beeinflußbar ist. (Er hatte vergeblich versucht, verschiedene zellulosehaltige Grünalgen durch heterotrophe Ernährung in chitinführende Organismen umzuwandeln.) Gestützt auf eigene Untersuchungen und auf Angaben in der Literatur (36, 57) über das Vorkommen von Chitin und Zellulose in pflanzlichen Zellwänden stellt er fest, daß Chitin nur bei Pilzen und nie neben Zellulose vorkommt. Zellulose und Chitin vertreten sich gegenseitig, indem sie einander ausschließen. Innerhalb der systematischen Gruppen der Pilze herrscht große Einheitlichkeit und Konstanz bezüglich der Verteilung der genannten Membranstoffe. So ist bei Ascomyceten und Basidiomyceten die beherrschende Zellwand-Grundsubstanz Chitin. Nur bei abgeleiteten Typen wird es durch andere Stoffe verdeckt oder ersetzt. So ist z. B. bei den Saccharomyceten und den Laboulbeniaceen weder Chitin noch Zellulose nachweisbar. Bei den Phycomyceten dagegen fand F. v. Wettstein eine scharfe Trennung in zwei Gruppen, die sich durch das Vorkommen von Chitin und Zellulose unterscheiden: Die Monoblepharidaceen und Oomyceten besitzen Zellulose, die Zygomyceten Chitin. Dieser auffallende Unterschied im Membranchemismus innerhalb der gleichen Pilzklasse muß stammesgeschichtliche Bedeutung haben. F. von Wettstein erblickt in der Zellulose den ursprünglichen, im Chitin einen abgeleiteten Membranstoff. Diese Auffassung wird von ihm eingehend begründet und führt ihn zu der Annahme, daß die « Chitinpilze » alte, schon lange aus Algen abgezweigte Typen sind, während bei den « Zellulosepilzen » der Algencharakter noch deutlich in Erscheinung tritt, weil sie jünger sind. Diesen stammesgeschichtlichen Unterschied sieht er auch in morphologischen und ökologischen Merkmalen. Er betont ganz besonders, daß er durch sein starkes Hervorheben chemischer Verwandtschaftsbeziehungen durchaus nicht eine einseitige Überschätzung dieser Merkmale ausdrücken will. Nach der Auffassung von Wettsteins haben die Phycomyceten polyphyletischen Ursprung.

Die überzeugungskräftige Theorie von Wettsteins, die auf

dem Nachweis eines absoluten gegenseitigen Ausschlusses von Chitin und Zellulose innerhalb ein und desselben Organismus und sogar innerhalb ganzer systematischer Einheiten beruht, begegnete aber bald großen Schwierigkeiten.

K n i e p (26) fand nämlich einen zu den Blastocladiaceen gehörigen Phycomyceten (*Allomyces*), den er auf Grund seiner Fortpflanzungsverhältnisse für einen Vorläufer der Monoblepharidaceen und damit auch der Oomyceten ansah, gleichzeitig aber auch in Beziehung zu einer Gruppe der Chytridiales brachte. Die Auffindung weiterer Blastocladiaceen mit noch einfacheren Fortpflanzungsverhältnissen in absteigender Reihe, die zugleich gewissen Chytridiales immer mehr morphologisch ähnlich sahen (18, 47), unterstützte K n i e p s Annahme einer einzigen, aufsteigenden Entwicklungsreihe von den Chytridiales über die Blastocladiaceen und Monoblepharidaceen zu den Oomyceten. Vom morphologisch-entwicklungsgeschichtlichen Standpunkte aus erschien die Reihe vollkommen geschlossen (16). Der Membranchemismus der Chytridiales und der Blastocladiaceen war allerdings damals noch völlig unklar. P e t e r s e n (36) hatte bei Blastocladiaceen Zellulose nicht nachweisen können; F. v o n W e t t s t e i n (55) glaubte aber, daß sie trotzdem Zellulosemembranen besäßen, weil auch bei den Monoblepharidaceen der Zellulosenachweis mit Schwierigkeiten verbunden gewesen war. In der von ihm herausgegebenen Neuauflage des Handbuches der systematischen Botanik von R. v o n W e t t s t e i n (56) vereinigte er daher im Anschluß an K n i e p Blastocladiaceen und Monoblepharidaceen zur Reihe der Monoblepharidales.

In einer Untersuchung zur Abklärung der unsicheren und lückenhaften Kenntnisse über die Membranchemie der niederen Pilze mit der mikrochemischen Methode v a n W i s s e l i n g h s (57, 58) fand N a b e l (34) bei den Chytridiales und den Blastocladiaceen Chitinmembranen. Das erschwerte natürlich die Annahme der erwähnten monophyletischen Entwicklungsreihe sehr. Gleichzeitig fand N a b e l aber eine neue Chytridiacee, *Rhizidiomyces bivellatus*, deren Membran sowohl Chitin- als auch Zellulosereaktion zeigte (16, 34). Aus der Beobachtung, daß ein und derselbe Pilz zur Bildung beider Zellwandsubstanzen befähigt schien, mußte folgerichtig der Schluß gezogen werden, daß der Membranchemismus nicht mehr als systematisch-phylogenetisches Kriterium gelten könne und die scharfe Sonderung der Phycomyceten in Chitin- und Zellulosepilze nicht mehr aufrechterhalten zu werden brauche. Auch aus uneinheitlichen Verhältnissen im Zellwandchemismus der Hefen schloß N a b e l, daß dieser für Systematik und Stammesgeschichte bedeutungslos sei. Obwohl seine Resultate im übrigen große Übereinstimmung mit denjenigen v a n W i s s e l i n g h s und v o n W e t t s t e i n s aufweisen, unterstützt er somit die Auffassung, « daß größere zusammenhängende

Entwicklungsreihen unter den Pilzen vorhanden sind, als die Vertreter der Lehre von der polyphyletischen Abstammung der Pilze aus Algen sie annehmen » (34).

Weitere Untersuchungen, in denen im gleichen Organismus Chitin und Zellulose nebeneinander nachgewiesen wurde, halfen mit, die Theorie von Wettsteins ins Wanken zu bringen.

In mehr als zehn Tage altem Myzel von *Mucor Rouxii* glaubte Hopkins (22), neben Chitin auch Zellulose nachweisen zu können, doch konnten seine Angaben durch Nabel nicht bestätigt werden.

Dagegen wies Thomas (48) in *Fusarium*arten neben Chitin sehr wenig Zellulose nach. Später fand er bei den Oomyceten *Pythium* und *Phytophthora* neben Zellulose auch Chitin (49, 50). Er arbeitete im wesentlichen mit den gleichen Methoden, die alle früheren Untersucher auch verwendet hatten (Chitosanreaktion, Löslichkeitsverhältnisse, Darstellung von Glucosazon, resp. Glucosamin-Chlorhydrat usw.). Er unterließ es jedoch, seine Ergebnisse zu den allgemeinen stammesgeschichtlichen Fragen in Beziehung zu setzen.

Außerdem bestehen in der Literatur verschiedene Angaben über Algen, die ebenfalls Chitin und Zellulose in der gleichen Zellwand enthalten sollen. Es betrifft dies *Cladophora glomerata*, ältere Zellen von *Oedogonium irregulare* (59), *Mougeotia* und *Spirogyra* (51). Bei den zwei letzteren soll das Chitin sogar in eine Zelluloseschicht eingebettet sein. Von besonderer Bedeutung erscheint eine Untersuchung von Astbury und Preston (3), die bei röntgenometrischen Untersuchungen der Zellwandstruktur von *Cladophora*arten neben Zelluloseinterferenzen weitere Interferenzen fanden, die sie als solche von Chitin deuteten. Alle übrigen erwähnten Untersuchungen wurden nämlich mit Nachweismethoden durchgeführt, die zu Zweifeln an ihrer Zuverlässigkeit Anlaß geben.

Aus diesem Grunde soll im nächsten Kapitel eine kritische Besprechung bisher verwendeter Nachweismethoden für Chitin und Zellulose folgen.

2. Die Nachweismethoden für Chitin und Zellulose

Die mikrochemische Methode erschien seit jeher für Untersuchungen an Algen- und Pilzzellwänden als die geeignetste, weil sie direkte mikroskopische Beobachtung des zu untersuchenden Zellwandmaterials während der Nachweisreaktion erlaubt, mit verhältnismäßig wenig Material auskommt und sich in kurzer Zeit an zahlreichen Proben ausführen läßt.

Der Nachweis von Chitin und Zellulose beruht bei dieser Methode im wesentlichen auf Jodfärbungsreaktionen. Zellulose färbt sich bei Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure mit Jodjodkalilösung blau, mit Chlorzinkjodlösung allein blauviolett. Bei Chitin läßt sich eine charak-

teristische Jodfärbung nicht ohne weiteres erreichen. Reines Chitin färbt sich mit Chlorzinkjodlösung eher rotviolett, während Jodjodkalilösung zusammen mit Schwefelsäure die mannigfaltigsten gelb- bis rotbraunen Farbtöne verursacht. Dieses Verhalten gab sogar Anlaß, die Existenz verschiedenartiger Chitine anzunehmen (27). Einen guten Test mit einigermaßen konstanter Färbung hat van Wisselingh (57, 58) ausgearbeitet. Dabei werden die Zellwände zuerst von nicht interessierenden, störenden Begleitstoffen befreit dadurch, daß sie mit Glyzerin in zugeschmolzenen Glasröhrchen auf 300° C erhitzt werden. Sowohl Chitin wie auch Zellulose werden durch diese Behandlung nicht zerstört. Dann wird das Chitin der Zellwände in Chitosan übergeführt, indem das Untersuchungsmaterial wieder in zugeschmolzenen Glasröhrchen mit konzentrierter Kalilauge (50 %) während 20 Minuten auf 160° bis 180° C erhitzt wird. Dieses Chitosan ergibt nun mit Jodjodkalilösung in Gegenwart von verdünnter Schwefelsäure eine charakteristische rotviolette Farbe, die für Chitosan spezifisch sein soll.

Ist im gleichen Präparat neben Chitin auch Zellulose vorhanden, so läßt sich diese durch die Blaufärbung mit Jodjodkali und konzentrierter Schwefelsäure nachweisen. Das rotviolette Chitosan entfärbt sich beim Zusatz konzentrierter Säure und löst sich unter Bildung gelbbrauner Schlieren auf. Diese Auflösung in konzentrierter Schwefelsäure kann also als Kontrollreaktion für Chitosan dienen.

Als weitere Kontrollmöglichkeit wird die Bildung von Chitosansalzen, die als sogenannte Sphaerite auskristallisieren, angegeben (6, 7, 57, 58). Es ist aber meist schwierig, genügend große Sphaerokristalle zu erhalten, und deren Eigenschaften sind zudem zu schlecht definiert, als daß man auf sie abstellen könnte (37). Weitere Kontrollreaktionen, wie Auflösung des Chitosans in verdünnter Salz- oder Essigsäure, nicht auswaschbare Gelbfärbung mit Pikrinsäure (34) u. a. m., dürften wohl noch weniger spezifisch sein.

Die Grundlage des mikrochemischen Nachweises bilden also Jodfärbungsreaktionen. Nach Kühnelt (28) sind diese jedoch nicht als eigentliche chemische Reaktionen anzusprechen, sondern es handelt sich um Adsorptionserscheinungen, bei welchen die Polysaccharide als Dispersoide wirken. Sie sind also unspezifische Gruppenreaktionen, die durch geringe Unterschiede im Molekülbau nicht beeinflußt werden (37). Da sie somit von der chemischen Zusammensetzung des Substrates einigermaßen unabhängig sind, können sie durch Veränderung der Versuchsbedingungen variiert werden. Nach Kühnelt liegen nun zwar bei Anwendung der Wisselingh-Reaktion immer die gleichen Versuchsbedingungen vor, und sie wird von ihm deshalb als zuverlässig anerkannt.

Doch auch bei diesem Test können natürlich die Bedingungen wechseln, wenn auch in engeren Grenzen. Zudem ist das Chitosan, mit wel-

chem die Reaktion ausgeführt wird, chemisch schlecht definiert (8, 33). Auch die Widerstandsfähigkeit gegen heißes Alkali muß vorsichtig beurteilt werden, da Chitin von diesem unter Umständen vollständig dispergiert werden kann. R i c h a r d s fand Unterschiede zwischen Ampullen mit gleichem Material, die gleich behandelt worden waren (37). G o n e l l (15) erhielt von *Eunice*-Kiefern ein von Chitin abweichendes Röntgendiagramm, obwohl die mikrochemische Chitinreaktion positiv war. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die Berechtigung der vorgebrachten Einwände.

Die makrochemische Methode, die z. B. von T h o m a s verwendet wurde, besteht darin, die Zellwandstoffe möglichst rein darzustellen, sie wenn nötig auf Grund verschiedener Löslichkeitseigenschaften voneinander zu trennen und hierauf durch Derivate der Hydrolyseprodukte zu identifizieren (Glucosazon für Zellulose, Glucosaminchlorhydrat für Chitin). Dieser Nachweis ist der einzige, der quantitativ ausgeführt werden kann; in qualitativer Hinsicht ist er aber keineswegs befriedigend. Durch den Nachweis einer Komponente ist noch nicht das Polysaccharid selbst nachgewiesen. Auch von Zellulose verschiedene Hochpolymere mit ähnlichen Eigenschaften können bei der Hydrolyse Glucose liefern, und ebenso ist Glucosamin Baustein verschiedener Polysaccharide und Glycoproteine (30, 54). Von verschiedenen Untersuchern wurde Glucosamin als Hydrolyseprodukt erhalten aus Substanzen mit wechselnder, von Chitin abweichender chemischer Zusammensetzung (24, 35). Makrochemische Untersuchungen stellten sogar die Identität von pflanzlichem und tierischem Chitin in Frage (10), die aber röntgenometrisch erwiesen werden konnte (15, 23, 25). Abgesehen von diesen Unzulänglichkeiten ist das makrochemische Vorgehen ungeeignet für größere Reihenuntersuchungen, weil es viel Material und Zeit benötigt.

Auf *physikalische Eigenschaften* wie Doppelbrechung (43), Fluoreszenz, Brechungsindex, optische Drehung oder spezifisches Gewicht (46) gegründete Nachweismethoden kommen für eine sichere Identifikation nicht in Frage.

Die röntgenanalytische Methode bleibt nun allein noch erfolgversprechend, da sowohl Chitin als auch Zellulose in Zellwänden kristallin vorliegen (12). B r a n d e n b e r g e r und F r e y - W y ß l i n g (5) wandten sie meines Wissens erstmals zum Nachweis der Membransubstanzen an bei einer pilzähnlichen Alge (53), während sie früher mehr zur Abklärung des Kristallbaus und zum Vergleich der pflanzlichen mit tierischen Polysacchariden verwendet wurde. Kombiniert mit makrochemischen Reinigungsverfahren erlaubt diese Methode einen objektiven und eindeutigen qualitativen Nachweis kristalliner Zellwandsubstanzen, da die Röntgendiagramme von Chitin und Zellulose deutlich verschieden

sind ¹ (siehe Tafel: Diagramm I und II) (19, 32). Weil sie mit verhältnismäßig wenig Material auskommt, erschien sie für Reihenuntersuchungen durchaus geeignet und wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit verwendet, um die Verteilung der kristallinen Membranstoffe bei den Pilzen erneut zu untersuchen und gleichzeitig die Zuverlässigkeit früher verwendeter Methoden — vor allem der mikrochemischen — zu überprüfen.

II. Röntgenanalytische Untersuchungen

A. Material und Methode

1. Herkunft und Kultur der untersuchten Pilze und Algen

Fast alle untersuchten Pilzmyzelien wurden in eigenen Kulturen gezogen, deren Stammkulturen teils aus der Mykothek des Instituts für Spezielle Botanik an der ETH, teils vom Centraalbureau voor Schimmelcultures in Baarn (Holland) bezogen wurden. Die meisten Hefen sowie einige *Phytophthora*arten stammten von der Eidg. Versuchsanstalt für Obst- und Gartenbau in Wädenswil. Die untersuchten Fruchtkörper der beiden Agaricaceen *Coprinus* und *Hypholoma* wurden im Freien gesammelt.

Leider konnte der von N a b e l (34) untersuchte Pilz *Rhizidiomyces bivellatus*, der sowohl Chitin als auch Zellulose bilden soll, nicht mehr erhalten werden, da alle seine Kulturen eingegangen sind.

Um die Myzelien bequem vom Nährsubstrat abtrennen zu können, wurden meist flüssige Nährmedien verwendet; nur *Ashbya gossypii*, *Eremothecium Ashbyii*, *Entomophthora coronata* und *Basidiobolus ranaarum* wurden auf Bierwürzeagar gezogen. Es wurden die verschiedensten Nährlösungen verwendet, deren Anführung im einzelnen sich hier wohl erübrigt, da kein Einfluß derselben auf das qualitative Vorkommen der kristallinen Zellwandsubstanzen festgestellt werden konnte. Aus praktischen Gründen wurden nach Möglichkeit Nährsubstrate gebraucht, die ein rasches und üppiges Wachstum der betreffenden Pilze bewirkten. Sämtliche sprossenden Pilze wurden auf der von K ü s t e r (29) angegebenen synthetischen Hefenährlösung kultiviert.

Alle fädigen Algen wurden in freier Natur gesammelt und mikroskopisch auf ihre Reinheit geprüft. Reinkulturen von *Heterokonten* erhielt ich von Herrn Prof. W. Vischer in Basel, dem ich dafür herzlich danken möchte. Sie wurden auf $\frac{1}{2}$ Knop mit 2% Glukose und 0,5% Pepton kultiviert.

¹Die charakteristischen, starken Interferenzlinien von Zellulose und Chitin entsprechen folgenden Netzebenenabständen (in ÅE):

Zellulose I	6,05	5,33	3,92
Zellulose II	7,3	4,45	4,03
Chitin	9,6	4,63	3,39

Erläuterungen zu Tafel III

Diagramm I

Zellulose II aus *Lagenidium giganteum*; Niederschlag aus Lösung in
Schweizers Reagens

Diagramm II

Chitin aus *Entomophthora coronata*; Niederschlag aus Lösung in Salzsäure

Diagramm III

Bariumsulfat (Baryt)

Diagramm IV

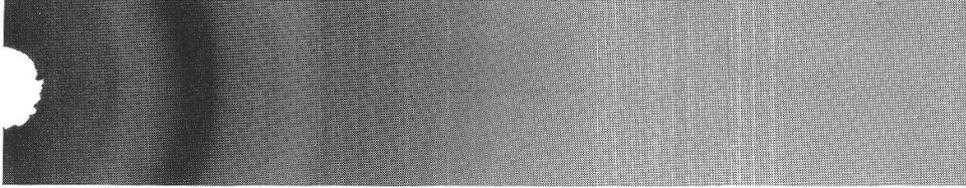
Zellrückstand von *Schizosaccharomyces liquefaciens*

(Die von Pilzzellwänden erhaltenen Zellulose-I-Diagramme eignen sich
nicht für die Reproduktion)

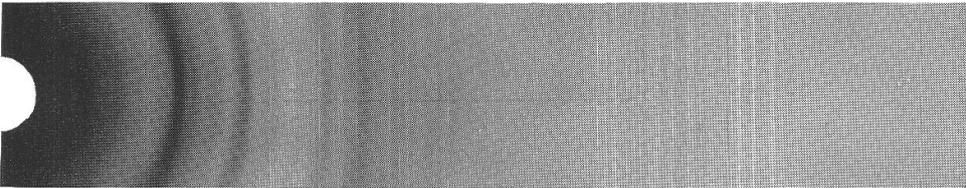
Aufnahmen mit Cu-K α -Strahlung, Kameradurchmesser 114,4 mm

Reproduktionen in Originalgröße

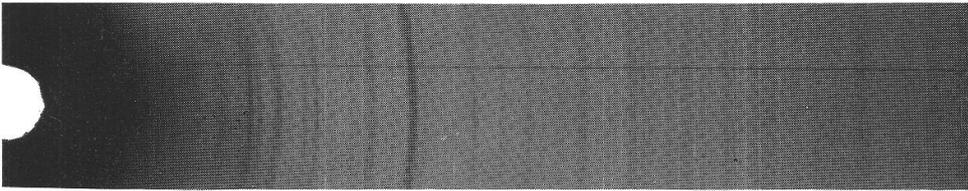
Tafel III



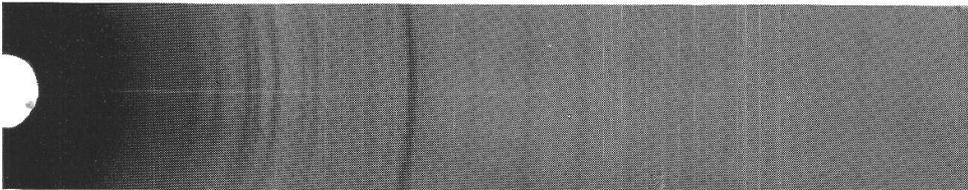
I



II



III



IV

Leere Seite
Blank page
Page vide

2. Die röntgenanalytische Methode

a) Reinigung und Vorbereitung der Zellwände

Da die Zellwandstoffe, welche außer den kristallinen « Gerüstsubstanzen » in den Membranen enthalten sind, die Röntgenanalyse stören, müssen sie vorher entfernt werden. Es betrifft dies außer Proteinen und anderen Stoffen vor allem fettartige Substanzen, die in den Pilzzellwänden wie auch in anderen pflanzlichen Zellwänden vorhanden sind (9, 20, 45, 48, 49, 50, 52). Gleichzeitig werden natürlich auch die Inhaltsstoffe der Zellen entfernt. Es zeigte sich, daß nach Extraktion der genannten Begleitstoffe bessere Röntgendiagramme erhalten werden können (20, 45). Diese Erscheinung wurde darauf zurückgeführt, daß durch die Extraktion die Kristallinität der resistenten Komponenten gefördert würde. Außerdem spielen sicher Absorption und diffuse Streuung der Röntgenstrahlen durch diese « Inkrusten » bei der Entstehung des Interferenzbildes eine Rolle.

Für die Entfernung der störenden Begleitstoffe kommen verschiedene Reindarstellungsmethoden der « Gerüstsubstanzen » in Frage. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde vorwiegend das von Scholl (44) angegebene Verfahren zur Reindarstellung von Chitin aus *Boletus edulis* verwendet (vgl. auch 1, 23). Es besteht in abwechselndem Kochen des Pilzmaterials in zehnprozentiger Kalilauge und in Wasser, bis das Filtrat farblos abläuft, worauf der Rückstand mit einprozentigem Kaliumpermanganat und darauf mit zweiprozentigem Natriumbisulfit behandelt wird. Zum Filtrieren nach den einzelnen Extraktionen verwendete ich Glasfilter; die Hefen und einige andere Pilze wurden durch Zentrifugieren jeweils von der Extraktionsflüssigkeit abgetrennt.

Sowohl Chitin als auch Zellulose bleiben nach dieser Behandlung als reinweiße oder leicht gelbliche Masse zurück, die meist noch die Struktur des Pilzhyphengeflechts erkennen läßt. Wie sich im Verlaufe meiner Untersuchungen zeigte, bleiben bei diesem Verfahren auch andere Membranstoffe intakt (z. B. Hefezellmembranen).

Als weiteres Reinigungsmittel wurde wässrige Chlordioxydlösung verwendet mit anschließender Behandlung in zweiprozentiger Natriumsulfitlösung (38—41). Diese Methode ergab aber meist weniger gute Resultate.

Das gereinigte Zellwandmaterial wurde entweder mit Alkohol und Äther oder dann im Trockenschrank bei 110° C getrocknet.

Da die Röntgenanalyse quantitativ nicht sehr empfindlich ist, sich also für den Nachweis kleiner Beimengungen in Gemischen nicht ohne weiteres eignet, mußte versucht werden, durch Fraktionierung des Zellwandmaterials eine Anreicherung einzelner Komponenten herbeizuführen (4). So könnte zum Beispiel in Pilzzellwänden, die neben Zellulose wenig Chitin enthalten, durch Herauslösen der Zellulose ein chitinreiche-

res Präparat und umgekehrt durch Auflösung des Chitins in Membranen mit geringem Zellulosegehalt ein zellulosereicheres Gemisch erhalten werden.

Zum Entfernen von Zellulose aus einem Gemisch Chitin/Zellulose eignet sich Schweizers Reagens (Tetra-ammino-Cu-[II]-hydroxyd), da Chitin von diesem nicht beeinflusst wird (33). Ein aktives Reagens wurde hergestellt, indem durch 25prozentiges reines Ammoniak über Cu-Spänen während einiger Stunden Luft geleitet wurde, bis sich die Lösung tief blau gefärbt hatte. Die Zellulose kann aus der Lösung in Schweizers Reagens durch Ansäuern wieder ausgefällt werden; sie bildet dabei eine andere Kristallmodifikation (Zellulose II, fälschlich « Hydratzellulose » genannt) als im nativen Zustand (Zellulose I) (19).

Diese Auflösung und Wiederausfällung der Zellulose ergibt somit eine Kontrollmöglichkeit für das Vorhandensein von Zellulose. Die zellulosehaltigen Pilzmembranen erzeugten nämlich nach Scholl gereinigt meist etwas unscharfe Zellulose-I-Diagramme, so daß erst diese Kontrolle ein absolut eindeutiges Resultat ergab.

Chitin ist in konzentrierter Salzsäure in der Kälte löslich und kann aus dieser Lösung durch Verdünnung mit Wasser wieder ausgefällt werden. Das Chitin wird in der Lösung nur langsam hydrolysiert (33), und der nach kurzer Zeit wieder ausgefällte Niederschlag ergibt ein noch unverändertes Röntgendiagramm (8). Auch das Röntgendiagramm der Zellulose wird durch Einwirkung von Salzsäure in Konzentration bis zu 24 % nicht merklich verändert (31). Es wurde deshalb zur Abtrennung von Chitin 24prozentige Salzsäure verwendet, welche dieses in genügend kurzer Zeit zu lösen vermag. Das aus der Lösung in Salzsäure ausgefällte Chitin erzeugte oft — wohl wegen der größeren Reinheit — schönere Diagramme als das einfach nach Scholl gereinigte Material.

b) Röntgen-Aufnahmetechnik

Die röntgenanalytischen Aufnahmen wurden nach dem Pulververfahren am ruhenden Präparat gemacht. Das gereinigte und getrocknete Zellwandmaterial wurde nach Möglichkeit pulverisiert und unter Zugabe einer kleinen Menge Gummiarabikum, welches keine Röntgeninterferenzen erzeugt, zu kleinen Stäbchen von etwa $\frac{1}{2}$ bis 1 mm Durchmesser und 5 bis 10 mm Länge geformt. Diese Stäbchen konnten auf dem Präparathalter der verwendeten Kamera festgemacht und zentriert werden. Es wurde Cu-K $_{\alpha}$ -Strahlung (Filter: Ni-Metallfolie) bei 37 kV und 12 bis 13 mA verwendet mit einer Belichtungszeit von $1\frac{1}{4}$ bis 2 Stunden. Der Kameradurchmesser betrug 114,4 mm.

B. Ergebnisse der Röntgenanalyse

1. Untersuchung der Pilze und Algen mit angeblichem Nebeneinander von Chitin und Zellulose

Wenn die beiden Membranstoffe Chitin und Zellulose vom gleichen Organismus gebildet und tatsächlich in der gleichen Zellwand nebeneinander nachgewiesen werden können, darf ihrem Vorkommen, wie früher ausgeführt wurde, keine stammesgeschichtliche Bedeutung beigemessen werden. Eine Untersuchung des Vorkommens von Chitin und Zellulose im System der Pilze verliert in diesem Falle viel an Interesse. Aus diesem Grunde sollen nun zunächst jene Untersuchungen besprochen werden, die an Pilzen und Algen ausgeführt wurden, welche nach früheren Autoren beide Gerüstsubstanzen enthalten sollen.

Die Myzelien der Oomyceten *Pythium* und *Phytophthora* liefern nach Thomas (49, 50) neben Zellulose und andern Membranstoffen einen in Schweizers Reagens unlöslichen Zellwandrückstand, der von diesem als Chitin identifiziert wurde. Diese Angaben überprüfte ich zunächst an Myzeldecken verschiedenen Alters von *Pythium de Baryanum* Hesse.

Die Decken wurden zerkleinert, sorgfältig gewaschen und nach den Angaben Thomas' extrahiert. Hierauf wurden sie für fünf Tage in Schweizers Reagens gebracht. Tatsächlich blieb ein geringer Rückstand ungelöst zurück. Dieser wurde kurze Zeit mit verdünnter Schwefelsäure behandelt, um alles Cu in Lösung zu bringen, und dann mehrmals gewaschen. Nach dem Trocknen ergab der Rückstand bei der Röntgenanalyse nicht, wie erwartet, ein Chitindiagramm, sondern lieferte weder Chitin- noch Zelluloseinterferenzen. Statt dessen zeigte das Diagramm ein Interferenzensystem, dessen Linien, mit Ausnahme einer einzigen, vollständig mit denjenigen eines Baryt- (Bariumsulfat-) Diagramms übereinstimmen. Außer den « Baryt »-Linien wies das Diagramm noch eine Interferenz unter kleinem Beugungswinkel auf, die einem Netzebenenabstand von 7,7 ÅE entspricht. Auf dieses Diagramm wird später noch zurückzukommen sein (II B 3, S. 219).

Aus der Lösung in Schweizers Reagens ließ sich durch Ansäuern mit Salzsäure ein flockiger, weißer Niederschlag erhalten, der nach Waschen und Trocknen ein Diagramm von Zellulose II erzeugte (vgl. Tafel: Diagramm I).

Nach Scholl gereinigtes Myzel von *Pythium de Baryanum* ergab die stärksten Röntgeninterferenzen der Zellulose I. Nach Auflösung der Zellulose mit Schweizers Reagens blieb ebenfalls ein geringer Rückstand, der wiederum die stärksten Linien des « Baryt »-Diagramms erzeugte.

Myzelien verschiedener *Phytophthora*arten, nämlich *Ph. cambivora* (Petri) Buisman, *Ph. spec.* aus Bohne und *Ph. spec.* aus Erdbeere, wur-

den auf gleiche Weise behandelt und ergaben auch Zellulosedigramme. Nie traten Chitininterferenzen in Erscheinung. Auch mit 24prozentiger Salzsäure ließ sich aus getrockneten und zu Pulver zerstoßenen gereinigten Myzelien von *Pythium* und *Phytophthora*arten nie Chitin herauslösen. Doch lieferten auch die beiden aus Bohne und aus Erdbeere isolierten *Phytophthora*arten einen in Schweizers Reagens unlöslichen Zellwandrückstand, der weder ein Chitin- noch ein Zellulosedigramm, sondern wieder das erwähnte « Baryt »-Diagramm, in einem Fall mit der zusätzlichen Linie (7,7 ÅE), ergab.

Diese in Schweizers Reagens unlöslichen Zellwandrückstände zeigten auch nach stundenlangem Stehenlassen in kalter 24prozentiger Salzsäure keinerlei Auflösungserscheinungen und ließen im Mikroskop meist noch erkennen, daß sie aus äußerst dünnwandigen Hyphenteilen aufgebaut waren. Sie zeigten eine sehr schwache Doppelbrechung zwischen gekreuzten Nicols. Alle üblichen Eiweißreaktionen (Millons, Xanthoprotein, Ninhydrin) gaben mit diesen Rückständen ein negatives Resultat.

Auf alle Fälle enthalten *Pythium de Baryanum* und verschiedene *Phytophthora*arten wohl Zellulose, aber kein Chitin.

Thomas wies ferner in den Zellwänden verschiedener *Fusarium*-arten neben Chitin sehr wenig Zellulose nach (48). Ich überprüfte seine Angaben an *Fusarium oxysporum* Schl. var. *cubense* (E. Sm.) Wr. und *F. bulbigenum* Cke. et Mass. var. *lycopersici* (Brushi) Wr. Die Myzelien wurden nach verschiedenen Verfahren gereinigt (alkoholische Kalilauge nach Thomas, nach Scholl, wässrige Chlordioxydlösung) und ergaben jedesmal ein reines Chitindiagramm. Durch Behandlung mit Schweizers Reagens ließ sich nie Zellulose herauslösen, d. h. beim Ansäuern von Schweizers Reagens, in welchem die gereinigten Myzelien tagelang gelegen hatten, ließ sich kein Niederschlag ausfällen. Zellwandmaterial von *F. oxysporum*, das nach Thomas mit alkoholischer Kalilauge gereinigt worden war, sowie mit Chlordioxydlösung gereinigtes Material von *F. bulbigenum* wurden in 24prozentige Salzsäure gebracht. Das letztere wurde vollständig aufgelöst, während von *F. oxysporum* ein geringer Rückstand blieb. Dieser wurde sorgfältig gewaschen und getrocknet und der Röntgenanalyse unterworfen. Im erhaltenen Diagramm traten neben den stärksten Chitininterferenzen wieder « Baryt »-Linien auf, aber keine Zelluloselinien.

Fusarium enthält demnach Chitin als Zellwandsubstanz, aber keine Zellulose.

Nach Hopkins (22) soll *Mucor Rouxianus* (Calmette) Wehmer in über zehn Tage altem Myzel neben Chitin auch Zellulose bilden, was von Nabel (34) nicht bestätigt werden konnte. Ich untersuchte Myzelien aus Kulturen, die teils weniger, teils mehr als zehn Tage alt waren, und behandelte sie nach den oben geschilderten Verfahren. Immer

wurden Chitindiagramme erzeugt; Zellulose ließ sich nie nachweisen, auch nicht in ganz kleinen Mengen.

Bei keinem der untersuchten Pilze konnte also das von früheren Untersuchern behauptete Vorkommen von Chitin und Zellulose in der gleichen Zellwand bestätigt werden.

Von den *Algen*, die nach der Literatur sowohl Chitin als auch Zellulose bilden (siehe S. 202), wurden folgende untersucht: *Mougeotia spec.*, *Spirogyra spec.*, *Cladophora glomerata* und *Cl. prolifera*.

Bei allen diesen Algen konnte Zellulose ohne Schwierigkeiten röntgenanalytisch nachgewiesen werden. Bei keiner von ihnen konnte jedoch durch Auflösen der Zellulose mit Schweizers Reagens oder durch Behandlung mit 24prozentiger Salzsäure eine Fraktion abgetrennt werden, die ein Chitindiagramm ergeben hätte. Doch wurden auch von Zellwandmaterial jeder dieser Algen wieder außer den Zelluloselinien die schon mehrmals erwähnten « Baryt »-Linien erzeugt, teilweise von völlig unbehandeltem, lediglich getrocknetem Material.

Die Ergebnisse meiner Untersuchungen an *Cladophora*arten stehen in Widerspruch zu den Angaben von Astbury und Preston (3), die bei der Aufklärung der Zellwandstruktur von *Cladophora* röntgenometrisch Chitin festgestellt haben. Außer den Zelluloseinterferenzen traten in ihren Diagrammen weitere Interferenzpunkte auf, die sie als von Chitin herrührend betrachteten. Die von ihnen hauptsächlich untersuchte Art *Cl. prolifera* wurde auch von mir untersucht; mein Material stammte ebenfalls aus dem Golf von Neapel. Es gelang mir jedoch nie, Chitininterferenzen zu erhalten, obwohl ich die Algen nach Angaben der genannten Autoren behandelt hatte. Sowohl Zellwandmaterial von *Cl. prolifera* als auch solches von *Cl. glomerata* ergab zwar in je einem Fall deutlich neben Zelluloselinien noch andere Interferenzen, die aber nicht von Chitin herrühren können, sondern mit den « Baryt »-Linien übereinstimmen.

Auf Grund meiner eigenen Untersuchungen muß ich deshalb feststellen, daß bei allen untersuchten Algen Chitin nicht nur nie neben Zellulose, sondern röntgenometrisch überhaupt nicht nachgewiesen werden kann. Die röntgenometrische Nachweisbarkeitsgrenze in künstlichen Mischdiagrammen von Chitin neben Zellulose liegt allerdings bei 10 bis 15 % Chitin, doch ist dieser Tatsache durch Trennung und Wiederausfällung der beiden Komponenten Rechnung getragen.

2. Das Vorkommen von Chitin und Zellulose im System der Pilze

Da also ein Nebeneinander der beiden Membranstoffe Chitin und Zellulose bei ein und demselben Organismus nicht nachgewiesen werden kann, soll nun die Verteilung dieser Zellwandsubstanzen in den verschiedenen systematischen Gruppen der Pilze betrachtet werden.

Die Ergebnisse dieser systematischen Untersuchungen sind folgende:

a) *Phycomycetes*

1. **Oomycetes** : Über die Peronosporaceen *Pythium* und *Phytophthora* wurde im vorstehenden Kapitel bereits berichtet. Bei allen untersuchten Arten konnten nach entsprechender Vorbehandlung des Zellwandmaterials eindeutige Diagramme von Zellulose beider Modifikationen erhalten werden.

Die Saprolegniaceen *Saprolegnia lapponica* Gäumann und *Achlya caroliniana* Coker ergaben beide nach der Reinigung der Zellwände ein deutliches Zellulose-I-Diagramm. Durch die Umwandlung in die Modifikation II beim Auflösen in Schweizers Reagens und nachherigen Wiederausfällen konnte Zellulose mit aller Eindeutigkeit nachgewiesen werden.

Auch bei *Lagenidium giganteum* Couch konnte Zellulose mit Schweizers Reagens aus den Hyphenwänden herausgelöst und durch das Diagramm der Zellulose II nachgewiesen werden (siehe Tafel: Diagramm I). Ein in Schweizers Reagens unlöslicher Zellwandrückstand ergab ein sehr schönes « Baryt »-Diagramm, dessen stärkste Linien sich schon auf einem Diagramm gezeigt hatten, das am lediglich nach Scholl gereinigten Zellwandmaterial aufgenommen worden war.

Diese Ergebnisse der Untersuchungen an Oomyceten stimmen mit denjenigen früherer Autoren überein, insofern als auch diese bei allen Oomyceten ohne Ausnahme Zellulose als Wandsubstanz gefunden haben. Hingegen konnten nie Chitininterferenzen erhalten werden, wie auch die Vorbehandlung der Zellwände gewesen sein möge. Auch durch 24prozentige Salzsäure ließ sich kein Chitin aus Oomycetenzellwänden herauslösen. Zellulose ist also die ausschließliche kristalline Gerüstsubstanz der Oomycetenmembranen.

Die zu den oogamen Siphonales gehörige Alge *Vaucheria sessilis* wurde ebenfalls untersucht, weil die Oomyceten von solchen Algen abgeleitet werden (14). Es wurden eindeutige Zellulosedigramme erhalten.

Monoblepharidales, die nach der Literatur ebenfalls Zellulosewände besitzen, konnten leider nicht untersucht werden, da es mir nicht möglich war, davon Kulturen zu erhalten.

2. **Blastocladiales** : Aus dieser Reihe der Phycomyceten, deren Vertreter nach N a b e l (34) Chitinmembranen besitzen, konnten zwei Arten untersucht werden; sowohl *Allomyces arbuscula* Butler = *A. Kniepii* Sörgel wie auch *Blastocladiella variabilis* Harder et Sörgel ergaben eindeutige Chitindiagramme.

3. **Zygomycetes** : Unter den Zygomyceten ist *Phycomyces Blakesleeanus* Bgff. (*Mucoraceae*) schon gut untersucht; auch röntgenometrisch

wurde wiederholt festgestellt, daß die Wände seiner Sporangienträger zur Hauptsache aus Chitin bestehen (21, 23). Ich habe deshalb Sporangienträger verschiedener Altersstadien von *Phycomyces* als Vergleichsobjekte benutzt und sie allen von mir je verwendeten Behandlungsmethoden unterworfen. Es wurden von ihnen immer nur reine Chitindiagramme erzeugt. Zellulose ließ sich nie nachweisen, weder ließ sich durch Behandlung gereinigter Zellwände mit Schweizers Reagens Zellulose herauslösen, noch ergab Auflösung des Chitins eine zellulosehaltige Fraktion als Rückstand.

Daß in den Zellwänden von *Mucor Rouxianus* immer nur Chitin, nie Zellulose gefunden wurde, ist bereits ausgeführt worden. Auch *M. racemosus* Fres. (+) und *M. ramannianus* Möll. ergaben eindeutige Chitindiagramme. Die Myzelien aller drei *Mucor*arten erzeugten — nach Scholl gereinigt — Diagramme, die neben den Chitinlinien die stärksten « Baryt »-Linien aufweisen. *Rhizopus bovinus* v. Beyma und *Absidia glauca* Hagen (—) ergaben beide bei der Röntgenanalyse ihrer gereinigten Zellwände Chitininterferenzen.

Auch *Entomophthora coronata* (Cost.) Kevorkian erzeugte schöne Chitindiagramme. Das nach Scholl gereinigte Präparat ergab auch hier wieder neben den Chitinlinien deutliche « Baryt »-Linien.

Basidiobolus ranarum Eidam besitzt nach den mikrochemischen Untersuchungen Nabels Chitinzellwände. Harder (17) trennt ihn aber in einer eigenen Familie *Basidiobolaceae* von den *Entomophthoraceae* ab mit der Begründung, daß er Zellulosemembranen bilde, im Unterschied zu den übrigen *Entomophthoraceae*. Die von mir untersuchten Myzelien von *Basidiobolus*, die auf verschiedenen Nährböden gezüchtet worden waren (Bierwürzeagar, peptonhaltige Nährlösung), ergaben nach der Reinigung immer Chitindiagramme. Zellulose ließ sich nie, auch nicht nach versuchter Anreicherung, nachweisen. *Basidiobolus ranarum* besitzt also, entgegen Harders Feststellung und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen Nabels, Chitinzellwände.

Bei allen untersuchten *Blastocladales* und *Zygomycetes* wurde also immer Chitin und nie Zellulose als Zellwandsubstanz gefunden.

Aus der Reihe der **Chytridiales**, die gewöhnlich als Vorläufer der *Zygomyceten* angesehen werden (14), konnten keine Pilze kultiviert und untersucht werden.

Da aber Gümman (14) den Ursprung der *Chytridiales* bei **Heterokonten** sucht, wurden einige dieser Algen mit in die Untersuchung einbezogen, und es soll an dieser Stelle kurz darüber berichtet werden. Weder bei den beiden untersuchten *Cystococcus*arten (*C.*, isol. Beyerinck, ohne Pyrenoid; *C.* sensu Jaag, isol. Vischer, mit Pyrenoid) noch bei *Hypnomonas* (isol. Pringsheim) konnte Chitin oder Zellulose röntgenanalytisch nachgewiesen werden. Von Zellmaterial aller drei genannten

Algen wurden zwar Röntgeninterferenzen erzeugt, doch entsprachen diese weder Chitin- noch Zelluloselinien und konnten nicht identifiziert werden. Die Diagramme der einzelnen Arten waren auch unter sich verschieden.

Tribonema cf. *bombycinum*, eine mehrzellige fädige Heterokonte, ergab dagegen neben nicht identifizierten Linien eindeutig Zelluloselinien, enthält also in ihren Zellwänden Zellulose, was bisher nicht sicher feststand.

Tabelle 1
Chitin und Zellulose bei Phycomyceten

<i>Oomycetes:</i>	
<i>Pythium de Baryanum</i>	Zellulose
<i>Phytophthora cambivora</i>	»
» <i>sp.</i> aus Bohne	»
» <i>sp.</i> aus Erdbeere	»
<i>Saprolegnia lapponica</i>	»
<i>Achlya caroliniana</i>	»
<i>Lagenidium giganteum</i>	»
<i>Blastocladales:</i>	
<i>Allomyces arbuscula</i> = <i>A. Kniepii</i> . . .	Chitin
<i>Blastocладиella variabilis</i>	»
<i>Zygomycetes:</i>	
<i>Phycomyces Blakesleeanus</i>	Chitin
<i>Mucor Rouxianus</i>	»
» <i>racemosus</i>	»
» <i>ramannianus</i>	»
<i>Rhizopus bovinus</i>	»
<i>Absidia glauca</i>	»
<i>Entomophthora coronata</i>	»
<i>Basidiobolus ranarum</i>	»

b) *Niedere Ascomycetes, Hefen und andere sprossende Pilze*

Durch makrochemische Untersuchungen wies M. Schmidt (42) bei den Endomycetaceen *Eremascus fertilis*, *Endomycopsis capsularis* und *E. fibuliger* Chitin nach, während ihm dies bei *Saccharomyces cerevisiae* (*Saccharomycetaceae*) nicht gelang. Er vermutete, allgemein könnten Myzelhefen Chitin, Sproßhefen kein Chitin haben. Auf Grund mikrochemischer Reaktionen fand aber N a b e l (34) nicht nur bei den niederen Ascomyceten allgemein, sondern auch innerhalb der Sproßhefen (*Saccharomyceten*) uneinheitliche Verhältnisse, indem die meisten Sproßhefen zwar weder Chitin- noch Zellulosereaktion zeigten, bei *Pichia membranaefaciens* und *Saccharomycodes Ludwigii* jedoch eindeutige Chitinreaktion auftrat. Sprossende Pilze aus anderen Verwandtschaftsgruppen (*Ustilago*, *Taphrina*) zeigten alle Chitinreaktion. Bei *Eremascus fertilis*

und den Myzelhefen konnte auch N a b e l Chitin nachweisen, fand dieses jedoch nicht bei den nahverwandten Spermophthoraceen *Spermophthora gossypii* und *Eremothecium Ashbyii*.

Meine röntgenanalytischen Untersuchungen dieser niederen Ascomyceten und besonders der sprossenden Pilze zeitigten folgende Ergebnisse :

1. **Endomycetaceae** : Die nach S c h o l l gereinigten Zellwände von *Eremascus fertilis* Stoppel erzeugten ein Chitindiagramm, und *Endomyces decipiens* (Tul.) Reess ergab ebenfalls Chitinlinien. Ein eindeutiges Chitindiagramm wurde bei letzterem erst erhalten von einem Niederschlag aus Salzsäure, mit der das Myzel behandelt worden war. Während das untersuchte Zellmaterial von *Endomyces decipiens* nur aus Hyphen bestand, enthielt dasjenige von *Endomycopsis capsularis* (Schön.) Dekk. daneben auch zahlreiche Sproßzellen. Auch diese Myzelhefe lieferte nach der Reinigung nach S c h o l l Chitininterferenzen. Nach stundenlanger Behandlung mit 24prozentiger Salzsäure blieb jedoch eine beträchtliche, rein weiß erscheinende Menge des Myzels ungelöst zurück. Dieser Rückstand ließ sich auch durch neue 24prozentige Salzsäure nicht auflösen, jedoch erfolgte in 36prozentiger Säure bei Zimmertemperatur allmähliche Auflösung. Aus dieser Lösung ließ sich aber weder durch Verdünnen mit Wasser noch durch Zufügen von Lauge bis zur Neutralisation ein Niederschlag ausfällen, während aus der ersten Lösung in 24prozentiger Säure durch bloßes Verdünnen ein ansehnlicher Niederschlag gewonnen wurde, der ein gutes Chitindiagramm erzeugte. Es konnte sich bei dem Rückstand also nicht um Chitin handeln. Dessen neutralisierte Lösung ergab eine schwache positive Fehling-Reaktion. Ein Teil des ungelösten Rückstandes wurde der Röntgenanalyse unterworfen, erwies sich aber als vollständig amorph.

2. **Saccharomycetaceae** : *Saccharomyces ellipsoideus* Hansen, Stamm *alpinus* Steiner wurde nach verschiedenen Reinigungsverfahren behandelt. Sowohl unbehandeltes, lediglich mit destilliertem Wasser gewaschenes, als auch mit Chlordioxydlösung extrahiertes Zellmaterial ergab unbrauchbare, mit starker diffuser Grundschwärzung bedeckte Diagramme. Bessere Resultate wurden mit der Reinigung nach S c h o l l erzielt. Die Wände der Sproßzellen waren nach dieser Behandlung noch intakt und die Zellinhaltsstoffe herausgelöst bis auf ein oder mehrere körnige Körperchen pro Zelle. Bei der Röntgenanalyse erzeugte dieses Material aber nie ein Chitindiagramm, und auch Zelluloselinien traten nie auf. Doch wurden immer wieder Diagramme erhalten, welche die auch bei andern Pilzen beobachteten « Baryt »-Linien aufwiesen. Außerdem enthielten die meisten Diagramme die ebenfalls früher schon erwähnte zirka 7,7 ÅE Netzebenenabstand entsprechende Linie. Mit 24prozentiger Salzsäure ließ sich dieses Zellmaterial nicht auflösen. Nach

mehrständiger Säurebehandlung wurde es abzentrifugiert, gewaschen und getrocknet und erzeugte nun ein sehr linienreiches « Baryt »-Diagramm mit der erwähnten zusätzlichen Linie. Aus der verwendeten Salzsäure ließ sich nach der Behandlung kein Niederschlag ausfällen durch Verdünnen oder Neutralisieren.

Nach Scholl gereinigtes Zellmaterial von *S. mikroellipsoideus* Osterwalder, *S. tubiformis* Osterwalder, *S. torulosus* Osterwalder, *Schizosaccharomyces liquefaciens* Osterwalder und *Sch. mellacei* Jörgensen ergab immer wieder die « Baryt »-Linien und daneben die Linie 7,7 Å. Chitin- oder Zelluloselinien wurden nie erzeugt.

Auch *Saccharomyces cerevisiae* Hansen, Rasse saké (Yabe) ergab nach Scholl gereinigt das « Baryt »-Diagramm mit der angeführten zusätzlichen Linie. Auch bei dieser Sproßhefe wurde versucht, möglicherweise doch vorhandenes Chitin herauszulösen, doch ohne Erfolg.

Das in 24prozentiger Salzsäure ungelöst gebliebene Zellmaterial erzeugte wiederum ein linienreiches « Baryt »-Diagramm.

Zygosaccharomyces vini Maganiski erzeugte in zwei Fällen, in denen das Zellmaterial aus verschiedenen alten Kulturen stammte und nach Scholl gereinigt worden war, ein dem Chitindiagramm sehr ähnliches Diagramm. Dieses wies jedoch gewisse Unterschiede gegenüber dem Interferenzspektrum von Chitin auf und konnte nicht mit diesem identifiziert werden. In einem Fall waren auch mit « Baryt »-Linien übereinstimmende Interferenzen vorhanden. Gegenüber 24prozentiger Salzsäure verhielt sich das Zellmaterial von *Z. vini* vollkommen resistent. Nie gelang es, mit Salzsäure Chitin herauszulösen und dieses durch Verdünnen wieder auszufällen. Offenbar besitzt auch *Zygosaccharomyces* einen von Chitin und Zellulose verschiedenen Zellwandstoff.

Pichia membranaefaciens Hansen konnte ebenfalls untersucht werden. Nach der Scholl'schen Extraktion blieb jeweils nur eine sehr geringe Menge Zellmaterial zurück, die aber kein Chitindiagramm ergab, sondern wiederum die « Baryt »-Linien. Mit 24prozentiger Salzsäure ließ sich auch hier kein Chitin isolieren.

Bei allen untersuchten Saccharomycetaceen konnte also kein Chitin nachgewiesen werden. Ihre Membran besteht aus einem von Chitin und Zellulose verschiedenen Zellwandstoff.

3. Spermophthoraceae : Bei der Reinigung nach Scholl wurden die Myzeldecken von *Ashbya gossypii* (Ashby et Nowell) Guill. in der kochenden 10prozentigen Kalilauge fast restlos aufgelöst. Der minime Rückstand, der nach der vollständigen Vorbehandlung noch gefaßt werden konnte, erzeugte bei der Röntgenanalyse nur wenige, schwache Interferenzen, die mit solchen des « Baryt »-Diagramms übereinstimmen. Andere Myzelien des gleichen Pilzes wurden mit wässriger Chlordioxyd-

lösung und darauf mit 2prozentiger wässriger Natriumsulfitlösung behandelt. Wiederum blieb nur ein geringer Rückstand, der nun ein ziemlich linienreiches « Baryt »-Diagramm mit der zusätzlichen Interferenz, entsprechend 7,7 ÅE Netzebenenabstand, ergab.

Auch die Myzelien von *Eremothecium Ashbyii* Guill. hinterließen nach der Extraktion nur einen geringfügigen Rückstand, der wiederum ein sehr schönes « Baryt »-Diagramm und dazu die Linie von 7,7 ÅE erzeugte.

Die untersuchten Spermophthoraceen bilden also kein Chitin.

4. Imperfekte Hefen und andere sprossende Pilze. Präparate aus nach Scholl gereinigten Sproßzellen von *Torula utilis* Henneberg, *T. pulcherrima* Lindner, *Rhodotorula rubra* Lodder und *Mycoderma vini* Desm. erzeugten nie ein Chitindiagramm. Dagegen traten auch bei diesen Hefen immer « Baryt »-Linien auf. Die Diagramme von *Torula pulcherrima* und *Mycoderma vini* zeigten daneben einige weitere nicht identifizierte Interferenzlinien, worunter wieder diejenige von 7,7 ÅE, die auch bei *Rhodotorula rubra* in Erscheinung trat.

Aus der Familie der *Ustilaginaceae* (*Basidiomycetes*), deren Vertreter ebenfalls zur Bildung von Sproßmyzel befähigt sind, wurde *Ustilago violacea* (Pers.) Fckl. untersucht. Sproßmyzel dieses Brandpilzes wurde nach Scholl gereinigt und ergab bei der Röntgenanalyse nicht ein Chitin-, sondern ein linienreiches « Baryt »-Diagramm. Die gereinigte Zellmasse wurde einige Stunden mit kalter 24prozentiger Salzsäure behandelt, doch wurde sie dabei nicht aufgelöst, und aus der Säure ließ sich kein Chitin ausfällen. Das in der Salzsäure ungelöst gebliebene Zellmaterial erzeugte wiederum ein typisches « Baryt »-Diagramm. *Ustilago violacea* enthält also, wenigstens in den Sproßzellen, kein Chitin.

Sporobolomyces roseus Kluyver et v. Niel ist ein sprossender, hefeähnlicher Pilz, der auch Ähnlichkeiten mit gewissen Basidiomyceten besitzt, aber nicht sicher eingeordnet werden kann. G ä u m a n n (14) wirft die Frage auf, ob *Sporobolomyces* vielleicht einen sprossenden Brandpilz darstelle.

Nach Scholl gereinigtes Sproßmyzel dieses Pilzes ergab ein eindeutiges Chitindiagramm. Aus dem extrahierten Zellmaterial konnte ohne Schwierigkeiten mit 24prozentiger Salzsäure Chitin herausgelöst werden, welches beim Verdünnen als weiße, flockige Masse wieder ausfiel und nach dem Waschen und Trocknen ein zwar mit starker Grundschwärzung versehenes, aber eindeutiges Chitindiagramm erzeugte.

Tabelle 2

Chitin und Zellulose bei niederen Ascomycetes, Hefen und anderen sprossenden Pilzen

<i>Endomycetaceae:</i>	
<i>Eremascus fertilis</i>	Ch ¹ , keine Z ²
<i>Endomyces decipiens</i>	» » »
<i>Endomycopsis capsularis</i>	» » »
<i>Saccharomycetaceae:</i>	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	kein Ch, keine Z
» <i>ellipsoideus</i>	» » » »
» <i>mikroellipsoideus</i>	» » » »
» <i>tubiformis</i>	» » » »
» <i>torulosus</i>	» » » »
<i>Schizosaccharomyces liquefaciens</i>	» » » »
» <i>mellacei</i>	» » » »
<i>Zygosaccharomyces vini</i>	» » » »
<i>Pichia membranaefaciens</i>	» » » »
<i>Spermophthoraceae:</i>	
<i>Ashbya gossypii</i>	» » » »
<i>Eremothecium Ashbyii</i>	» » » »
<i>Imperfekte Hefen:</i>	
<i>Torula utilis</i>	» » » »
» <i>pulcherrima</i>	» » » »
<i>Rhodotorula rubra</i>	» » » »
<i>Mycoderma vini</i>	» » » »
<i>Andere sprossende Pilze:</i>	
<i>Ustilago violacea</i>	» » » »
<i>Sporobolomyces roseus</i>	Ch, keine Z

¹ Ch = Chitin. ² Z = Zellulose.

c) Höhere Ascomycetes und Basidiomycetes

Alle untersuchten höheren Ascomyceten, nämlich *Aspergillus Wentii* Wehmer, *A. oryzae* (Ahlb.) Cohn, *Trichoderma viride* Pers. ex Fr., *Nectria cinnabarina* (Tode) Fr. und *Sclerotinia fructicola* (Wint.) Rehm. ergaben eindeutige Chitindiagramme. Zellulose ließ sich auch bei ihnen nie nachweisen. Das nach Scholl extrahierte Myzel von *Sclerotinia fructicola* erzeugte lediglich ein linienreiches « Baryt »-Diagramm und dazu die Interferenzlinie von 7,7 ÅE, jedoch keine Chitinlinien. Chitin konnte erst nachgewiesen werden, als das Myzel in 24prozentiger Salzsäure teilweise aufgelöst und aus dieser Lösung durch Verdünnen ein Niederschlag gewonnen worden war, welcher ein eindeutiges Chitindiagramm erzeugte. Der in der Säure nicht aufgelöste Rückstand ergab die zwei stärksten Linien des « Baryt »-Diagramms.

Von den Basidiomyceten *Hypoholoma fasciculare* (Huds. ex Fr.) Quéél. und *Coprinus atramentarius* Bull. ex Fr. wurden im Freien gesam-

melte Fruchtkörper untersucht. Sie wurden nach Scholl extrahiert und ergaben eindeutige Chitindiagramme. Nach Auflösung der gereinigten Zellwandmassen in 24prozentiger Salzsäure blieb kein zellulosehaltiger Rückstand.

3. Ein merkwürdiger kristalliner Zellstoff bei Pilzen und Algen

In den beiden vorstehenden Kapiteln wurde geschildert, wie von gewissen Zellmembranen oder deren Rückständen in Lösungsmitteln an Stelle eines Chitin- oder Zellulosedigramms wiederholt ein ganz anderes, linienreiches Interferenzsystem erzeugt wurde. Die Linien dieses Diagrammes traten immer wieder in genau gleicher Kombination auf, so daß angenommen werden mußte, daß sie alle von ein und derselben kristallinen Substanz stammen. Schließlich stellte sich heraus, daß das fragliche Diagramm sehr gut mit dem Diagramm von Baryt (Bariumsulfat) übereinstimmt. In der nachstehenden Tabelle sollen die Zahlenwerte der den einzelnen Interferenzen entsprechenden Netzebenenabstände in ÅE mit den zugehörigen relativen Intensitäten für beide Diagramme zum Vergleich aufgeführt werden (vgl. auch Tafel III, Diagramme III und IV).

Da zwischen den beiden Diagrammen trotz der Übereinstimmung noch geringe Unterschiede bestehen und für die Erzeugung eines solchen Diagramms grundsätzlich auch noch andere im Baryttypus kristallisierende Substanzen in Frage kommen, soll hier die Frage noch offen gelassen werden, ob es sich bei dem Zellstoff tatsächlich um Baryt handelt. Leider war es bis jetzt nicht möglich, dies auf Grund von mit anderen Methoden durchgeführten Untersuchungen zu entscheiden.

Daß dieser Stoff wirklich in den Zellen oder Zellwänden verschiedener Pilze und Algen vorkommt und nicht bloß eine durch die Präparation entstandene Verunreinigung ist, geht aus folgenden Beobachtungen hervor :

1. Bei genau gleicher Präparationsart wurde vom Zellmaterial der einen Organismen ein reines Chitin- oder Zellulosedigramm erzeugt, von demjenigen anderer aber ein reines «Baryt»-Diagramm.
2. Das gleiche Zellwandmaterial, auf verschiedene Arten präpariert, ergab immer wieder das « Baryt »-Diagramm.
3. Unbehandelte, nur getrocknete Zellen der Alge *Spirogyra* erzeugten ebenfalls die stärksten « Baryt »-Linien. E. Nicolai¹ (zurzeit in Leeds) erhielt bei Untersuchungen über die Zellwandstruktur von *Spirogyra* von lebensfrischem Material ein Faserdiagramm, das neben Interferenzpunkten der Zellulose auch noch weitere Interferenzen enthielt, welche nach den daraus berechneten Netz-

¹ Mündliche Mitteilung.

ebenenabständen sehr gut mit den « Baryt »-Interferenzen übereinstimmen. Die aus dem Faserdiagramm abzuleitende Orientierung der « Baryt »-Kristallite läßt eine Einlagerung in die Zellwand als möglich erscheinen.

Tabelle 3

Baryt ¹		Zellstoff ²	
Int. ³	d in ÅE	Int. ³	d in ÅE
s	4,35	s	4,34
s	3,89	s	3,90
ss	3,57	s	3,56
st	3,44	st	3,44
m	3,31	m	3,31
st	3,10	st	3,10
m	2,83	m	2,82
m	2,72	m	2,72
s	2,47	ss	2,46
ss	2,31	ss	2,32
	⁴	ss	2,27
s	2,20	s	2,20
sst	2,10	sst	2,10
ss	2,04	s	2,05
ss	1,92	ss	1,94
s	1,85	s	1,85
ss	1,74	ss	1,75
s	1,67	s	1,67
ss	1,63	ss	1,63
ss	1,58	ss	1,59
s	1,52	s	1,53
ss	1,465	ss	1,471
s	1,420	s	1,421
		ss	1,400
		ss	1,380
		ss	1,317
		ss	1,295
s	1,255	s	1,257
		ss	1,217
ss	1,190	ss	1,195
		ss	1,144
		ss	1,122
ss	1,093	ss	1,093
ss	1,028	ss	1,028

¹ Nach dem « Alphabetical Index of X-Ray Diffraction Patterns » (2).

² *Schizosaccharomyces liquefaciens*, nach Scholl gereinigt.

³ Intensität: s = schwach; ss = sehr schwach; m = mittel; st = stark; sst = sehr stark.

⁴ Die unter Baryt nicht aufgeführten Linien sind in unserem Vergleichsdiagramm von Baryt ebenfalls enthalten (siehe Tafel III: Diagramm III und IV).

Die Doppelbrechung, die sich an Oomyceten-Zellwandrückständen erkennen ließ, könnte zum Teil von diesem anorganischen Wandstoff stammen. Andererseits enthielt das nach Scholl gereinigte Hefezellmaterial, welches « Baryt »-Diagramme erzeugte, im Zellinneren gelegene, im Mikroskop gerade noch erkennbare körnige Körperchen, die sich, im Gegensatz zum übrigen Zellinhalt, nicht aufgelöst hatten und vielleicht als Erzeuger der « Baryt »-Interferenzen in Frage kommen.

III. Vergleich der röntgenanalytischen Ergebnisse mit mikrochemischen Reaktionen

Da sowohl Nabel (34) als auch Thomas (48, 49, 50) ein Nebeneinander von Chitin und Zellulose in der gleichen Zellwand mit der mikrochemischen Reaktion nach van Wisselingh (57, 58) nachgewiesen haben, wurde mit sämtlichen röntgenanalytisch untersuchten Pilzen und Algen auch die mikrochemische Jodfärbungsreaktion der Zellwände nach dem Verfahren von Wisselingh ausgeführt (siehe I, 2), um die Zuverlässigkeit dieser Methode überprüfen zu können.

In den meisten Fällen zeigte sich Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der mikrochemischen und der röntgenanalytischen Untersuchungen. Es kamen jedoch auch wesentliche Abweichungen vor, die im folgenden dargestellt werden.

1. Oomyceten

Die in Schweizers Reagens unlöslichen Zellwandrückstände von *Pythium* und *Phytophthora*, die Thomas erhalten hatte, zeigten nach seinen Angaben Chitosanreaktion, nachdem er sie 30 Minuten in gesättigter Kalilauge gekocht hatte.

Bei meinen eigenen Untersuchungen an *Pythium de Baryanum* konnte ich jedoch auf mikrochemischem Wege Chitin nicht nachweisen. Der in Schweizers Reagens unlösliche Myzelrückstand dieses Pilzes löste sich beim Erhitzen in 50prozentiger Kalilauge in der zugeschmolzenen Ampulle auf 160 bis 180° C während 20 Minuten vollständig auf. Allerdings hatte er vor dieser Behandlung beim Zusatz von Jodjodkalilösung und verdünnter Schwefelsäure (1 %) eine schwache rotviolette Farbe angenommen, die sich in Gegenwart von konzentrierter Säure (70 %) in ein tiefes Blau umwandelte. Der unbehandelte Rückstand zeigte also die Farbreaktionen von Chitosan und Zellulose. Diese beiden Membranstoffe hätten aber das Erhitzen in konzentrierter Kalilauge nach van Wisselingh gut überstehen müssen. Auch die Röntgenanalyse dieses Rückstandes ergab, wie bereits angegeben, weder ein Chitin- oder Chitosan- noch ein Zellulosedigramm. Der Rückstand ließ sich auch nicht

in 24prozentiger Salzsäure auflösen, muß also von Chitin und Zellulose verschieden sein.

Noch deutlicher zeigte der Rückstand von *Phytophthora cambivora*, der sich in Schweizers Reagens nicht gelöst hatte, sowohl Chitosan- als auch Zellulosefärbung. Nach der erwähnten für die Chitosanreaktion notwendigen Vorbehandlung färbte er sich bei Zusatz von Jodjodkalium mit verdünnter Schwefelsäure intensiv rotviolett, um dann mit konzentrierter Säure tiefblau zu werden. Doch auch dieser Membranrückstand ergab kein Chitindiagramm, sondern lediglich einige Linien, die mit denjenigen der Zellulose II übereinstimmen.

Zur Kontrolle wurden Zellulosefasern aus Filterpapier ebenfalls nach v a n W i s s e l i n g h behandelt. Diese zeigten aber mit verdünnter Säure und Jodjodkalilösung noch keinerlei Reaktion, sondern ergaben erst mit konzentrierter Säure die typische Zellulosefärbung.

Nicht extrahierte Myzelstückchen von *Achlya caroliniana*, die nach v a n W i s s e l i n g h vorbereitet worden waren, nahmen mit Jodjodkalium und verdünnter Schwefelsäure ebenfalls die typische rotviolette Chitosanfärbung an. Nach Zugabe von konzentrierter Säure färbten sich die Hyphen blau, zeigten also auch Zellulosereaktion. Röntgenanalytisch konnte auch bei *Achlya* kein Chitin, sondern nur Zellulose nachgewiesen werden. Das nach S c h o l l gereinigte Myzel löste sich in Schweizers Reagens vollständig auf.

2. Sprossende Pilze

Die Saccharomycetaceen erwiesen sich in ihren mikrochemischen Reaktionen als uneinheitlich :

Saccharomyces mikroellipsoideus, *Schizosaccharomyces mellacei*, *Zygosaccharomyces vini* und *Pichia membranaefaciens* zeigten nicht ganz eindeutige, *Saccharomyces tubiformis* aber deutliche und alle andern Arten keine Chitosanreaktion.

Gleich lagen die Verhältnisse bei den imperfekten Hefen. Hier ergaben *Torula utilis* und *Rhodotorula rubra* eindeutige Chitosanreaktion, während diese bei *Torula pulcherrima* und *Mycoderma vini* ausblieb. Makrochemisch-röntgenanalytisch konnte bei keiner der untersuchten Sproßhefen Chitin nachgewiesen werden.

Der in 24prozentiger Salzsäure ungelöst gebliebene Zellwandrückstand von *Endomycopsis capsularis*, der keine Röntgeninterferenzen erzeugte und auf Grund der Löslichkeitsverhältnisse nicht als Chitin angesehen werden kann, zeigte eine sehr schöne Chitosanreaktion.

Ein klarer Beweis für die Unzuverlässigkeit der mikrochemischen Chitosanreaktion nach v a n W i s s e l i n g h ergibt sich aus dem Vergleich der Reaktionen und röntgenanalytischen Ergebnisse bei den beiden sprossenden Pilzen *Ustilago violacea* und *Sporobolomyces roseus*.

Beide Sproßpilze zeigten in allen Wiederholungen immer wieder eindeutig positive Chitosanreaktion. (Auch für *Ustilago zae* gibt Nabel auf Grund der mikrochemischen Reaktion Chitin an.) Bei der Röntgenanalyse konnte aber von *Ustilago violacea* kein Chitin- (und auch kein Zellulose-) Diagramm, sondern nur immer wieder das schon oft erwähnte « Baryt »-Diagramm erhalten werden. Es könnte nun der Einwand vorgebracht werden, daß in den Sproßzellmembranen von *Ustilago violacea* wohl Chitin vorhanden sei, röntgenanalytisch aber nicht nachgewiesen werden könne, weil es nicht in kristalliner Form vorliege. Doch auch mit 24prozentiger Salzsäure ließ sich aus dem nach Scholl gereinigten Sproßmyzel kein Chitin herauslösen. Demgegenüber erzeugten die nach Scholl gereinigten Sproßzellen von *Sporobolomyces roseus* bei der Röntgenanalyse ein eindeutiges Chitindigramm. Auch ließ sich mit 24prozentiger Salzsäure das gereinigte Zellwandmaterial ohne weiteres zum größten Teil auflösen. Aus der Lösung konnte durch Verdünnen ein Niederschlag ausgefällt werden, welcher durch ein Röntgendiagramm als Chitin identifiziert wurde.

Chitin ist also bei *Sporobolomyces roseus* in den Sproßzellmembranen vorhanden, bei *Ustilago violacea* nicht, und doch ergeben beide Sproßpilze die gleiche positive Chitosanreaktion nach van Wisselingh.

3. Heterokonten

Daß auch die Blaufärbung von Zellwänden als Reaktion auf Zusatz von Jodjodkalilösung und konzentrierter Schwefelsäure nicht eindeutig Zellulose nachweist, zeigen einige Beobachtungen über mikrochemische Reaktionen von Heterokonten.

Bei frischen Zellen von *Cystococcus* isol. Beyerinck konnte nach Zugabe von Jodjodkalilösung und konzentrierter Schwefelsäure eine Blaufärbung der Membranen beobachtet werden, die auch an extrahierten Zellen auftrat, nachdem diese je sechs Stunden in 0,1-n-Salzsäure und 0,1-n-Natronlauge gekocht worden waren. Nachdem die Zellen jedoch der Vorbehandlung für die Chitosanreaktion nach van Wisselingh unterworfen worden waren, konnte keine Reaktion mehr beobachtet werden. Das Röntgendiagramm sowohl der unbehandelten wie der extrahierten Zellen enthielt keine Zelluloselinien.

Cystococcus isol. Vischer ergab im frischen Zustand keine Reaktion der Membranen mit Jodlösung und konzentrierter Schwefelsäure. Nach der van Wisselingh-Behandlung konnte jedoch eine deutliche Zellulosereaktion beobachtet werden, indem sich die Zellmembranen mit Jodjodkali und konzentrierter Schwefelsäure blau färbten. Bloß mit verdünnter Säure und Jodlösung behandelt, zeigten sie noch keine Reaktion. Doch auch von diesem Material wurden keine Röntgeninterferenzen der Zellulose erzeugt.

Tribonema cf. *bombycinum* zeigte die gleichen Reaktionen wie *Cystococcus* isol. Vischer. Eine Zellulosefärbung konnte auch hier erst nach der Behandlung nach v a n W i s s e l i n g h erhalten werden. Diese Alge erzeugte aber bei der Röntgenanalyse eindeutige Zelluloseinterferenzen.

Auch von der einzelligen Alge *Chlorochytridion tuberculatum* (53) erhielten B r a n d e n b e r g e r und F r e y - W y ß l i n g (5) deutliche Zelluloseinterferenzen, obwohl hier Zellulose mikrochemisch nicht hatte nachgewiesen werden können.

Wäre in den Membranen der untersuchten *Cystococcus*arten Zellulose vorhanden, so hätte sie sich sicherlich auch bei diesen Einzellern röntgenanalytisch nachweisen lassen. Obwohl also bei ihnen Zellulose fehlt, zeigten ihre Membranen unter bestimmten Bedingungen Zellulosereaktion.

IV. Besprechung der Ergebnisse

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist wohl, daß kein Organismus gefunden werden konnte, der sowohl Chitin als auch Zellulose als Membranstoff besitzt.

Rhizidiomyces bivellatus Nabel, der die Grundlage für H a r d e r s und N a b e l s Einwendungen gegen W e t t s t e i n s Annahme einer stammesgeschichtlichen Bedeutung des Zellwandchemismus bildete, weil er sowohl Chitin- als auch Zellulosereaktion zeigte, konnte allerdings leider nicht röntgenanalytisch untersucht werden. Nachdem jedoch bei allen anderen Pilzen und Algen, für die auf Grund ähnlicher Beobachtungen ebenfalls ein Nebeneinander der beiden Zellwandsubstanzen angegeben wurde, dieses nicht bestätigt werden konnte, wäre *Rhizidiomyces bivellatus* der einzige bekannte Organismus mit beiden Membranstoffen. Es konnte nun aber durch den Vergleich der mikrochemischen Reaktionen nach v a n W i s s e l i n g h mit röntgenanalytischen Ergebnissen gezeigt werden, daß die mikrochemische Nachweismethode für Chitin und Zellulose, die auch bei *Rhizidiomyces bivellatus* angewendet worden ist, nicht absolut zuverlässig ist. N a b e l s Beobachtungen an *Rhizidiomyces* kann daher kein Gewicht mehr beigemessen werden, und der gewichtigste Einwand gegen die Theorie F. v o n W e t t s t e i n s fällt dahin. Auf Grund dieser röntgenanalytischen Untersuchungsergebnisse darf der Membranchemismus wohl — ohne überbetont zu werden — bei der Diskussion verwandtschaftlicher Beziehungen unter den Pilzen mit berücksichtigt werden.

Die strenge Trennung des Vorkommens von Chitin und Zellulose nach systematischen Einheiten in der Klasse der *Phycomycetes*, auf die F. v o n W e t t s t e i n seine stammesgeschichtlichen Erwägungen aufgebaut hatte, konnte röntgenanalytisch ebenfalls bestätigt werden (vgl.

Tabelle 1). Der Verteilung der beiden Membransubstanzen im System der Pilze darf daher wohl systematische und stammesgeschichtliche Bedeutung zugesprochen werden.

Was nun diese Verteilung im einzelnen betrifft, verdient folgendes hervorgehoben zu werden :

Chitin konnte bei verschiedenen (autotrophen) Algen nicht nachgewiesen werden; es ist der charakteristische Membranstoff der heterotrophen Pilze.

Zellulose wurde unter den Pilzen nur bei Oomyceten gefunden (abgesehen von den *Monoblepharidales*, welche nicht untersucht werden konnten). Vom membranchemischen Standpunkt aus gesehen nehmen daher die Oomyceten eine absolute Sonderstellung gegenüber allen anderen Pilzgruppen ein. Ihre vollständige Loslösung vom übrigen Pilzsystem und die Annahme einer selbständigen, von anderen Reihen ganz unabhängigen Entwicklung der Reihe der Oomyceten aus autotrophen Algen, wie sie G ä u m a n n darstellt (14), wird also auch durch den Zellwandchemismus gestützt.

Falls es möglich werden sollte, in den Membranen von *Monoblepharidales* Zellulose röntgenanalytisch nachzuweisen, müßte wohl die systematische Stellung dieser Reihe einer erneuten Überprüfung unterzogen werden. Jedenfalls dürfte sie dann — membranchemisch betrachtet — nicht mit den chitinführenden *Blastocladiales* vereinigt werden.

N a b e l stützte seine Ablehnung einer systematischen Bedeutung des Zellwandchemismus auch auf die uneinheitlichen Reaktionen, die er bei niederen Ascomyceten — vor allem Hefen — beobachtet hatte. Nun hat aber die Röntgenanalyse dieser Pilzgruppen gezeigt, daß auch hier das Auftreten von Chitin innerhalb einzelner Familien konstant, der Membranchemismus somit einheitlich ist. In der Reihe der *Endomycetales* wurde Chitin bei allen untersuchten Vertretern der Familie *Endomycetaceae* gefunden. Es fehlte aber sämtlichen Vertretern der aus ihr abgeleiteten Familie der *Saccharomycetaceae*. Die Vermutung M. S c h m i d t s (42), wonach Myzelhefen Chitin bilden, Sproßhefen hingegen nicht, wird dadurch bestätigt. Allerdings scheint das Fehlen von Chitin nicht direkt mit der Sproßzellbildung zusammenzuhängen, da auch bei hyphenbildenden Spermophthoraceen Chitin nicht gefunden wurde, dieses andererseits aber in den Membranen der Sproßzellen von *Sporobolomyces roseus* vorhanden ist. Chitin fehlt zwar auch bei den imperfekten Sproßhefen und im Sproßmyzel von *Ustilago violacea*.

Vielleicht könnte das Fehlen von Chitin in verschiedenen Familien im Sinne W e t t s t e i n s durch eine im System mehrmals auftretende Verlustmutation erklärt werden, die besonders häufig, aber nicht immer, zusammen mit dem Übergang zur Sproßmyzelbildung vorkommt. Interessant scheint mir jedenfalls, daß die Familien, welche diesen Verlust

der Fähigkeit zur Chitinbildung zeigen, stets Endformen umfassen, von denen aus die Entwicklung nicht mehr weitergeht (vgl. 14). Ob in der Familie der *Ustilaginaceae* Chitin vollständig oder nur in den Sproßmyzelien fehlt, müßte wohl an umfassenderem Material noch genauer untersucht werden. Vielleicht könnten auch noch andere Endformen gefunden werden, bei denen Chitin fehlt.

Ob an Stelle von Chitin bei diesen verschiedenen Pilzgruppen mehrere verschiedene Zellwandstoffe treten, oder ob es sich meist um den gleichen handelt, konnte mit den verwendeten Methoden nicht abgeklärt werden. Nach der Reinigung nach Scholl bleiben bei den Saccharomycetaceen sowie den imperfekten Hefen und bei *Ustilago violacea* zusammenhängende Membranen zurück, während die Zellwände der Spermophthoraceen aufgelöst wurden.

Möglicherweise rührt die Interferenzlinie von 7,7 ÅE, die stets zusammen mit « Baryt »-Linien auftrat, von einem dieser unbekanntem Wandstoffe her.

Gesamthaft spricht die Verteilung von Chitin und Zellulose im Pilzsystem also für einen polyphyletischen Ursprung der Pilze. Die monophyletische Entwicklungsreihe in der Klasse der Phycomyceten, die von Kniep aufgestellt und von Harder und Nabel unterstützt wurde, muß vom zellwandchemischen Standpunkt aus — abgesehen von morphologisch-entwicklungsgeschichtlichen Einwänden — abgelehnt werden.

V. Zusammenfassung

1. Mit der Röntgenanalyse als heute zuverlässigster Nachweismethode für Chitin und Zellulose in Zellwänden wurde das Vorkommen dieser beiden Membranstoffe bei den Pilzen im Hinblick auf seine mögliche, von F. von Wettstein hervorgehobene stammesgeschichtliche Bedeutung untersucht.
2. Gleichzeitig wurde die von früheren Autoren meist verwendete mikrochemische Nachweismethode nach van Wisselingh durch Vergleich mit den röntgenanalytischen Ergebnissen auf ihre Zuverlässigkeit geprüft.
3. Es ergab sich aus diesem Vergleich, daß aus den mikrochemischen Reaktionen einer Zellwand nicht mit absoluter Sicherheit geschlossen werden kann, ob sie Chitin und/oder Zellulose enthält.
4. Röntgenanalytisch wurde — in Verbindung mit makrochemischen Methoden — in keinem der untersuchten Organismen ein Nebeneinander von Chitin und Zellulose gefunden, auch da nicht, wo es frühere Autoren mikrochemisch (und zum Teil makrochemisch) nachgewiesen haben.

Entsprechend den Feststellungen F. von Wettsteins scheinen sich also die beiden Membransubstanzen tatsächlich gegenseitig auszuschließen.

5. Die scharfe Trennung der Phycomycetes in Chitin- und Zellulosepilze, die F. von Wettstein fand, wird durch die Röntgenanalyse bestätigt, indem Zellulose nur bei Oomycetes, Chitin bei Blastocladiales und Zygomycetes nachweisbar ist (Chytridiales und Monoblepharidales konnten nicht untersucht werden).
6. Bei den niederen Ascomycetes ist das Auftreten oder Fehlen von Chitin innerhalb einzelner Familien einheitlich. Chitin ist vorhanden bei den Endomycetaceae, fehlt aber allen untersuchten Saccharomycetaceae und Spermophthoraceae. Zellulose tritt hier jedoch nicht an die Stelle von Chitin.
7. Aus den Ergebnissen der röntgenanalytischen Untersuchungen wird daher der Schluß gezogen, daß dem Auftreten von Chitin und Zellulose bei den Pilzen stammesgeschichtliche Bedeutung zukomme. Diese Bedeutung, vor allem für die systematische Stellung der Oomycetes, wird diskutiert.
8. Verschiedene Algen und Pilze enthalten in ihren Zellen oder deren Membranen eine anorganische Substanz, deren Röntgendiagramm mit dem von Bariumsulfat (Baryt) übereinstimmt.

Literaturverzeichnis

1. Abderhalden, E.: Handb. biolog. Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 5, S. 343.
2. American Society for Testing Materials. Alphabetical Index of X-Ray Diffraction Patterns, Philadelphia (1945).
3. Astbury, W. T., and Preston, R. D.: The Structure of the Cell Wall in Some Species of the Filamentous Green Alga *Cladophora*. Proc. Roy. Soc. London, B **129**, 54 (1940).
4. Brandenberger, E.: Röntgenographisch-analytische Chemie. Basel (1945).
5. — und Frey-Wyßling, A.: Über die Membransubstanzen von *Chlorochytridium tuberculatum* W. Vischer. *Experientia* **3**, 12 (1947).
6. Brunswik, H.: Über die Mikrochemie der Chitosanverbindungen. *Biochem. Z.* **113**, 111 (1921).
7. Campbell, F. L.: The Detection and Estimation of Chitin. *Ann. Entom. Soc. Amer.* **22**, 401 (1929).
8. Clark, G. L., and Smith, A. F.: X-Ray Diffraction Studies of Chitin, Chitosan and Derivatives. *J. physical chem.* **40**, 863 (1936).

9. Cranner, B. H.: Lipoide Stoffe als anscheinend konstante Bestandteile der Zellwände aller lebenden Zellen der Blütenpflanzen. *Jahrb. wiss. Bot.* **53**, 553 (1914).
10. Dous und Ziegenspeck: Das Chitin der Pilze. *Arch. Pharm.* **264**, 751 (1926).
11. Fitzpatrick, H. M.: *The Lower Fungi. Phycomycetes.* New York (1930).
12. Frey-Wyßling, A.: *Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate.* Berlin (1938).
13. Gäumann, E.: *Vergleichende Morphologie der Pilze.* Jena (1926).
14. — *Die Pilze.* Basel (1949).
15. Gonell, H. W.: Röntgenographische Studien an Chitin. *Z. physiol. Chem.* **152**, 18 (1926).
16. Harder, R.: Über das Vorkommen von Chitin und Zellulose und seine Bedeutung für die phylogenetische und systematische Beurteilung der Pilze. *Nachr. d. Ges. d. Wiss. Göttingen, math.-phys. Kl. Fachgr. 6 (Biol.) N. F.* **3**, Nr. 1 (1937).
17. — *Thallophyten*, in *Lehrb. d. Botanik f. Hochschulen*, bearbeitet von Fitting, Schumacher, Harder, Firbas. 23./24. Aufl. Jena (1947).
18. — und Sörgel, G.: Über einen neuen plano-isogamen Phycomyceten mit Generationswechsel und seine phylogenetische Bedeutung. *Nachr. v. d. Ges. d. Wiss. Göttingen, math.-phys. Kl. N. F. Fachgr. 6 (Biol.)* **3**, Nr. 5 (1938).
19. Herzog, R. O., und Jancke, W.: Das Röntgendiagramm der Zellulose. *Z. physikal. Chem.* **139**, 235 (1928).
20. Heß, K., Kießig, H., Wergin, W., und Engel, W.: Zur Kenntnis der Bildung von Zellulose in der Zellwand. *Ber. d. deutsch. chem. Ges.* **72**, 3, S. 642 (1939).
21. Heyn, A. N. J.: Investigations on the Molecular Structure of Chitin Cell Wall of Sporangiohores of Phycomyces and its Probable Bearing of the Phenomenon of Spiral Growth. *Protopl.* **25**, 3 (1936).
22. Hopkins, E. W.: Microchemical Tests on the Cell Walls of Certain Fungi. Cellulose and Chitin. *Transact. of the Wisc. Acad.* **24**, 187 (1929).
23. v. Iterson, G., Meyer, K. H., und Lotmar, W.: Über den Feinbau des pflanzlichen Chitins. *Rec. trav. chim. Pays-Bas* **55**, 1 (1936).
24. Iwanoff, N. N.: Über das Viscosin der Pilze. *Biochem. Z.* **137**, 320 (1923).
25. Khouvine, Y.: Etude aux rayons X de la Chitine d'*Aspergillus niger*, de *Psalliota campestris* et d'*Armillaria mellea*. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris* **195** (1932).
26. Kniep, H.: *Allomyces javanicus n. sp.*, ein anisogamer Phycomycet mit Planogameten. *Ber. d. deutsch. Bot. Ges.* **47**, 199 (1929).
27. Krawkow, N. P.: Über verschiedenartige Chitine. *Z. f. Biol.* **29**, 177 (1892).
28. Kühnelt, W.: Studien über den mikrochemischen Nachweis des Chitins. *Biol. Zentralbl.* **48**, 374 (1928).
29. Küster, E.: *Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen*, S. 132. Leipzig-Berlin (1907).
30. Meyer, K.: The Chemistry and Biology of Mucopolysaccharides and Glycoproteins. *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **6**, 91 (1938).

31. Meyer, K.H., und Mark, H.: Hochpolymere Chemie, Bd. II. Die hochpolymeren Verbindungen. Leipzig (1940).
32. — et Pankow, G.-W.: Sur la constitution et la structure de la chitine. Helv. Chim. Acta **18**, 589 (1935).
33. — und Wehrli, H.: Comparaison chimique de la chitine et de la cellulose. Helv. Chim. Acta **20**, III (1937).
34. Nabel, K.: Über die Membran niederer Pilze, besonders von *Rhizidiomyces bivellatus nov. spez.* Archiv f. Mikrobiol. **10**, Heft 4, S. 515 (1939).
35. Norman, A. G., and Peterson, W. H.: The Chemistry of Mold Tissue II. The Resistant Cell-Wall Material. Biochem. J. **26**, 1946 (1932).
36. Petersen: Ann. mycol. **8** (1910), zitiert nach F. v. Wettstein (1921).
37. Richards, A. G.: Studies on Arthropod Cuticle. Ann. Entom. Soc. Amer. **40**, 227 (1947).
38. Schmidt, E., und Graumann, E.: Zur Kenntnis pflanzlicher Inkrusten I. Mitteilung B. **54**, 1860 (1921).
39. — und Duysen, F.: Dasselbe II. Mitteilung B. **54**, 3241 (1921).
40. — Arndt, P., und Ihlow, F.: Dasselbe III. Mitteilung B. **56**, 23 (1923).
41. — und Miermeister, A.: Dasselbe IV. Mitteilung B. **56**, 1438 (1923).
42. Schmidt, M.: Makrochemische Untersuchungen über das Vorkommen von Chitin bei Mikroorganismen. Archiv f. Mikrobiol. **7**, 241 (1936).
43. Schmidt, W. J.: Über den polarisationsoptischen Nachweis des Chitins bei Tieren und Pflanzen. Z. f. wiss. Mikroskopie u. f. mikr. Technik **56**, 24 (1939).
44. Scholl, E.: Die Reindarstellung des Chitins aus *Boletus edulis*. Monatsh. f. Chemie **29**, 1023 (1908).
45. Sisson, W. A.: Identification of Crystalline Cellulose in Young Cotton Fibers by X-Ray Diffraction Analysis. Contr. from Boyce Thompson Inst. **8**, No. 5, S. 389 (1937).
46. Sollas, I. B. I.: On the Identification of Chitin by its Physical Constants. Proc. Roy. Soc., London B. **79**, 474.
47. Stüben, H.: Über Entwicklungsgeschichte und Ernährungsphysiologie eines neuen niederen Phycomyceten mit Generationswechsel. Planta, Arch. f. wiss. Bot. **30**, 3. Heft, S. 353 (1939).
48. Thomas, R. C.: Composition of *Fungus Hyphae*. I. The Fusaria. Amer. Jour. Bot. **15**, 9 (1928).
49. — Dasselbe, III. The *Pythiaceae*. Ohio J. Sci. **42**, 60 (1942).
50. — Dasselbe, IV. *Phytophthora*. Ohio J. Sci. **43**, 135 (1943).
51. Tiffany, L. H.: A Physiological Study of Growth and Reproduction among Certain Green Algae. Ohio J. Sci. **24**, 65 (1924).
52. Tupper-Carey, R. M., and Priestley, J. H.: Composition of the Cell Wall at the Apical Meristem of Stem and Root. Proc. Roy. Soc. London **95**, 109 (1923).
53. Vischer, W.: Über einen pilzähnlichen, autotrophen Mikroorganismus, Chlorochytridion, einige neue Protococcales und die systematische Bedeutung der Chloroplasten. Verh. Nat. Ges. Basel **56**, 2. Teil (1945).
54. Werner, J., und Odin, L.: On some Glycoprotein Carbohydrates. Experientia V, Fasc. 6 (1949).

55. Wettstein, F. von: Das Vorkommen von Chitin und seine Verwertung als systematisch-phylogenetisches Merkmal im Pflanzenreich. Sitzungsber. Akad. d. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl., Abt. I, Bd. 130, Heft 1 (1921).
 56. Wettstein, R. von: Handbuch der systematischen Botanik, 4. Aufl., Wien (1935).
 57. Wisselingh, C. van: Mikrochemische Untersuchungen über die Zellwände der Fungi. Jahrb. wiss. Bot. 31, 619 (1898).
 58. — Die Zellmembran, in K. Linsbauer, Handb. d. Pflanzenanatomie, Allg. Teil: Cytologie, Bd. III. 2, S. 170, Berlin (1925).
 59. Wurdack, M. E.: Chemical Composition of the Walls of Certain Algae. Ohio J. Sci. 23, 181 (1923).
-