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

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 50 (1940)

Artikel: Beiträge zur Biologie und Wirkstoffphysiologie von Ustilago scabiosae (Sowerby) Winter

Autor: Blumer, S. / Schopfer, W.H.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-34253

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. 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. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

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. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

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. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 10.07.2025

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

Beiträge zur Biologie und Wirkstoffphysiologie von Ustilago scabiosae (Sowerby) Winter.

Von *S. Blumer* und *W. H. Schopfer.*

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Bern.)

Mit 4 Textabbildungen.

Eingegangen am 10. Oktober 1939.

Einleitung.

In früheren Untersuchungen konnten wir nachweisen, dass verschiedene *Ustilago*-Arten Aneurin als Wachstumsfaktor benötigen (Schopfer und Blumer, 14, 15). Von 10 untersuchten Arten erwiesen sich 7 gegenüber dem Aneurin als auxo-autotroph, d. h. sie gedeihen in synthetischen Nährlösungen ohne Zugabe irgendeines Wirkstoffes. Drei andere Arten, nämlich *Ustilago longissima, U. violacea* und *U. scabiosae* sind in verschiedenem Grade auxo-heterotroph. Bei *U. longissima* zeigt sich diese Heterotrophie nur in einer geringen Förderung durch den einen Bestandteil des Aneurinmoleküls, nämlich das Pyrimidin. *U. violacea* wurde von uns früher eingehend untersucht. Dieser Pilz benötigt zu seiner Entwicklung entweder das ganze Aneurinmolekül oder seine beiden Komponenten, Pyrimidin und Thiazol. *Ustilago violacea* verhält sich also gegenüber dem Aneurin gleich wie *Phycomyces.* Bei der auf *Dianthus deltoides* vorkommenden Form scheint die Heterotrophie noch einen höhern Grad erreicht zu haben, indem hier das Aneurin durch das Gemisch von Pyrimidin und Thiazol nur teilweise ersetzt werden kann. Den stärksten Grad der Heterotrophie gegenüber dem Aneurin zeigte *Ustilago scabiosae,* bei der nach unsern vorläufigen Beobachtungen das Gemisch von Pyrimidin und Thiazol überhaupt nicht mehr wirksam zu sein schien, so dass wir annehmen mussten, dass hier die Fähigkeit der Aneurinsynthese überhaupt vollständig verlorengegangen sei. Dieser Typus wurde von A. und M. Lwoff (5, 6) für *Glaucoma piriformis* und von M. Lwoff (7) für *Strigomonas oncopelti* festgestellt. Später wies Robbins (9) nach, dass er auch bei *Phytophthora cinnamomi* und andern Arten vorkommt. Immerhin scheint diese absolute Heterotrophie gegenüber dem Aneurin bei den Pilzen nicht sehr verbreitet zu sein, so dass schon aus diesem Grunde eine ein-

gehende Untersuchung von *Ustilago scabiosae* in dieser Richtung wünschbar erschien.[1]

Herr Dr. P. Cruchet in Morges hatte die Freundlichkeit, uns einige stark mit *Ustilago scabiosae* befallene Pflanzen zu überlassen. Es handelte sich dabei um *Knautia arvensis (L.) Coulter,* die er bei Echichens sur Morges am 6. Juni 1938 sammelte. Kurz vor dem Abschluss dieser Untersuchungen isolierten wir den Pilz von zwei weitern Standorten, nämlich von Freiburg (Schweiz), 7. Juli 1939 auf *Knautia arvensis* und von St. Luc (Wallis), 17. Juli 1939 auf *Knautia silvatica (L.) Duby.* Das Vitaminbedürfnis dieser beiden Pilze wurde in je einem Versuch mit 10, resp. 5 Einsporidienkulturen ermittelt. Wir waren somit in der Lage, unsere Untersuchungen nicht nur an den von Baarn bezogenen Stämmen, sondern auch an frisch isoliertem Material durchzuführen. Damit konnte dem Einwande begegnet werden, dass die Heterotrophie gegenüber Wachstumsfaktoren nur ein Degenerationsmerkmal unserer Laboratoriumsstämme darstelle, wie dies für Hefen nachgewiesen wurde.

Die Brandsporen wurden in kleinen Tröpfchen isoliert und in der feuchten Kammer gehalten. Sie keimten in Nährlösungen wie auch in destilliertem Wasser sofort. Schon nach 3—4 Stunden hatte sich der Promycelschlauch gebildet. Nach 12 Stunden enthielten die Tröpfchen schon zahlreiche Sporidien, die mit Hilfe des Mikromanipulators isoliert wurden. Durch Herrn Dr. Thomas, Assistent am Institut für spezielle Botanik der E. T. H. Zürich, wurden wir in die Technik des Mikromanipulierens eingeführt, wofür wir ihm auch an dieser Stelle bestens danken.

Auf diese Weise wurden aus dem Brandsporenmaterial von Morges 34 Einsporidienkulturen angelegt und mit den bekannten Stämmen von Baarn auf ihr Geschlecht geprüft. 19 Stämme hatten das Geschlecht A, 15 gehörten dem B-Geschlechte an. Die Kulturen der Stämme Freiburg und St. Luc wurden vorläufig nicht auf ihr Geschlecht geprüft. In ihrem kulturellen Verhalten stimmten die frisch isolierten Pilze mit den aus Baarn bezogenen Stämmen überein. Sie bilden schleimige, gelbliche Kolonien, die wenigstens in jungen Kulturen ausschliesslich aus Sporidien bestehen. Später treten gelegentlich Mycelelemente auf.

Die beiden Geschlechter unterscheiden sich morphologisch nicht voneinander. Um festzustellen, ob physiologische Geschlechtsunterschiede nachzuweisen sind, wurden die meisten der folgenden Versuche mit beiden Geschlechtern parallel ausgeführt. Da jedoch diese « sekun-

---

[1] Wir danken der *Stiftung zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung an der bernischen Hochschule* für einen Beitrag, der dem einen von uns (Blumer) zugesprochen wurde, bestens. Ebenso sind wir der chemischen Fabrik *Hoffmann-La Roche,* Basel, für die Ueberlassung einer Anzahl Aminosäuren und Di- und Tripeptide zu Dank verpflichtet.

dären Geschlechtsmerkmale » für unsere Betrachtung nicht im Vordergrunde stehen, sollen sie erst im letzten Abschnitte zusammenhängend diskutiert werden.

I. Der Vitaminbedarf.

In unserer gewöhnlichen synthetischen Nährlösung (1,5 ‰ KH_2PO_4, 0,5 ‰ $MgSO_4$, 1 ‰ Asparagin, 1 oder 2 % Glukose) ist die Entwicklung von *Ustilago scabiosae* kaum wahrnehmbar. Dagegen zeigt sich bei Zusatz von Aneurin nach einigen Tagen eine ziemlich starke Trübung der Flüssigkeit, die uns einen Maßstab für die Entwicklung liefert. Wie früher für *Ustilago violacea* konnte auch hier die nephelometrische Methode angewendet werden. Wir benützen dazu wieder das lichtelektrische Kolorimeter nach Dr. B. Lange, mit dem die prozentuale Lichtabsorption der Kulturen bestimmt werden kann. Wir bezeichnen diese hier als nephelometrische Werte (NW) und sind uns dabei wohl bewusst, dass uns diese Methode nur relative Werte liefern kann, die aber nach unsern Erfahrungen bei *U. violacea* innerhalb bestimmter Grenzen mit dem Trockengewicht ziemlich parallel gehen. Solange keine besondern Pigmentbildungen auftreten, dürfte diese einfache Methode vollständig ausreichen. *U. scabiosae* wächst bedeutend langsamer als *U. violacea*, und die maximalen nephelometrischen Werte sind, solange keine Pigmentbildung auftritt, bedeutend geringer als bei dieser Art.

1. Festsetzung der optimalen Aneurinkonzentration.

Es musste nun in erster Linie einmal das Optimum der Aneurinwirkung festgestellt werden. Dies ist für jeden Pilz unerlässlich und bildet die Grundlage für die weitere Untersuchung. Abb. 1 zeigt die Wachstumskurve in Abhängigkeit von der Aneurinkonzentration. Die Kurven entsprechen vollständig den Vitaminkurven mycelbildender Pilze. Das Optimum der Aneurinwirkung liegt ungefähr bei 0,02 γ pro 25 ccm Nährlösung, ist also wenig höher als für *U. violacea*. Da mit der Impfung der Nährlösung immer Spuren von Wachstumsfaktoren mitgebracht werden, wurde in unsern Versuchen möglichst schwach geimpft. Die in Abb. 1 dargestellte Kurve basiert auf zwei Versuchen, von denen der eine beide Geschlechter des Stammes von Baarn, der andere ein A- und ein B-Geschlecht des Stammes von Morges umfasste. Diese neu isolierten Stämme unterschieden sich in ihrem Bedürfnis an Wachstumsfaktoren in keiner Weise von den schon lange in Kultur stehenden Stämmen von Baarn.

Um festzustellen, in welcher Zeit die maximale Entwicklung erreicht wird, wurden mit je 2 A- und B-Stämmen Zeitversuche durchgeführt, die in Abb. 2 zusammengefasst sind. Die Kurven der suboptimalen Konzentrationen sind hier der Uebersichtlichkeit halber nicht

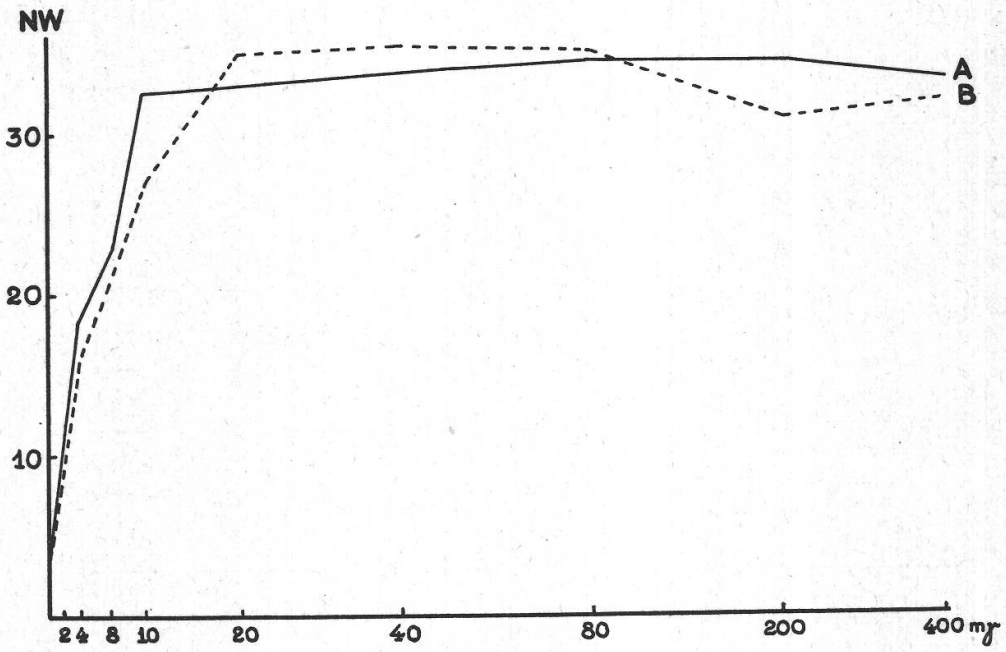

Abbildung 1.
Entwicklung der beiden Geschlechter von Ustilago scabiosae bei verschiedenen Aneurinkonzentrationen. Nephelometrische Werte nach 19 Tagen. (Die Abstände auf der Abszisse sind willkürlich gewählt.)

vom ersten Tage an eingetragen. Während wir bei suboptimalen Konzentrationen nach dem 16. Tage kein weiteres Ansteigen der nephelometrischen Werte mehr beobachten, steigt die optimale Kurve auch weiterhin an. In andern Versuchen wurden nach 4 Wochen nephelometrische Werte bis 55 erreicht. Man könnte nun daraus schliessen, dass die normale Kulturdauer mindestens 4 Wochen umfassen müsste. Dies ist jedoch nicht der Fall. In Kulturen, die sich optimal entwickeln, bildet sich ungefähr vom 20. Tage an das gelbe Pigment, das in den Agarkulturen die Farbe der Kolonien bedingt. Dadurch werden die nephelometrischen Werte stark in die Höhe getrieben, obschon solche Kulturen kaum mehr Zellen enthalten als jüngere Kulturen vom 16. bis zum 18. Tage. Das Ansteigen der Kurven nach dem 16. bis 19. Tage entspricht nicht einer weitern Entwicklung des Pilzes. Eine solche wird nur durch die Unzulänglichkeit der Methode vorgetäuscht. Die Kulturdauer betrug demnach für die folgenden Versuche meistens 16 bis 17 Tage.

2. Die Wirkung der Aneurinkomponenten.

Man kann nach ihrem Verhalten gegenüber dem Aneurin und seinen Bestandteilen 6 Gruppen von Mikroorganismen unterscheiden, die uns in ihrer Gesamtheit das Prinzip der abgestuften Heterotrophie in bezug auf diesen Wachstumsfaktor veranschaulichen (Schopfer 12, 13). Nach unsern ersten Ergebnissen müsste *Ustilago scabiosae* zur Gruppe

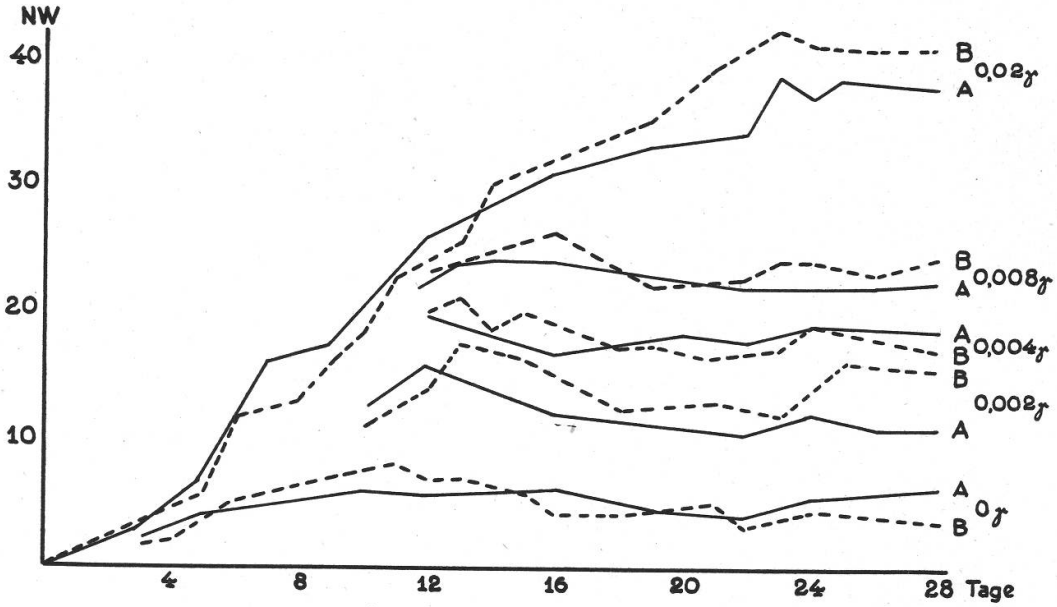

Abbildung 2.
Nephelometrische Werte bei verschiedenen Aneurinkonzentrationen als Funktion der Zeit.

von *Glaucoma piriformis, Strigomonas oncopelti* und *Phytophthora cinnamomi* gezählt werden. Alle diese Organismen sind auf das Aneurin als Wachstumsfaktor angewiesen, sie sind aber nicht imstande, die beiden Komponenten dieses Vitamins, Pyrimidin und Thiazol selber zu synthetisieren, und ebensowenig können sie aus diesen beiden Komponenten das Aneurinmolekül aufbauen. Wie sich *U. scabiosae* nun gegenüber den beiden Komponenten einzeln und gegenüber dem Gemisch der beiden Substanzen verhält, soll im Folgenden näher untersucht werden.

a) Wirkung von Pyrimidin und Thiazol in äquimolekularen Mengen.

α) Stämme von Baarn und Morges.

Aus Tabelle 1 scheint hervorzugehen, dass Pyrimidin in Konzentrationen, die einer optimalen Aneurindosis entsprechen, keinen fördernden Einfluss auf den Pilz ausübt. Dagegen ergibt sich hier bei Zugabe von 0,05 γ Pyrimidin allein eine mittelmässige Entwicklung, die sich in nephelometrischen Werten von 12,75 bis 20 ausdrückt. Gegenüber den Kontrollen ist das Wachstum schon beträchtlich. In zahlreichen andern Versuchen konnte dagegen mit Pyrimidin allein nie eine nennenswerte Entwicklung des Pilzes ausgelöst werden (vgl. Tab. 3 und 4). Wir müssen deshalb vorläufig annehmen, dass Pyrimidin allein keine Wirkung auf den Pilz ausübt. Dasselbe gilt für das Thiazol.

Die Mischung von Pyrimidin und Thiazol ergibt in allen Fällen eine gewisse Entwicklung. Es ist aber auffällig, dass die Wirkung einer

Tabelle 1.
Wirkung von Pyrimidin und Thiazol auf 6 verschiedene Stämme beider Geschlechter (St. 5 und 6 von Baarn, die übrigen von Morges).

		A-Stämme			B-Stämme		
		6	13	20	5	26	34
Kontrolle		3,25	5,3	2,0	4,1	0,8	3,3
Pyrimidin	0,005 γ	6,0	8,75	3,25	5,75	3,0	5,75
	0,01 γ	9,0	10,0	4,75	6,5	3,5	6,0
	0,05 γ	18,75	20,0	13,75	15,0	12,75	15,75
Thiazol	0,005 γ	5,0	8,75	2,5	3,5	1,5	4,75
	0,01 γ	5,25	8,0	3,0	3,5	2,0	4,75
	0,05 γ	5,75	11,0	5,0	5,0	3,5	5,5
Pyrimidin + Thiazol							
	je 0,005 γ	10,0	21,5	8,0	10,5	6,75	12,0
	je 0,01 γ	24,0	27,25	18,75	20,5	18,5	20,75
	je 0,05 γ	41,0	38,5	36,25	38,5	40,0	44,5
Aneurin	0,02 γ	39,7	36,5	35,7	38,5	40,3	41,0

optimalen Menge von Aneurin nicht durch ein Gemisch von Pyrimidin und Thiazol in entsprechenden äquimolekularen Mengen ersetzt werden kann. Dies wird am besten durch Abbildung 3 gezeigt, die die Mittelwerte aller Stämme aus Tab. 1 darstellt. Man sollte eigentlich annehmen dürfen, dass 0,01 γ Pyrimidin + 0,01 γ Thiazol das gleiche Wachstum bedingen würden wie 0,02 γ Aneurin (optimale Dosis). Aus der Figur geht aber deutlich hervor, dass die mit dem Gemisch beider Komponenten erreichten nephelometrischen Werte um die Hälfte kleiner sind als bei Verwendung der entsprechenden Aneurinmenge. Erst bei einer fünffachen Ueberdosierung der beiden Komponenten wird ein optimales Wachstum erzielt.

Aus dem in Tab. 3 dargestellten Schachbrettversuch lassen sich die gleichen Schlüsse ableiten, was durch die folgenden Beispiele belegt werden soll :

Suboptimale Dosierung :

Mit 0,004 γ Aneurin erhalten wir NW von 19,25, resp. 23,5.
Mit je 0,002 γ P + T[1] betragen die NW nur 6,75—15,75,
also ⅓ bis ⅔.
Mit 0,01 γ Aneurin erreichen wir NW von 21,5, resp. 25,0.
Mit je 0,01 γ P + T ergeben sich NW von 11,25, resp. 11,0,
also ca. ½.

[1] P = Abkürzung für 2-Methyl-4-amino-5-amino-methyl-pyrimidin.
T = Abkürzung für 4-Methyl-5-(β-hydroxyäthyl)-thiazol.

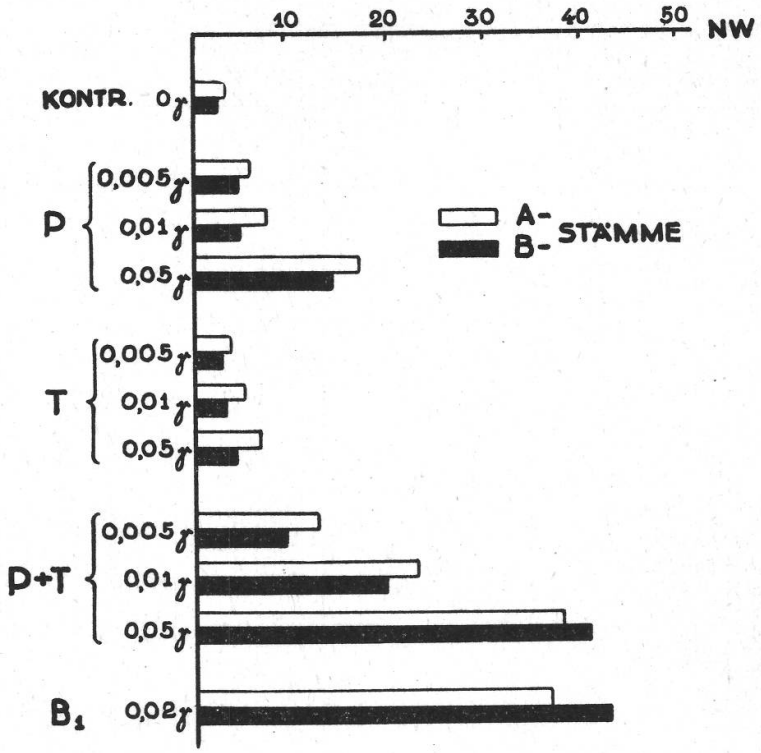

Abbildung 3.
Entwicklung von je 3 A- und 3 B-Stämmen bei verschiedenen Konzentrationen von Pyrimidin (P), Thiazol (T), Pyrimidin+Thiazol (P+T) und Aneurin (B_1).

Optimale Dosierung:

Mit 0,02 γ Aneurin erreichen wir NW von 30,0, resp. 25,0.
Mit je 0,01 γ P + T betragen die NW 19,75 resp. 21,0,
also ⅔ bis ⅘.

Supraoptimale Dosierung:

Mit 0,04 γ Aneurin erhält man NW von 28,5, resp. 25,0.
Mit je 0,02 γ P + T erreichen wir NW von 28,75, resp. 26,5,
also ungefähr gleich viel.

Bei suboptimaler und optimaler Dosierung kann das Gemisch der beiden Komponenten also nicht die Wirkung der entsprechenden Aneurinmenge ersetzen. Dies ist erst möglich, wenn die beiden Komponenten in supraoptimalen Mengen, also im Ueberschuss vorhanden sind.

Wenn man daher ohne genaue Kenntnis des Optimums der Aneurinwirkung Versuche mit suboptimalen Mengen ausführt, so muss man zwangsläufig zum Ergebnis kommen, dass *Ustilago scabiosae* ein Aneurinpilz sei, der nicht mehr zur Synthese des Aneurinmoleküls aus Pyrimidin und Thiazol befähigt ist, ein Pilz, der also in dieselbe Kategorie gehört wie *Phytophthora cinnamomi*. Eine nähere Untersuchung musste

aber dann zeigen, dass *U. scabiosae* nicht ein echter, sondern ein höchstens unvollkommener Aneurinpilz ist. Er besitzt die Fähigkeit der Aneurinsynthese noch in begrenztem Masse. Ueber die Ursachen dieses merkwürdigen Verhaltens kann noch nichts Bestimmtes ausgesagt werden. Auf alle Fälle muss *U. scabiosae* also als verbindendes Glied zwischen der Gruppe von *Phytophthora cinnamomi* zur Gruppe von *Phycomyces* betrachtet werden.

β) Stämme von Freiburg und St. Luc.

Die Stämme von Morges waren nach der Isolation 6 bis 9 Monate auf Agar weitergezüchtet worden, bevor sie für die obenerwähnten Versuche verwendet wurden. Für die Stämme von Baarn kennt man den Zeitpunkt der Isolierung überhaupt nicht. Es konnte nun vermutet werden, dass der Grad der Heterotrophie gegenüber dem Aneurin bei längerer Kultur auf künstlichen Nährböden zunimmt. Wir haben schon früher darauf hingewiesen, dass dies für *Ustilago violacea f. sp. dianthi deltoidis* tatsächlich zutrifft. In den ersten Versuchen, die wir mit diesem Pilz ausführten, konnte die optimale Aneurindosis ohne weiteres durch die entsprechenden Mengen von Pyrimidin und Thiazol ersetzt werden, während später mit den beiden Komponenten nicht mehr derselbe Effekt erzielt werden konnte wie mit Aneurin (Schopfer und Blumer, 15).

Die frisch isolierten Stämme von Freiburg und St. Luc boten uns nun Gelegenheit, diese Frage erneut zu prüfen. Diese Pilze wurden nur so lange auf Agar kultiviert, bis sich eine für die Aussaat genügende Menge von Sporidien gebildet hatte (ca. 10 Tage) und dann in Nährlösungen mit Aneurin oder seinen Komponenten übergeimpft. Die Vitaminkonzentration war so bemessen, dass sie ungefähr dem für die Stämme Baarn und Morges ermittelten Optimum entsprach. Es wurde dabei vorausgesetzt, dass das Optimum der Stämme von Freiburg und St. Luc ungefähr im gleichen Bereiche liegt, wie es für die Stämme von Baarn und Morges ermittelt worden war.

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen klar, dass auch frisch isolierte Stämme aneurinbedürftig sind. In den Kontrollen ohne Vitamin war das Wachstum überall sehr schwach. Das Bedürfnis nach diesem Wachstumsfaktor ist also hier nicht als Zeichen einer Degeneration, die durch andauernde Kultur auf künstlichen Nährböden bedingt ist, aufzufassen. Es ist vielmehr ein physiologisches Merkmal dieses Pilzes, das allen bis jetzt isolierten Stämmen zukommt.

Dagegen geht aus dieser Tabelle hervor, dass je 0,01 γ Pyrimidin und Thiazol die gleiche Wirkung hervorbringen wie 0,02 γ Aneurin. Im Bereiche des vermutlichen Optimums kann also das Aneurin durch das Gemisch seiner Komponenten vollständig ersetzt werden. Die frisch

Tabelle 2.

Wirkung des Aneurins und seiner Komponenten auf die Stämme Freiburg und St. Luc. — Nephelometrische Werte nach 18, resp. 14 Tagen.

Nährpflanze und Herkunft	Stamm Nr.	Kontrolle	Pyrimidin 0,01 γ	Thiazol 0,01 γ	Pyrimidin + Thiazol je 0,01 γ	Aneurin 0,02 γ
Knautia arvensis (Freiburg)	1	2	2,5	1,5	31	29
	2	4	3	3	29	29
	3	2	2,5	3	32	31
	4	3,5	4	3	28	29
	5	2	2	1,5	31	31
	6	3	2	2	30	29
	7	3	3	2	31	30
	8	3,5	6	3	29,5	30
	9	4	4	3	32,5	30
	10	2	2,5	2	34	30
Mittel		2,9	3,15	2,4	30,8	29,8
Knautia silvatica (St. Luc)	1	3	3	2	20	19
	2	4	4	3	15	14,5
	3	4	2,5	3	20,5	21
	4	4	4	4,5	23	22,5
	5	2	3	3	21	23
Mittel		3,4	3,3	3,1	19,9	20

isolierten Pilze verhalten sich also genau wie *Phycomyces* und *Ustilago violacea,* während die länger in Kultur befindlichen Stämme Baarn und Morges einen bedeutend höhern Grad der Heterotrophie gegenüber dem Aneurin aufweisen, da bei ihnen die Synthese des Vitamins aus seinen Komponenten höchstens noch teilweise möglich ist. Die Annahme, dass die zunehmende Heterotrophie als ein Degenerationsmerkmal der länger kultivierten Stämme aufzufassen ist, liegt also nahe. Den endgültigen Beweis für die Richtigkeit dieser Annahme müssen spätere Versuche mit den Stämmen Freiburg und St. Luc erbringen.

b) Kombinationen von Pyrimidin und Thiazol in verschiedenen Konzentrationen.

Der in Tab. 3 dargestellte Schachbrettversuch zeigt in Uebereinstimmung mit mehreren andern Versuchen, dass sowohl Pyrimidin als Thiazol einzeln für *Ustilago scabiosae* sehr wenig wirksam sind. Erst in ihrer Verbindung zum Aneurinmolekül werden sie aktiv. Man dürfte also a priori annehmen, dass der Grad der Entwicklung des Pilzes durch

Tabelle 3.

Wirkung der Kombination von Pyrimidin und Thiazol in verschiedenen Konzentrationen verglichen mit Aneurin.

	Pyrimidin										B_1
	γ	0	0,002	0,004	0,01	0,02	0,04	0,08	0,2	0,4	0,8	
Thiazol	0	4,75[1] 7,75	6,75 12,0	6,75 7,75	5,75 6,75	8,25 9,25	5,5 9,0	4,5 8,5	5,0 8,5	7,75 11,0	6,5 11,0	4,75 7,75
	0,002	4,75 10,75	6,75 15,75	10,75 13,5	11,25 13,0	17,0 14,25	17,75 20,5	20,25 21,0	21,0 21,0	22,5 26,25	27,75 22,0	14,0 20,5
	0,004	4,5 9,25	10,0 18,75	11,25 11,0	15,0 14,0	19,0 16,75	23,5 23,25	24,0 24,0	28,75 29,0	27,75 30,25	27,0 24,0	19,25 23,5
	0,01	5,75 11,25	12,75 18,25	22,0 16,25	19,75 21,0	26,75 23,0	25,0 26,5	24,5 25,5	32,25 29,0	33,25 35,25	27,0 24,5	21,5 25,0
	0,02	5,5 11,0	16,5 18,75	19,25 24,0	24,5 24,0	26,75 26,5	29,75 30,25	27,0 25,5	28,25 29,0	33,75 35,25	30,0 27,0	30,0 25,0
	0,04	5,0 11,0	15,25 18,75	24,5 20,25	26,25 26,0	28,5 25,5	35,25 32,5	27,0 26,0	35,5 28,5	30,5 36,5	36,0 28,0	28,5 25,0
	0,08	5,0 12,5	16,5 16,25	20,25 21,25	27,25 26,5	28,25 26,5	25,0 30,5	28,5 25,75	31,75 28,5	31,0 36,5	35,0 26,5	29,5 29,75
	0,2	6,0 13,0	16,0 22,0	24,25 24,25	27,75 27,0	28,75 25,75	25,5 30,75	33,5 25,75	31,0 28,0	30,5 34,0	31,0 28,25	29,5 31,75
	0,4	5,0 —	18,25 25,0	22,5 25,5	28,25 26,0	31,0 25,75	30,5 27,5	34,5 26,5	38,75 27,5	36,0 34,0	28,25 27,5	34,5 28,5
	0,8	5,25 10,0	17,5 20,5	23,25 18,5	27,5 27,0	36,0 25,75	29,25 29,5	37,0 28,25	38,5 29,0	36,25 34,0	28,75 31,0	33,0 29,5

[1] Obere Zahl: Stamm v. Baarn, Geschlecht A; untere Zahl: Geschlecht B.

die im Minimum vorhandene Komponente bestimmt wird, da die Menge des synthetisierten Aneurins von dieser abhängt. Um ein beliebiges Beispiel herauszugreifen, könnte man annehmen, dass mit einer suboptimalen Menge von 0,004 γ Pyrimidin immer nur die Entwicklung erreicht werden könnte, die sich ergibt, wenn diese Pyrimidindosis mit der gleichen Menge Thiazol kombiniert wird, was in unserem Falle einem NW von ca. 11 entspricht. Aus unserer Tabelle ergibt sich aber, dass eine suboptimale Pyrimidindosis mit einer stark supraoptimalen Thiazoldosis (z. B. 0,4 γ) kombiniert ein bedeutend stärkeres Wachstum ergibt (NW ca. 25). Ebenso können wir durch die Kombination einer suboptimalen Thiazoldosis mit einer stark supraoptimalen Pyrimidindosis eine fast maximale Entwicklung des Pilzes erzielen. Ein Mangel an

Tabelle 4.

Wachstum der beiden Geschlechter mit Pyrimidin und Thiazol, sowie einigen Substitutionsprodukten (gewöhnliche Nährlösung mit 2 % Glukose und 1 ‰ Asparagin, Versuchsdauer 16 Tage).

Nr.	Pyrimidine und Thiazole	Geschlecht A (St. Ba 6)		Geschlecht B (St. Ba 5)	
		0,02 γ	0,2 γ	0,02 γ	0,2 γ
1	2-Methyl-4-amino-5-amino-methyl-pyrimidin .	5,0	5,25	4,25	5,0
2	2-Methyl-4-amino-5-thioformyl-amino-methyl-pyrimidin	2,5	5,0	3,5	4,75
3	2,5-Dimethyl-4-oxy-pyrimidin	3,25	2,75	3,75	8,0
4	2-Methyl-4-mercapto-pyrimidin	3,0	3,5	3,75	4,25
5	2-5-Dimethyl-4-amino-pyrimidin	3,75	3,5	3,5	3,5
6	2-Methyl-5-carbäthoxy-6-amino-pyrimidin .	3,25	3,0	5,5	3,75
7	2-Methyl-4-oxy-6-amino-pyrimidin	3,75	3,5	3,0	3,5
8	2,4-Dioxy-pyrimidin (Uracil)	3,75	4,0	3,75	2,75
10	4-Methyl-5-(β-hydroxyäthyl)-thiazol . . .	4,5	6,0	3,5	5,25
11	4-Methyl-2-mercapto-thiazol	5,0	3,0	4,25	2,25
12	4,5-Dimethyl-thiazol	4,0	3,25	3,5	4,5
13	3-Benzyl-4-methyl-5-(β-hydroxyäthyl)-thiazol	2,75	3,0	3,5	4,75
14	3-[4'(5')-Methyl-imidazol]-4-methyl-5-(β-hydroxyäthyl)-thiazol	4,75	4,75	4,5	4,75
	Kontrollen:				
	Nährlösung ohne Zusatz 3,0 3,0				
	Nährlösung mit 0,02 γ Aneurin	43,0		33,0	

Thiazol kann also durch Ueberdosierung des Pyrimidins weitgehend kompensiert werden, und umgekehrt. Dabei scheinen hohe Dosen von Pyrimidin etwas wirksamer zu sein als hohe Thiazoldosen.

Für dieses merkwürdige Verhalten kann vorläufig noch keine befriedigende Erklärung gegeben werden. Es wäre naheliegend, anzunehmen, dass das aus der Verbindung suboptimaler Mengen von Pyrimidin und Thiazol entstehende Aneurin aus toten Zellen durch Exosmose wieder frei würde und für ein weiteres Wachstum zur Verfügung wäre. Dieser Annahme steht jedoch die oft festgestellte Tatsache entgegen, dass bei Verwendung suboptimaler Aneurindosen nur eine begrenzte Entwicklung erfolgt, so dass in diesem Falle kein Freiwerden des Aneurins durch Diffusion angenommen werden darf.

Man könnte ferner annehmen, dass unter dem Einfluss eines Ueberschusses der einen Komponente der Pilz befähigt wäre, die fehlende Komponente selber zu synthetisieren, wobei die im Minimum vorhandene Komponente sich autokatalytisch vermehren würde. Für diese ad hoc aufgestellte Hypothese bestehen aber zur Zeit noch keine Anhaltspunkte.

Tabelle 5.

Wachstum der beiden Geschlechter mit verschiedenen Kombinationen der Pyrimidin- und Thiazolderivate (je 0,02 γ in 25 ccm der gewöhnlichen Nährlösung). Die Zahlen der Kombinationen beziehen sich auf die in Tabelle 4 angeführten Substitutionsprodukte.

Kombination	Nephelometrische Werte (16 Tage)		Kombination	Nephelometrische Werte (16 Tage)	
P + T	Geschlecht A (St. Ba 6)	Geschlecht B (St. Ba 5)	P + T	Geschlecht A (St. Ba 6)	Geschlecht B (St. Ba 5)
1 + 10	37,0	37,5	5 + 10	3,0	3,5
1 + 11	4,75	4,75	5 + 11	2,0	2,0
1 + 12	3,25	4,5	5 + 12	3,0	1,5
1 + 13	7,5	4,25	5 + 13	4,0	2,0
1 + 14	14,75	16,5	5 + 14	4,0	6,0
2 + 10	5,75	3,75	6 + 10	3,25	2,25
2 + 11	3,0	1,0	6 + 11	3,0	3,5
2 + 12	2,5	1,0	6 + 12	3,5	3,5
2 + 13	3,0	2,0	6 + 13	4,0	3,0
2 + 14	4,0	2,0	6 + 14	—	5,5
3 + 10	4,75	3,5	7 + 10	11,25(?)	16,5(?)
3 + 11	3,0	1,5	7 + 11	3,5	3,0
3 + 12	1,5	8,0	7 + 12	—	3,0
3 + 13	3,0	2,0	7 + 13	2,0	—
3 + 14	2,0	2,0	7 + 14	3,0	3,5
4 + 10	3,25	3,0	8 + 10	3,75	4,5
4 + 11	2,5	1,5	8 + 11	—	24(?)
4 + 12	1,5	1,5	8 + 12	2,0	—
4 + 13	2,0	2,0	8 + 13	—	3,5
4 + 14	7,0	3,0	8 + 14	9,0	—

c) Die Konstitutionsspezifität der Wirkung.

Da weder das normale Pyrimidin noch das normale Thiazol eine nennenswerte Förderung auf *Ustilago scabiosae* ausüben, ist auch nicht zu erwarten, dass die Substitutionsprodukte dieser Substanzen wirksam sind. Nach unsern Erfahrungen mit *Ustilago violacea* und andern Organismen (Schopfer, 13) kann bei Anwendung sehr hoher Dosen die Spezifität der Wirkung wenigstens zum Teil aufgehoben werden. Die in Tabelle 4 zusammengestellten Versuche wurden deshalb mit zwei verschiedenen Konzentrationen ausgeführt. Die Ergebnisse sind eindeutig: Auch in relativ hohen Konzentrationen vermag keines der verwendeten Pyrimidin- und Thiazolderivate ein deutliches Wachstum des Pilzes auszulösen.

Dasselbe gilt für die Kombinationen der verschiedenen Substitutionsprodukte der beiden Aneurinkomponenten. Eine gute Entwicklung

ergibt sich nur mit den normalen Bestandteilen des Aneurins (Tab. 5 : 1 + 10). Die wenigen Ausnahmen bedürften einer Nachprüfung.

Wie für *Phycomyces* können wir auch für *Ustilago scabiosae* eine deutliche Förderung durch das Gemisch 3-[4'(5')-Methyl-imidazol]-4-methyl-5-(β-hydroxyäthyl)-thiazol+normales Pyrimidin feststellen (Tab. 5: 1 + 14). Sofern diese Substanz nicht Spuren des normalen Thiazols enthält, könnte diese Wirkung dadurch erklärt werden, dass sie hydrolysiert wird, wobei normales Thiazol entsteht, das zusammen mit dem Pyrimidin die beobachtete mittelmässige Entwicklung bedingen könnte.

Dagegen wirkt das 3-Benzyl-4-methyl-5-(β-hydroxyäthyl)-thiazol (Tab. 4 u. 5 : Nr. 13), das ebenfalls ein normales Thiazol enthält, nicht auf *Ustilago scabiosae*. Man könnte annehmen, dass in diesem Falle keine Hydrolyse erfolgt, obschon die Bindung Benzyl-Thiazol derjenigen des Pyrimidins und des Thiazols im Aneurinmolekül analog ist. Möglicherweise findet eine Hydrolyse statt, aber die toxische Wirkung der freiwerdenden Benzylgruppe hemmt die Entwicklung.

Es ist noch zu bemerken, dass *Ustilago violacea* nicht auf die beiden hier erwähnten Kombinationen reagiert. Allerdings wurden für diesen Pilz geringere Konzentrationen angewendet als hier für *Ustilago scabiosae*.

Auf alle Fälle erscheint die Konstitutionsspezifität der Wirkung des Aneurins und seiner Komponenten deutlich ausgeprägt. Sie stimmt im grossen ganzen mit unsern Beobachtungen an Phycomyces überein (Schopfer, 13). Diese Feststellungen geben uns eine Bestätigung für unsere Ansicht, dass *Ustilago scabiosae* ein unvollkommener Aneurinpilz ist, bei dem das Gemisch Pyrimidin + Thiazol nur in starker Ueberdosierung die Aneurinwirkung ersetzen kann.

II. Allgemeine Ernährungsbedingungen.

Die Versuche mit verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen wurden eigentlich in erster Linie ausgeführt, um eventuelle Unterschiede im Stoffwechsel der beiden Geschlechter aufzudecken.

1. Kohlenstoffquellen.

In Tab. 6 sind die nephelometrischen Werte für die wichtigsten Kohlenstoffquellen angeführt. Die Zahlen stellen Mittelwerte von je 2 Stämmen jedes Geschlechtes dar. Vergleichen wir diese Tabelle mit den an *U. violacea* gewonnenen Ergebnissen (vgl. Schopfer und Blumer, 15, S. 332), so können wir im allgemeinen eine weitgehende Uebereinstimmung der beiden Pilze feststellen. Beide Arten können eine grosse Zahl von Kohlehydraten, Alkoholen, Glukosiden und organischen Säuren als Kohlenstoffquellen verwerten, sofern das für die Ent-

Tabelle 6.

Wachstum der beiden Geschlechter mit verschiedenen Kohlenstoffquellen.
(0,01 γ Aneurin pro 25 ccm pH ca. 4.)

Kohlenstoffquelle		Nephelometrische Werte		pH nach 16 Tagen ca.
		Geschlecht A (St. Ba 6 u. M 20)	Geschlecht B (St. Ba 5 u. M 26)	
Kontrolle ohne C		1,25	1,5	3—4
Glycerin	1 %	8,25	10,0	6
Arabinose	1 %	2,25	5,25	6
Xylose	1 %	0,25	0,25	4
Rhamnose	1 %	0,75	1,0	4
Sorbit	1 %	22,0	20,0	6,5
Mannit	1 %	33,5	32,5	4
Lävulose	1 %	31,5	29,5	4
Glukose	1 %	33,0	29,5	4
Mannose	1 %	29,25	28,75	4
Galaktose	1 %	7,0	8,5	6,5
Saccharose	1 %	29,0	26,75	4
Maltose	1 %	37,25	33,0	4
Laktose	1 %	11,5	14,75	6,5
Raffinose	1 %	20,5	19,25	6,2
Inulin	1 %	40,25	39,75	4
Dextrin	1 %	13,0	13,25	7
Stärke	0,5 %	5,25	6,0	6,5
Cellobiose	0,5 %	26,25	26,75	4
Salicin	0,5 %	0	0	4
Arbutin	0,5 %	0,25	0,25	4
Aesculin	0,5 %	1,5	0,5	4
α-Methylglukosid	0,5 %	34,0	30,0	4
β-Methylglukosid	0,5 %	23,75	22,25	4
Amygdalin	0,5 %	7,75	8,0	6,5
Digitalin	0,5 %	0	0,5	4
Saponin	0,5 %	14,0	14,5	6,8
Aepfelsäure	0,5 %	26,0	25,5	4
Bernsteinsäure	0,5 %	17,5	16,75	4

wicklung notwendige Aneurin vorhanden ist. Pentosen sind für beide Pilze ungeeignet, was wohl darauf hinweist, dass diese Brandpilze auf ihrem natürlichen Substrat mehr auf die Inhaltstoffe der Zelle als auf die Wandstoffe angewiesen sind. Von den Hexosen ergibt Galaktose bei *U. scabiosae* keine Entwicklung, wohl aber bei *U. violacea.* Das Umgekehrte scheint nach der Tabelle für Laktose der Fall zu sein, die scheinbar von *U. scabiosae* verwertet werden kann. Es erscheint aber sehr wahrscheinlich, dass die Laktose durch die Sterilisation in der

sauren Nährlösung teilweise hydrolysiert wurde, so dass durch die entstandene Glukose eine mittelmässige Entwicklung des Pilzes ermöglicht wurde. In den Versuchen mit *U. violacea* war die Laktose nicht mit der Nährlösung sterilisiert worden. Raffinose und Inulin können von *U. scabiosae* verwertet werden, von *U. violacea* aber nicht. Auffällig ist, dass *U. scabiosae* sowohl α- als auch β-Methylglukosid als C-Quelle benützen kann. Der Pilz scheint also eine α- und eine β-Glukosidase zu bilden.

Für *Ustilago violacea* haben wir nachgewiesen, dass dieser Pilz aus dem Saponin gewisse Wachstumsfaktoren bezieht. Ferner konnten wir zeigen, dass *U. violacea* auch durch relativ hohe Konzentrationen des Saponins nicht gehemmt wird. Eine Hemmung trat erst bei einer Saponinkonzentration von 5 % ein. Da Saponine in den Nährpflanzen von *U. violacea* weitverbreitet sind und dort gelegentlich in hohen Konzentrationen auftreten, darf man wohl die Resistenz dieses Pilzes gegenüber dem Saponin als eine Anpassung an die Nährpflanze bezeichnen. Es war nun interessant, zu untersuchen, wie sich *U. scabiosae,* deren Wirtspflanzen sich nicht durch einen besondern Saponingehalt auszeichnen, in dieser Beziehung verhält. Es stellten sich dabei zwei Fragen: 1. Wirken die in den Handelspräparaten des Saponins enthaltenen Wachstumsfaktoren auch auf *U. scabiosae* fördernd? 2. Erträgt *U. scabiosae* ebenso hohe Saponinkonzentrationen wie *U. violacea*? Mit dem A-Stamm aus Baarn wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Kontrolle (gewöhnliche Nährlösung mit 2% Glukose) . .	NW 10,0
Nährlösung ohne Glukose mit 0,5% Saponin (Siegfried) .	NW 13,0
» » » » 1 % »	NW 18,9
» mit 2% Glukose + 0,5% Saponin	NW 29,0
» » 2% » + 1 % »	NW 24,8
» » 2% » + 2 % »	NW 17,2
» » 2% » + 0,5% » + 0,02 γ B_1 .	NW 25,0
» » 2% » + 1 % » + 0,02 γ B_1 .	NW 21,0
» » 2% » + 2 % » + 0,02 γ B_1 .	NW 10,0
» » 2% » + 0,02 γ B_1	NW 30,5

Die Resultate werden hier dadurch etwas verschleiert, dass auch in den Kontrollkulturen ein deutliches Wachstum auftrat. In den Kulturen ohne Glukose zeigt auch *U. scabiosae* eine mittelmässige Entwicklung, die auf das Saponin und seine Verunreinigungen zurückgeführt werden muss. Mit Glukose und Saponin zusammen erhalten wir dieselben Werte wie mit Glukose und Aneurin. Die in den Saponinpräparaten vorhandenen aktiven Verunreinigungen wirken also auch auf *U. scabiosae* fördernd. Dagegen ist dieser Pilz gegenüber höhern Saponinkonzentrationen viel empfindlicher als *U. violacea.* Schon mit 2 % Saponin zeigt *U. scabiosae* deutliche Hemmungen, während *U. violacea* sogar noch mit 10 % Saponin gut gedeiht (Blumer, 2). Dies weist darauf hin, dass die

Tabelle 7.

Wachstum der beiden Geschlechter mit verschiedenen Stickstoffquellen.
(0,02 γ Aneurin pro 25 ccm.)

Stickstoffquelle (1 ‰)	Nephelometrische Werte		pH nach 16 Tagen ca.
	Geschlecht A (St. Ba 6 u. M 13)	Geschlecht B (St. Ba 5 u. M 26)	
Kontrolle ohne N	3,5	4,0	4
Harnstoff	18,75	19,1	8,4
Ammoniumsulfat	41,25	39,9	3
Ammoniumzitrat	39,25[1]	37,75[1]	4,5
Ammoniumnitrat	15,75	16,0	3,5
Ammoniumtartrat	43,0	37,75	4,5
Ammoniumchlorid	39,25	37,5	4
Ammoniumphosphat	35,6	35,75	4,5
Kaliumnitrat	20,25	16,6	5,8
Kalziumnitrat	18,75	16,5	5,5

[1] Starke Pigmentbildung.

Toleranz der *Ustilago violacea* gegenüber hohen Saponinkonzentrationen tatsächlich als Anpassung an die Wirtspflanzen aufgefasst werden kann. Die beiden Pilze zeigen im übrigen in ihrem Verhalten gegenüber zahlreichen Kohlehydraten so viele Uebereinstimmungen, dass die mit Saponin beobachteten Unterschiede um so mehr auffallen müssen.

Aus Tab. 6 sind die ungefähren pH-Werte am Schlusse des Versuches ersichtlich. Sie wurden mit dem Universalindikator von Merck ermittelt. Gegenüber *U. violacea* fällt auf, dass bei Verwendung einer gut assimilierbaren Kohlenstoffquelle das pH kaum nach der alkalischen Seite verschoben wird. Dies tritt nur mit einigen nicht zusagenden C-Quellen ein. Diese Versuche müssten natürlich mit gepufferten Nährlösungen wiederholt werden.

2. Stickstoffquellen.

Aus Tabelle 7 geht hervor, dass *Ustilago scabiosae* mit verschiedenen Ammoniumsalzen als N-Quelle gut gedeiht. Ebenso ergibt Harnstoff zunächst eine gute Entwicklung, die dann aber wohl wegen der sehr intensiven Ammoniakbildung abgestoppt wird. Gegenüber *U. violacea* ist das ziemlich gute Wachstum auf Kaliumnitrat und Kalziumnitrat hervorzuheben. *U. scabiosae* scheint in ihrer Stickstoffversorgung weniger stark heterotroph zu sein als *U. violacea*.

Von den Aminosäuren kann eine grosse Zahl als gute N-Quellen betrachtet werden. Auch hier bestätigte sich, dass in den Fällen, wo beide optischen Modifikationen verwendet werden konnten, nur die Form eine gute Entwicklung ergibt, die im natürlichen Eiweiss vor-

Tabelle 8.
Wachstum der beiden Geschlechter mit verschiedenen Aminosäuren, Di- und Tripeptiden (2 % Glukose, 0,02 γ Aneurin, Versuchsdauer 17 Tage).

Stickstoffquelle (1 ‰)	Geschlecht A (St. Ba 6)	Geschlecht B (St. Ba 5)
Glykokoll	24,5	27,0
l-Alanin	14,25	17,25
d-Alanin	36,0	37,0
d,l-Serin	30,5	33,5
l-Cystin	7,25	9,0
d,l-Valin	28,5	30,5
l-Valin	4,5	4,0
d-Valin	25,75	25,5
d,l-Leucin	22,5	20,0
l-Leucin	21,0	16,25
d-Leucin	3,5	4,0
d,l-Isoleucin	19,25	21,0
l-Isoleucin	6,25	6,5
d-Isoleucin	24,5	21,75
d,l-Phenylalanin	16,0	17,25
l-Phenylalanin	21,5	16,0
d-Phenylalanin	7,75	5,0
d-Dioxyphenylalanin	7,5	6,0
l-Tryptophan	3,5	3,0
l-Histidin	19,25	20,0
d,l-Histidinmonohydrochlorid	20,0	17,0
l-Histidinmonohydrochlorid	19,0	22,0
d-Histidinmonohydrochlorid	6,0	4,75
d-Arginin	34,5	29,0
d-Ornithindihydrochlorid	34,0	33,0
d-Lysindihydrochlorid	31,0	31,5
d,l-Asparaginsäure	27,0	30,25
l-Asparaginsäure	28,0	35,0
l-Asparagin	33,5	34,5
d-Glutaminsäure	26,5	37,25
d,l-Prolin	32,0	30,25
l-Prolin	30,5	33,0
l-Tyrosin	19,5	27,5
Glycylglycin	27,5	26,5
d,l-Alanyl-glycin	31,5	34,0
l-Leucyl-glycin	29,25	28,0
Glycyl-d,l-Leucin	34,5	32,0
d,l-Leucyl-glycyl-glycin	29,0	28,0
l-Leucyl-glycyl-glycin	29,25	30,5
d-Leucyl-glycyl-glycin	28,25	28,25
Diglycyl-glycin	30,5	26,5

kommt, also z. B. d-Valin, d-Isoleucin, l-Leucin, l-Phenylalanin, l-Histidin usw. Eine Ausnahme bildet in dieser Beziehung das l-Alanin, mit dem immerhin ein mittelmässiges Wachstum erzielt werden konnte, das allerdings um mehr als die Hälfte geringer ist als auf der natürlichen d-Form. Die Zahl der für *U. scabiosae* verwertbaren Aminosäuren scheint etwas grösser zu sein als für *U. violacea* und für *Phycomyces* (Schopfer, 11).

Mit Leucin und Isoleucin als Stickstoffquelle bildet der Pilz eine Fettsäure. Nach dem Geruch dürfte es sich um Buttersäure handeln. Diese für einen Pilz immerhin bemerkenswerte Eigentümlichkeit wurde vorläufig nicht näher untersucht.

Die wenigen Versuche mit Di- und Tripeptiden geben zu keinen Bemerkungen Anlass. Alle verwendeten Präparate ergaben ein gutes Wachstum (Tab. 8).

Als sehr gute Stickstoffquellen erwiesen sich ferner alle verwendeten Peptone. Die meisten dieser Präparate enthalten auch Wirkstoffe (vgl. auch Orla-Jensen u. Mitarb., 8), so dass *U. scabiosae* mit diesen Peptonen auch ohne Zusatz von Aneurin gut gedeiht. Ausnahmen sind in dieser Hinsicht Bacto-Protone, Pepton Merck und Peptone spongieuse, wo ein Zusatz von Aneurin für eine gute Entwicklung des Pilzes notwendig ist. (Tab. 9.)

Tabelle 9.

Entwicklung von *Ustilago scabiosae* mit verschiedenen Peptonen.

Pepton	Nephelometrische Werte nach 16 Tagen	
	ohne Aneurin	mit 0,02 γ Aneurin
Bacto-Peptone (Difco)	37,5	34,5
Proteose-Peptone (Difco)	32,75	38,0
Neopeptone (Difco)	37,0	33,5
Bacto-Tryptone (Difco)	37,5	37,0
Bacto-Protone (Difco)	3,0	30,0
Peptonum siccum sine sale (Merck 7212)	6,0	37,5
Pepton Witte	34,25	42,75
Peptone for bacteriological use (B. D. H.)	35,5	36,25
Peptone de soie (Rhône-Poulenc)	44,75	46,0
Peptone pepsique pour bactériologie (Rhône-Poulenc)	36,25	37,0
Peptone exempte d'indol (Rhône-Poulenc)	44,5	36,0
Peptone spongieuse (Rhône-Poulenc)	2,25	25,5
Peptone sèche de Chapoteaut	39,0	34,5
Peptone bactériologique spéciale (Byla)	40,0	46,0
Peptone granulée	40,0	36,5

III. Das Verhalten der beiden Geschlechter.

1. Kopulationsbedingungen.

In Objektträgerkulturen, die unter einer Glasglocke gehalten werden, kopulieren die Sporidien von *Ustilago scabiosae* schon nach 12—24 Stunden leicht und reichlich. Es bilden sich kurze Kopulationsbrücken, aus denen ein ziemlich langer Mycelfaden (Suchfaden nach Bauch) auswächst (Abb. 4). Bei reichlicher Kopulation bilden diese Suchfäden oft dichte Knäuel, so dass man in solchen Kulturen die sexuelle Reaktion sogar makroskopisch feststellen kann.

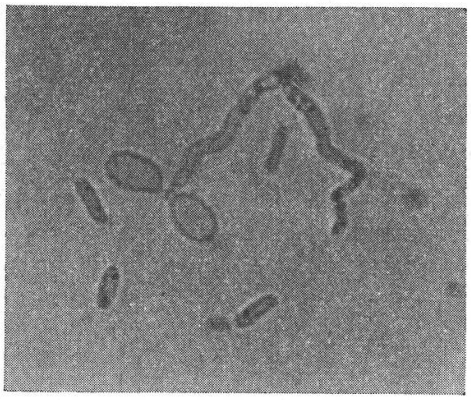

Abbildung 4.
Kopulation von Ustilago scabiosae. Bildung des Suchfadens.
Vergr. etwa 800.

Bauch (1) hat für *Ustilago violacea f. sp. dianthi deltoidis* nachgewiesen, dass die Kopulation nicht durch den Nährstoffgehalt, sondern durch die Sauerstoffspannung des Mediums bedingt wird. Auch für *U. scabiosae* ist Sauerstoffzutritt die Hauptbedingung für das Zustandekommen der Kopulation. Die Zusammensetzung des Mediums scheint dagegen nur von untergeordneter Bedeutung zu sein. In Leitungswasser, destilliertem Wasser und Nährlösung mit oder ohne Zusatz von Aneurin erfolgte die Kopulation mit gleicher Leichtigkeit. Bauch erwähnt, dass schon geringe Säuregrade hemmend auf die Kopulation wirken. Dies trifft für *Ustilago scabiosae* nicht zu, da in unserer gewöhnlichen, ziemlich sauren Nährlösung (pH ca. 4) noch keine Hemmung der sexuellen Reaktionen zu beobachten war.

Dagegen konnte ich in Uebereinstimmung mit Bauch feststellen, dass die Kopulation durch hohe Konzentrationen von Glukose und Asparagin deutlich gehemmt wird, wie aus Tab. 10 hervorgeht. Ob diese Hemmung auf die molekulare Konzentration dieser Substanzen, auf die zunehmende Viskosität des Mediums oder auf eine langsamere Diffusion der hypothetischen Sexualstoffe zurückgeführt werden muss, soll hier nicht erörtert werden.

Tabelle 10.

Wirkung von steigenden Glukose- und Asparaginkonzentrationen auf die Kopulation.

		% Glukose								
		0	0,05	1	2	4	8	10	15	20
‰ Asparagin	0	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+
	0,01	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+
	0,05	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+
	0,1	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	0
	0,5	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	0
	1	+++	+++	+++	++	++	++	++	0	0
	2	+++	+++	+++	++	++	++	++	0	+
	5	+++	+++	+++	+	+	++	++	0	0

Zeichenerklärung:

+++ starke Kopulation nach 20—22 Std.
++ schwache „ „ 20—22 Std., starke nach 40—42 Std.
+ keine „ „ 20—22 „ schwache „ 40—42 „
0 keine „ „ 40—42 „

2. Sekundäre Geschlechtsmerkmale.

Die Sporidien der beiden Geschlechter von *Ustilago scabiosae* sind morphologisch nicht voneinander zu unterscheiden. Es unterliegt aber keinem Zweifel, dass trotz der morphologischen Isogamie eine physiologische Anisogamie besteht. Diese kann nur durch das Experiment aufgedeckt werden und äussert sich in einem verschiedenen Verhalten der beiden Geschlechter gegenüber einer gegebenen Substanz. Die Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern sind chemischer Natur und müssen in letzter Linie auf Verschiedenheiten in der Konstitution des Zytoplasmas beruhen, wodurch die besondere Affinität gegenüber bestimmten Substanzen bedingt wird.

Man bezeichnet diese Unterschiede als Geschlechtsmerkmale physiologischer Natur. Diese Fragen, die zu zahlreichen Kontroversen führten, wurden zuerst für die heterothallischen Mucorineen aufgeworfen (Korpatchewska, 4; Schopfer, 10; Wesendonck, 17 usw.). Um von sekundären Geschlechtsmerkmalen sprechen zu können, muss die Bindung dieser Eigenschaften mit dem Geschlecht eine absolute sein, sie dürfen in keinem Falle auf das andere Geschlecht übergehen, und vor allem müssen sich alle Stämme verschiedener Herkunft gleich verhalten. Diese Kriterien sind aber für heterothallische Pilze noch nirgends vollkommen erfüllt.

Ein für solche Untersuchungen besonders geeignetes Objekt ist *Phycomyces*. Hier konnte gezeigt werden, dass die gelbe Farbe des

Mycels, die auf der Bildung von Karotin beruht, in Beziehung zum Geschlecht steht (Schopfer, 10). Die Unterschiede sind quantitativ. Das + Geschlecht bildet im allgemeinen mehr Carotin als das — Geschlecht, doch kommen zwischen gelber und weisser Färbung alle Uebergänge vor. Die Bindung dieses Merkmals mit dem Geschlecht ist also nicht eine vollkommene, sondern es handelt sich mehr um die Häufigkeit des Auftretens dieses Merkmals bei einem Geschlecht im Vergleich zum entgegengesetzten Geschlecht. Selbstverständlich kann man nur dann « sekundäre Geschlechtsmerkmale » annehmen, wenn ihre Uebertragung vollständig den Gesetzen der Haplontenvererbung entspricht.

Für die Ustilagineen konnten Kniep (3) und Bauch (1) das Vorkommen «sekundärer Geschlechtsmerkmale» wahrscheinlich machen. Sie wiesen für *Ustilago violacea f. sp. dianthi deltoidis* nach, dass sich Sporidien der beiden Geschlechter nicht nur in ihrer sexuellen Tendenz, sondern auch in ernährungsphysiologischer Hinsicht unterscheiden.

Allerdings hat Thren (16) bei *Ustilago nuda* deutliche Beziehungen zwischen Wuchsbild und Geschlecht nachgewiesen. Er stellte ferner fest, dass das (+) Geschlecht von *Ustilago nuda* im Gegensatz zum (—) Geschlecht auf Kartoffelagar nicht gedeiht. Es scheinen hier gewisse Stoffe zu fehlen, wobei man vielleicht an Wachstumsfaktoren denken könnte. Da aber diese Art nach unsern Beobachtungen auxoautotroph ist (Schopfer und Blumer, 14, 15), dürfte es sich eher um gewisse ernährungsphysiologische Unterschiede handeln.

Um eventuelle ernährungsphysiologische Verschiedenheiten der beiden Geschlechter nachzuweisen, wurden sämtliche Versuche mit beiden Geschlechtern durchgeführt. Zeigten sich irgendwo auffällige Unterschiede, so wurden diese Versuche mit andern A- und B-Stämmen wiederholt, wobei streng darauf geachtet wurde, dass das Impfmaterial gleich alt und in gleicher Weise vorbehandelt worden war. In den meisten Fällen zeigte es sich dann, dass die vermeintlichen « sekundären Geschlechtsmerkmale » nur als zufällige Unterschiede betrachtet werden müssen.

Die Wachstumsintensität der beiden Geschlechter kann in einzelnen Versuchen bedeutende Unterschiede zeigen, doch sind diese als zufällig zu bezeichnen. In einem orientierenden Versuche wurden 20 A-Stämme von Baarn und Morges, sowie 16 B-Stämme in je 6 Kolben in unserer gewöhnlichen Nährlösung kultiviert. Es ergab sich (bei einer annähernd optimalen Aneurinkonzentration von 0,01 γ pro 25 ccm) für das A-Geschlecht ein durchschnittlicher nephelometrischer Wert von 29,93 und für das B-Geschlecht 29,54. Ebenso zeigen die Abbildungen 1 und 2, dass sich die beiden Geschlechter auch in ihrem Vitaminbedarf in keiner Weise unterscheiden. Dasselbe gilt für die verschiedenen Kohlenstoffquellen, wie auch für die Ammoniumsalze und Nitrate (Tab. 6 bis 8).

Relativ bedeutende Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern ergaben sich nach Tab. 8 mit einigen Aminosäuren (l-Leucin, d-Arginin, l-Asparaginsäure, d-Glutaminsäure und Prolin). Diese Versuche wurden mit andern Stämmen von *Ustilago scabiosae* wiederholt. Dabei zeigte es sich, dass wenigstens in bezug auf Glutaminsäure und Asparaginsäure gewisse Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern bestehen (Tab. 11). Das Wachstum der B-Stämme ist mit Glutaminsäure als Stickstoffquelle etwas besser als das der A-Stämme. Für Asparaginsäure sind die Unterschiede geringer und daher entsprechend unsicherer.

Tabelle 11.
Unterschiede im Wachstum der beiden Geschlechter verschiedener *Ustilago*-Arten in *Glutaminsäure* und l-Asparaginsäure.

Art	d-Glutaminsäure		l-Asparaginsäure	
	A	B	A	B
U. scabiosae:				
1. Einsporidienkulturen von Morges (Durchschnittswerte von 17 A-Stämmen und 16 B-Stämmen) . .	37,3	43,0	38,32	41,59
2. Stämme von Baarn	34,8	39,1	35,3	39,3
U. violacea:				
1. f. sp. melandrii rubri (2 A-Stämme und 2 B-Stämme)	25,0	24,25	—	—
2. f. sp. melandrii albi (2 A-Stämme und 3 B-Stämme)	37,5	36,1	36,5	34,5
3. f. sp. dianthi deltoidis (Baarn) .	27,3	34,7	27,0	32,1
U. longissima (St. A und F von Baarn)	34,25	43,0	36,75	43,75

In Tab. 11 wurden auch noch die Ergebnisse eines Versuches mit andern *Ustilago*-Arten aufgenommen. *U. violacea f. sp. dianthi deltoidis* und *U. longissima* zeigen mit Glutaminsäure und Asparaginsäure ähnliche Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern wie *U. scabiosae*. Da aber diese Versuche nur mit je einem Stamme durchgeführt werden konnten, kann die Uebereinstimmung rein zufällig sein, oder es könnte sich um ein Merkmal bestimmter Sippen handeln.

Die hier beobachteten « sekundären Geschlechtsmerkmale », die sich in einem unterschiedlichen Wachstum mit Glutaminsäure als Stickstoffquelle äussern, sind besonders im Hinblick auf die Untersuchungen von Kniep (3) und Bauch (1) interessant. Kniep wies 1919 nach, dass auf Gelatinenährböden das eine Geschlecht von *Ustilago violacea f. sp. dianthi deltoidis* mehr oder weniger gehemmt wird. Bauch, der diese Untersuchungen weiterführte, konnte feststellen, dass das B-Ge-

schlecht, das auf Malznährböden gut wächst, auf verschiedenen Gelatinefabrikaten (aber nicht auf allen !) deutlich gehemmt wird. Die Hemmung verschwindet, wenn die Gelatine durch Erhitzen, Säurehydrolyse oder auf enzymatischem Wege abgebaut wird. Die beiden wichtigsten, aus dem Abbau des Glutins hervorgehenden Aminosäuren, Glykokoll und Glutaminsäure zeigen keine hemmende Wirkung mehr. Bauch vermutet deshalb, dass die Hemmung durch die bei teilweisem Abbau des Glutins entstehenden Albumosen, Peptone und Polypeptide bewirkt werde. Es zeigte sich, dass eine Reihe anderer nativer Eiweissarten oder ihre Spaltungsprodukte die gleiche Hemmung bewirkten. Das B-Geschlecht wurde in den Versuchen von Bauch auch durch Dinatriumphosphat gehemmt.

Unsere Versuche bestätigen für *Ustilago violacea f. sp. dianthi deltoidis,* dass die Hemmung des B-Geschlechts auf alle Fälle nicht durch Glutaminsäure bewirkt werden kann. Diese Aminosäure scheint im Gegenteil fördernd zu wirken, wie dies für das B-Geschlecht von *Ustilago scabiosae* als sicher bezeichnet werden darf. Allerdings können gewisse Zweifel aufkommen, ob unsere Versuche mit denen von Bauch überhaupt vergleichbar sind. Abgesehen davon, dass Bauch mit Nährböden von sehr komplexer Zusammensetzung arbeitete, erwähnt er ausdrücklich, dass sich die ursprünglich sehr deutlichen Unterschiede bei längerer Kultur verwischen. Sie scheinen also nur während der ersten Periode der Anpassung an die Kultur auf künstlichen Nährböden zu bestehen. Aus diesem Grunde kann die Kultur auf Gelatinenährböden auch nicht als Test für das Geschlecht benützt werden. Auch die von uns an *Ustilago scabiosae* beobachteten « sekundären Geschlechtsmerkmale» eignen sich als Test für das Geschlecht nicht, da die Unterschiede gering sind und nur durch eine grosse Zahl von Versuchen festgestellt werden können.

Zusammenfassung.

1. *Ustilago scabiosae* gedeiht in einer synthetischen Nährlösung nur bei Zusatz von Aneurin. Das Optimum liegt bei 0,02 γ pro 25 ccm Nährlösung.
2. Die fördernde Wirkung einer optimalen Dosis von Aneurin kann durch die entsprechenden Mengen von Pyrimidin und Thiazol nur zum Teil ersetzt werden. Nur wenn die beiden Komponenten des Aneurinmoleküls in viel höherer Konzentration zur Verfügung stehen, ergibt sich eine optimale Entwicklung. *Ustilago scabiosae* gehört also demselben Typus an wie Phycomyces, doch erfolgt die Aneurinsynthese nicht so leicht wie bei diesem Pilze.
3. Eine optimale Entwicklung wird auch erreicht, wenn die eine Komponente des Aneurinmoleküls in suboptimaler Dosis, die andere aber in stark supraoptimaler Dosis verabreicht wird.

4. Bei frisch isolierten Stämmen wirken Dosen von Pyrimidin plus Thiazol, die einer optimalen Aneurinkonzentration entsprechen, ebenso stark fördernd wie diese selbst. Die Aneurinheterotrophie erscheint also hier etwas weniger stark ausgeprägt als bei Stämmen, die sich seit längerer Zeit in Kultur befinden.
5. Von verschiedenen Pyrimidin- und Thiazolderivaten ergibt nur die Mischung von 2-Methyl-4-amino-5-amino-methyl-pyrimidin mit 4-Methyl-5-(β-hydräthyl)-thiazol eine gute Entwicklung. Die Konstitutionsspezifität ist also sehr ausgeprägt.
6. Die Kopulation der Sporidien erfolgt bei genügendem Luftzutritt leicht. Durch hohe Konzentrationen von Glukose und Asparagin wird sie gehemmt.
7. Die beiden Geschlechter unterscheiden sich in ihrem Aneurinbedarf nicht voneinander.
8. Glutaminsäure und Asparaginsäure fördern das B-Geschlecht etwas stärker als das A-Geschlecht.

Literatur.

1. Bauch, R. Kopulationsbedingungen und sekundäre Geschlechtsmerkmale bei Ustilago violacea. Biol. Zentralbl. **42**: 1—33. 1922.
2. Blumer, S. Untersuchungen über die Biologie von Ustilago violacea (Pers.) Fuck. (I. Mitteil.) Archiv für Mikrobiologie **8**: 458—478. 1937.
3. Kniep, H. Untersuchungen über den Antherenbrand (Ustilago violacea Pers.) Ein Beitrag zum Sexualitätsproblem. Zeitschr. f. Bot. **11**: 257 bis 284. 1919.
4. Korpatchewska, J. Sur le dimorphisme de quelques Mucorinées hétérothalliques. Thèse Genève. 1910.
5. Lwoff, A. et M. L'aneurine, facteur de croissance pour le Cilié Glaucoma piriformis. C. r. Soc. Biol. Paris **126**: 664. 1937.
6. — La spécifité de l'aneurine, facteur de croissance pour le Cilié Glaucoma piriformis. l. c. **127**: 1170. 1938.
7. Lwoff, M. L'aneurine, facteur de croissance pour les Strigomonas (Flagellés Trypanosomides). l. c. **128**: 241. 1938.
8. Orla-Jensen, S., N. C. Otte und Agnete Snog-Kjaer. Ueber Wuchsstoffe in den Peptonen. Zentralbl. f. Bakt. II. **94**: 452—459. 1936.
9. Robbins, W. J. Thiamin and the growth of species of Phytophthora. Bull. Torr. Bot. Club **65**: 267. 1938.
10. Schopfer, W. H. Recherches sur les caractères physiologiques d'une Mucorinée. Les caractères sexuels secondaires d'ordre physiologique. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **43**: 157—172. 1934.
11. — Recherches sur le métabolisme de l'azote d'un microorganisme acellulaire (Phycomyces Blakesleeanus Bgf.). Le rôle des facteurs de croissance. Protoplasma **28**: 381—434. 1937.
12. — Aneurine et hétérotrophie chez les microorganismes. Archiv f. Mikrobiol. **9**: 116—128. 1938.

13. Schopfer, W. H. Vitamine und Wachstumsfaktoren bei den Mikroorganismen mit besonderer Berücksichtigung des Vitamins B_1. Ergebnisse der Biologie **16**: 1—172. 1939.

14. Schopfer, W. H. und S. Blumer. Les facteurs de croissance des espèces du genre Ustilago. C. r. Ac. Sci. Paris **206**: 1141. 1938.

15. — Untersuchungen über die Biologie von Ustilago violacea (Pers.) Fuck. (II. Mitteil.) Archiv f. Mikrobiol. **9**: 305—367. 1938.

16. Thren, R. Gewinnung und Kultur von monokaryotischem und dikaryotischem Mycel. Zeitschr. f. Bot. **31**: 337—391. 1937.

17. Wesendonck, J. Ueber Geschlechtsmerkmale bei Phycomyces Blakesleeanus. Planta **10**: 456. 1930.