

Einiges über Turgor und Permeabilität bei Pilzsporen

von

C. J. BAART DE LA FAILLE.

Im botanischen Institut der Universität in Utrecht beschäftigte ich mich mit Untersuchungen über *Mucor racemosus* Fres. welche ich jetzt nicht mehr in der Lage bin weiter auszudehnen. Wenn sie also auch bei Weitem nicht als abgeschlossen zu betrachten sind, so wage ich es doch einige Resultate zu veröffentlichen welche mir merkwürdig genug erscheinen um die Aufmerksamkeit darauf zu lenken.

Mein Ziel war anfangs, Turgormessungen anzustellen; dabei kamen Verhältnisse heraus die grösstenteils auf dem ebenfalls interessanten Gebiete der Permeabilität lagen.

Die Sporen von *Mucor racemosus* haben für physiologische Untersuchungen alle erwünschten Eigenschaften: ansehnliche Grösse (8—14 bei 5—9 μ), Durchsichtigkeit und die Fähigkeit sich leicht mit Wasser zu benetzen. Ihre Bildung wurde von Büsgen ¹⁾ ausführlich beschrieben, vergl. auch die grundlegende Arbeit von O. Brefeld ²⁾ über *M. Mucedo* und die neuere von D. B. Swingle ³⁾ über *Rhizopus nigri-*

1) M. Büsgen, Jahrb. f. wiss. Bot. XIII. (1882).

2) O. Brefeld, Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze. Heft I.

3) D. B. Swingle, Formation of the spores in the Sporangia of *Rhizopus nigricans* and of *Phycomyces nitens*. U. S. Dep. of Agric. Plant Industry, Bull. No. 37.

cans und *Phycomyces nitens*. Hauptsache ist für meinen Zweck, dass sie sich mit einer eigenen Zellwand umgeben.

Qualitative Unterschiede zwischen den Sporen aus einem und demselben Sporangium fand ich nicht, wohl aber wichtige Aenderungen bei zunehmendem Alter.

Ich kultivierte den Pilz auf folgendem Boden: 5 gr. Glukose, 0,5 gr. Pepton, 0,1 gr. KH_2PO_4 , 0,05 gr. MgSO_4 und 7,5 gr. Gelatine mit destilliertem Wasser zu einem Volumen von 100 ccm. Von diesem Boden brachte ich je 15 ccm. in eine Glasdose. Die Kulturen über die ich hier berichte, standen bei Zimmertemperatur (15 bis 20° C.).

Die Sporangienträger stehen anfangs steif aufrecht, so dass man leicht einzelne mit einer Pinzette abbrechen kann. Die jüngsten fertigen Sporangien, z. B. die in einer 4-tägigen Kultur, zerfliessen noch nicht in Wasser; die Sporen lassen sich nur durch leichten Druck, oft schon durch vorsichtiges Auflegen des Deckglases, daraus befreien. Diese Sporen sind lang-elliptisch, gross (10—14 μ lang); ich will sie kurzweg als „junge“ bezeichnen.

Es folgt ein Stadium wo die Sporangien schon bei Berührung mit Wasser zerfliessen, und schliesslich eins wo schon in der Kultur die Sporen in Freiheit gelangt sind; sie sammeln sich dann in kleinen Tropfen zwischen den zusammengeklebten Trägern an. Es entstehen zwar anfangs fortwährend junge Sporangien, aber bei der beschränkten Nahrungsmenge kommt immer eine Zeit, — in etwa 2½-wochiger Kultur — wo es nicht mehr gelingt ein einziges intaktes Sporangium aufzufinden. Die Sporen welche ich aus 3-wochigen Kulturen untersuchte und als „alte“ bezeichne, waren also ein gemischtes Material aus mehreren zerflossenen Sporangien von verschiedenem Alter, aber doch alle schon längst freigeworden. Sie sind kleiner (6—11 μ lang) und weniger länglich als die jungen; sie haben deutliche Vakuolen, während diese in jungen Sporen nicht sichtbar sind. Die Möglichkeit einer Plas-

molyse liess sich also bei den alten voraussehen, war aber auch bei den jungen nicht ausgeschlossen: es könnte ja dem Protoplasma derselben soviel Wasser entzogen werden dass nicht nur die elastische Ausdehnung aufgehoben würde sondern auch der Protoplast sich zuruckzöge.

Die unbekannte Konzentration der Flüssigkeit welche in den ungeöffneten Sporangien resp. in den späteren kleinen Tropfen die Sporen umgab, könnte die Konzentration des Untersuchungsmediums beeinflussen wenn die Sporenmasse direkt aus ersterer in die letztere hinübergeführt würde. Darum verteilte ich stets eine genügende Menge Sporen in einen grossen Tropfen Wasser, brachte nach gutem Mischen kleine Tröpfchen daraus mittels einer Platinöse auf Objektträger und liess sie verdunsten (wodurch die Sporen keinen Schaden erleiden) um erst später einen Tropfen der Untersuchungsflüssigkeit darauf fallen zu lassen. Unterdessen hatte ich Deckgläser bereit liegen deren Ränder mit Vaseline versehen waren, und diese legte ich schnell auf, so dass Verdunsten der Flüssigkeit ausgeschlossen war.

Als plasmolysierende Lösungen wählte ich zuerst zwei welche schon De Vries mit Vorliebe bei seinen grundlegenden plasmolytischen Untersuchungen ¹⁾ benutzte: Kalisalpeter und Saccharose in wechselnder Konzentration.

Ergebnisse. A. Junge Sporen.

Keine Zelle zeigte Plasmolyse, weder in schwachen, noch in stärkeren, sogar in gesättigten Lösungen von Saccharose. Ebenso wenig in einer zur Vergleichung herbeigezogenen Glukoselösung.

Auch in allen Konzentrationen von KNO_3 , und sogar in gesättigter Lösung von NH_4NO_3 , d. h. in der osmotisch stärksten Lösung die mir überhaupt zur Verfügung

1) H. de Vries, Eine Methode zur Analyse der Turgorkraft. Jahrb. f. wiss. Bot. XIV.

stand, fand ich keine Spur von Plasmolyse. Das sind ja merkwürdige Ergebnisse, denn wie ich später ausführlicher sagen werde, ein osmotischer Gegendruck wie der einer gesättigten Ammoniumnitratlösung ist in normalen Zellen etwas fast Undenkbares.

Ich wage aber jetzt noch nicht an die Deutung heranzutreten, da mir die Entscheidung zwischen einigen Möglichkeiten schwierig vorkommt. Eine mehr entscheidende Deutung lassen die Ergebnisse mit alten Sporen zu.

B. Alte Sporen. Saccharose.

In: gesätt. Lösung ($\pm 2,8$ mol) 50 % plasmol.

In	2 mol.	15 %	"
"	1,5 "	einzelne	"
"	1 "	keine	"

Die Plasmolyse war keine gewöhnliche, doch eine Schrumpfung, indem eine Seite sich gegen die andere einstülpte. Im Anschluss an meine weiteren Auseinandersetzungen fasse ich dieses so auf, dass der Zucker nicht einmal durch die Zellwand dringt, sondern diesen durch ihre osmotische Kraft von aussen zusammendrückt.

Glukose: übereinstimmende Zahlen.

KNO_3 und NH_4NO_3 : keine Spur von Plasmolyse sogar in gesättigter Lösung. Die stärkste Rohrzuckerlösung entspricht etwa 1,5 mol. KNO_3 , und der Druck der gesättigten Salpeterlösung von 2,7 mol. ist schon beträchtlich höher, so dass es interessant genug war, die Sporen ohne sichtbare Veränderung zwischen den Krystallen liegen zu sehen wenn ich den Tropfen verdunsten liess; am meisten überraschend war aber das Ausbleiben der Plasmolyse in der 11 mol. NH_4NO_3 -Lösung, deren osmotische Kraft mehr als siebenmal so gross war als die der Zuckerlösung welche schon Zellen aus dem selben Material plasmolysierte.

Die Tatsache dass wenigstens in einigen Medien Plasmolyse auftrat, bewies mir dass Zellwand und Protoplasma der alten Sporen nicht für Wasser undurchdringlich waren.

Es blieben mir nun drei mögliche Erklärungen dafür dass in den Salzlösungen kein Wasser entzogen wurde:

1°. Die Zellwand funktioniert als semi-permeabele Membran indem sie wohl Wasser aber keine Salzteilchen durchlässt. Die Zellen müssten sich dann verkleinern solange die Wand elastisch gedehnt ist, ja schliesslich durch den gewaltigen Druck von aussen zusammenschrumpfen, wozu sie die Fähigkeit haben wie wir es in den Zuckerlösungen sahen. Damit ist diese erste Möglichkeit beseitigt.

2°. Es findet eine regulatorische Bildung grosser Mengen osmotisch wirksamer Stoffe statt, und zwar wohl unter dem Einfluss der Salze, nicht aber unter dem der Zuckerlösungen. Das lautet erstens schon wenig verlockend; zweitens müsste es augenblicklich, z. B. innerhalb einer halben Minute, geschehen; denn da ich die Sporen immer unmittelbar nach dem Auflegen des Deckglases besah und dann in den Zuckerlösungen schon Plasmolyse eingetreten fand, so müsste zur selben Zeit in den Salzlösungen der wirksame Stoff schon anwesend sein. Drittens kann nichts von aussen mitwirken und muss der Inhalt der Sporen selber den Stoff liefern in einer so kolossalen Menge dass ich ihn dazu nicht für fähig halte. Schliesslich ist man gezwungen bei dieser Erklärung den kühnen Konsequenzen Raciborski's ¹⁾ zu folgen und den fraglichen Stoff für ein bisher unbekanntes Kohlehydrat zu halten mit nur zwei Kohlenstoffatomen.

3°. Viel einfacher scheint mir die letzte Möglichkeit: die Salze gehen augenblicklich, die Zuckerarten aber nicht oder langsam, durch Zellwand und Protoplasma in das Innere der Sporen über. Die Salze stossen auf keine semi-permeabele Wand und können also keine plasmolytische

1) M. Raciborski, Ueber die obere Grenze des osmotischen Druckes der lebenden Zelle. Bull. de l'Ac. des Sc. de Cracovie. Juillet 1905.

Wirkung ausüben, der Zucker dagegen wohl; letzterem schliessen sich die Reservestoffe innerhalb der Sporen an, da diese Stoffe den Turgor erhalten und bei der späteren Keimung notwendig sind, und diese Rolle nicht spielen könnten bei freiem Hinausdiffundieren.

Der Nachweis einer Permeabilität des Protoplasma für gelöste Stoffe ist nichts Neues. Wiederholt wurde hingewiesen auf die Notwendigkeit dass Nahrungsstoffe, wenn auch in geringen Mengen, durch das Protoplasma hindurch in das Innere der Zellen gelangen. Janse ¹⁾ unterschied Intra- und Extrameabilität und stellte in einigen Fällen fest dass Protoplasma in ungleichem Grade intra- und extrameabel sein kann. Die grösste Permeabilität fand er bei *Dictyota dichotoma*: „in 1.0 Aeq. KNO₃ zeigten die „Zellen sich nach 2,5 deutlich plasmolysiert während die „Contraction ungefähr $\frac{1}{4}$ des totalen Zellvolumens betrug. Dann aber fingen die Protoplasten sogleich an sich „wieder auszudehnen, bis 1' später die Plasmolyse völlig „verschwunden war“. (p. 385). De Vries ²⁾ empfand Schwierigkeiten beim Bestimmen des isotonischen Koeffizienten von Glyzerin und Ureum wegen der erheblichen Permeabilität des Protoplasma seiner Indikatorpflanze — meist *Tradescantia discolor*, bei einigen Versuchen auch *Begonia manicata* — für diese Stoffe.

Eine so kolossale Durchdringlichkeit aber wie bei meinen Mucorsporen war meines Wissens noch nicht bekannt. Ich hatte anfangs geglaubt vielleicht in Pilzsporen geeignete Indikatorzellen zum Bestimmen isotonischer Koeffizienten zu finden, ihre grosse Anzahl in jeden Sporangium und ihre Gleichförmigkeit würde sie dazu sehr geeignet machen;

1) J. M. Janse, Die Permeabilität des Protoplasma. Versl. en Meded. Kon. Ac. van Wetensch. Amst. Reeks III. Deel IV.

2) H. de Vries, in Bot. Ztg. 1888 u. 1889.

aber es wird nun jedem klar sein wie völlig diese Hoffnung bald verschwunden ist.

Sogar das Bestimmen des Turgors in den Sporen hat seine Schwierigkeiten. Es gilt hier, eine plasmolysierende Lösung von genügender osmotischer Kraft aufzufinden, die jedoch nicht in das Plasma eindringt. Salze mit relativ niedrigem Molekulargewicht und grosser Löslichkeit sind sonst dazu geeignet, hier aber nicht, wenn wenigstens das von mir gefundene Verhalten sich als allgemein gültig für Salze herausstellen sollte. In den gesättigten Zuckerlösungen wurde nur ein Teil der Sporen plasmolysiert; ich sehe also kein Mittel zum Plasmolysieren der übrigen und im Allgemeinen solcher Sporen die noch höheren Turgor besitzen.

Hierzu ein paar Bemerkungen.

1^a. Bisherigen Forschern gelang es stets, Pilzhypphen zu plasmolysieren, u. A. Pantanelli ¹⁾ Dieser war bemüht die Turgorregulationen zu studieren, d. h. die Aenderungen des Turgors ²⁾ nach Wechsel in der Zusammensetzung des Nähr-

1) E. Pantanelli, Zur Kenntnis der Turgorregulationen bei Schimmelpilzen. Jahrb. f. wiss. Bot. XL.

2) Unter Turgor versteht Pantanelli nicht wie im Sinne Sachs' und De Vries' den wirklichen Druck den der Inhalt einer turgeszenten Zelle auf ihre Wand ausübt, sondern den Druck den dieser Inhalt im unausgedehnten Zustand ausüben würde, bei gedehnten Zellen also ein zu hoher Wert. Welkende Teile verlieren nach P. wohl ihre Turgeszenz, nicht aber ihren Turgor solange das Protoplasma lebendig und die osmotisch wirksamen Stoffe in den Vakuolen enthalten bleiben. Wir haben hier zwar einen Gleichgewichtszustand vor uns, doch keinen Turgor, nur ein durch Wassermangel unwirksames osmotisches Vermögen: denn sobald durch die Kraft von innen die Wand auch nur einigermaßen nachgeben würde um das Volumen der Vakuolen zu vergrössern, würde sogleich das diese ausfüllende Wasser durch seine gewaltige Kohäsion jener Kraft ein Hinderniss entgegenstellen. Der Begriff Turgor sollte beschränkt bleiben auf turgeszente Zustände, d. h. bei genügender Wasserzufuhr.

mediums und bestimmte den Turgor sowohl mit NaNO_3 , nach der plasmolytischen wie nach der kryoskopischen Methode. Es sei gleich hervorgehoben dass dieser Forscher arbeitete mit *Aspergillus niger*, ich dagegen mit *Mucor racemosus*, und dass diese zwei so weit verschiedenen Pilze sich auch in dieser Hinsicht verschieden verhalten könnten. Jedenfalls giebt es aber auch wichtige Unterschiede zwischen Hyphen und Sporen, welche letztere doch immer Dauerzustände verkörpern. Einen solchen Unterschied werde ich weiter unten beschreiben. Doch in gewissem Grade ist auch das Protoplasma der Hyphen permeabel. Pantanelli fand dass in 2,3 mol. NaNO_3 , die Plasmolyse verschwand in 2 bis 3 Stunden, in $\frac{1}{3} \times 2,3$ mol. Glukose mit gleichem osm. Druck erst in 12 bis 24 Stunden. Die Verhältnisse sind weniger ausgeprägt als bei meinen Sporen, stimmen aber qualitativ damit überein in sofern, dass sie grössere Permeabilität für Salz als für Zucker bezeichnen. Merkwürdig ist der Umstand dass in 19 bis 20 % (2,3 mol.) NaNO_3 nur eine vorübergehende und erst in 35 % (4,1 mol.) eine bleibende Plasmolyse eintrat.¹⁾ Wenn Protoplasma schon gewisse Mengen durchlässt, warum denn nicht auch grössere? Aendert sich der Zustand des Protoplasma, oder stirbt die Zelle bevor sie die Plasmolyse rückgängig machen kann?

2°. Ich halte für wahrscheinlich dass das Vermögen mancher Schimmelpilze, auf hochkonzentrierten Lösungen zu wachsen, beruht auf Permeabilität ihres Protoplasma für den betreffenden Stoff. Raciborski²⁾ erhielt Pilze, worunter *Aspergillus niger*, auf gesättigten Lösungen von NaNO_3 (7,7 mol) und LiCl (noch etwa 3 mal stärker). Wie schon gesagt wurde, postuliert er die Anwesenheit eines bisher nie gefundenen organischen Stoffes, der „Glykolose“ in erstaunlich hoher Konzentration. Die mir weit natürlicher

1) l. c. S. 342.

2) Raciborski l. c.

vorkommende Erklärung durch Annahme einer Permeabilität hat er zwar nicht übersehen, aber merkwürdigerweise verwirft er den Gedanken auf Grund eines einzigen Versuches. Er brachte die Hyphen in absoluten Alkohol; wenn in den Zellen eingedrungenes Salz anwesend wäre, so hätte es in loco auskrystallisieren müssen, meint Raciborski; und da er dieses nicht beobachtete, schliesst er auf Abwesenheit von Salz im Innern der Zellen.

Gegen diesen Versuch will ich zwei Einwände erheben. Erstens fand ich nicht beschrieben, wieviel Zeit nach dem Hinzufügen des Alkohols die Hyphen besehen wurden. Mehr als einmal wurde auf das langsame Eindringen absoluten Alkohols aufmerksam gemacht; ich erinnere an Nobbe's Kleesamen die durch viermonatlichen Aufenthalt in Alkohol nicht geschadet wurden. Es wäre nicht unmöglich, dass auch Raciborski's Zellen zur Zeit der Beobachtung noch am Leben gewesen wären. Mir ist es wenigstens vorgekommen dass von Mucorsporen nach Benetzung mit einem Tropfen Alc. abs. und nach Verdunstung dieses Tropfens später in Nährlösung noch etwa die Hälfte keimte. Auch rief starker Alkohol bei den Sporen oft Plasmolyse hervor, ebenfalls ein Zeichen langsamen Eindringens.

Zweitens brauchte man etwaige Krystalle nicht innerhalb der Zellen zu erwarten: denn vor dem Auskrystallisieren durch die Mischung mit dem Alkohol hat die grösste Salzmenge vielleicht Zeit gehabt, durch das getötete Protoplasma nach aussen zu diffundieren. Ich sah Sporen die seit einer halben Stunde in Alc. abs. verweilten, von aussen bedeckt mit kleinen Krystallen die nur aus dem Innern stammen konnten. Janse¹⁾ fand, als er eindrungeenen Salpeter mittels einer Lösung von Diphenylamin in konz. Schwefelsäure nachweisen wollte, die blaue Verfärbung ausserhalb der getöteten Zellen; „das findet seine Erklärung darin dass

1) Janse l. c. S. 347—348.

der Salpeter viel rascher durch das tote Protoplasma und durch die Zellwand hinaus diffundiert wie die concentrirte Schwefelsäure hinein."

Ich hoffe hierdurch bewiesen zu haben dass Raciborski auf ungenügenden Gründen das Eindringen von Salz als Möglichkeit bei seinen Kulturen verwirft, und dass die Notwendigkeit nicht besteht, ihm in seinen weiteren Folgerungen beizupflichten.

Sehr bemerkenswert war auch das Verhalten der Mucor-sporen gegenüber Farbstoffen. Man bedient sich mancher Farbstoffe zur Unterscheidung zwischen lebendigem und totem Protoplasma, und nimmt stillschweigend dabei an, dass sie ungehindert durch die Zellwand diffundieren. Ich glaube hier einen Fall gefunden zu haben, wo dieses nicht zutrifft.

Auf eine Menge Sporen, welche in oben beschriebener Weise eben trocken auf einem Objektträger sich befanden, liess ich einen Tropfen Aether fallen. Ein Kontrollversuch lehrte mich dass nach dieser Behandlung keine Spore mehr keimte und ich sie alle als tot betrachten durfte. Nach Verdunsten des Aethers fügte ich einen Tropfen Wasser hinzu, gefärbt mit Eosin; die Sporen färbten sich zu meinem grossen Erstaunen nicht.

Diese Versuche wurden wiederholt und ausgedehnt, wobei zum Töten auch Alkohol verschiedener Stärke und hohe Temperatur (kochen in Wasser) verwendet wurden, und zum Färben neben Eosin auch Methylenblau und Säurefuchsin in wässriger Lösung und Hämatoxylin in Alkohol 50 %. Stets ergaben sich die gleichen negativen Resultate.

Ohne den Kontrollversuch hätte man glauben können, die Sporen wären nicht tot, was allerdings sehr befremdend wäre. Jedenfalls fehlt uns vorläufig ein sicheres direktes Kennzeichen zur Unterscheidung toter und lebendiger Spo-

ren, und wir sind genötigt indirekte Methoden zu gebrauchen, wie z. B. den Kontrollversuch, oder das Messen einer genügenden Anzahl Sporen aus einem Material vor und nach der Behandlung: denn in frischem lebendigem Zustande sind sie elastisch ausgedehnt, und nach dem Tode und dem Verlust des Turgors geht diese Ausdehnung zurück bis die Zellen nur noch die Dimensionen ihrer nicht gespannten Wände besitzen.

Es ist immerhin möglich dass man irgend einen unschädlichen Farbstoff finden wird der die getöteten Sporen wohl färbt. Ich wandte mich den Stoffen mit relativ einfachen Molekeln zu und bekam positive Resultate mit Jod und mit Pikrinsäure, die ich ohne vorheriges Töten hinzufügte; diese zwei sind aber selber giftig und daher nicht als Indikatoren verwendbar.

Man könnte noch Zweifel erheben, ob wirklich die Zellwand den gelösten Farbstoffen Widerstand leistet oder vielleicht das Protoplasma der Mucorsporen unfähig ist sie zu speichern. Man erwartet eher abnorme Verhältnisse bei Wandungen, deren Zusammensetzung ja im Pflanzenreich eine so mannigfache ist, als beim Protoplasma das uns überall als etwas Analoges erscheint. Aber eine definitive Entscheidung war notwendig, und diese bekam ich durch das Beobachten beschädigter Sporen. In den meisten meiner Versuche gab es einzelne mit beschädigter Zellwand, massenhaft bekam ich sie durch Zerquetschen mittels Druck auf das Deckglas. In ihnen färbte sich das Protoplasma vortrefflich. Zur Bestätigung kan noch folgender Versuch dienen: Ich kochte Sporen während einiger Minuten in gesättigter Ammoniumnitratlösung. Beim Abkühlen krystallisierte das Salz zu einer festen Masse. Als ich eine Probe daraus mit den darin zerstreut liegenden Sporen in Eosinwasser brachte, färbten sie sich alle, was ich weniger der vorhergehenden sehr hohen Temperatur zuschreibe als dem Umstand dass in die Zellhaut aller

Sporen die kaum $\frac{1}{2}$ μ breiten Nadeln des krystallisierenden Salzes sich wie Speere eingebohrt hatten: alle waren deutlich beschädigt. Ich darf also schliessen dass die Zellwand der Sporen für die Farbstoffe undurchdringlich war.

Wenn wir nun die Ergebnisse über Permeabilität der alten Sporen zusammenfassen, so zeigte sich die Zellwand impermeabel für Farbstoffe aus der aromatischen Reihe, ausgenommen Pikrinsäure; da die Farbstoffe schon in äusserst geringen Mengen deutlich färben, können wir wohl sagen dass die Impermeabilität eine absolute ist. Wie stark die Wand permeabel ist für Pikrinsäure und Jod, lässt sich noch nicht sagen. Für Zuckerarten und Aethylalkohol ist die Permeabilität höchstens eine geringe, da diese Stoffe ohne eigentliche Plasmolyse die Zellen zum Schrumpfen bringen. Für die beiden Nitrate aber, und vermutlich für anorganische Salze im Allgemeinen, ist sie sehr gross, da sonst auch Schrumpfungen vorkämen.

Ich vermute dass die Grösse der Molekel eine Rolle spielt bei der Permeabilität, und schliesse mich Janse an, der sich folgendermassen äussert ¹⁾: „Wenn man sich nun „denkt... dass die Molecüle jedes beliebigen Stoffes welche „eine gewisse Grösse nicht überschreiten, durchgelassen „werden... so wird die Annahme einer spezifischen Wirkung „der Vacuolenwand auf jeder einzelnen der Stoffe umgangen.“ Die Zahl der von mir geprüften Stoffe ist freilich zu gering um mit Bestimmtheit zu reden; aber die Salze und die Farbstoffe bilden wenigstens die zwei extremen Fälle, und die Pikrinsäure ist zwar keine sehr einfache Verbindung, braucht aber nur in geringer Menge eingedrungen zu sein.

Ich habe die jungen Sporen ruhen lassen nach dem mit ihnen erhaltenen negativen Resultat. Auch jetzt ist es mir noch nicht möglich dasselbe streng zu deuten, etwas

1) Janse l. c. S. 406.

aber lässt sich doch sagen. Dass sie nicht schrumpfen in den Salzlösungen, kann seinen Grund darin haben dass sie ebenso wie die alten vollkommen durchdringlich sind; aber auch darin dass sie vollkommen undurchdringlich sind nicht nur für das Salz, sondern auch für Wasser: denn ohne Wasserentziehung keine Schrumpfung. Letztere Möglichkeit streitet nicht mit dem Befund in Zucker, wo allerdings auch ein sehr hoher Turgor das Ausbleiben der Plasmolyse verursachen kann; dieser Turgor beruht dann entweder ganz auf gelösten Stoffen oder zum Teil auch auf dem Quellungsdruck, dem Pantanelli bei seinen jungen Hyphen ohne (oder: mit unsichtbaren) Vakuolen eine grosse Rolle zuschreibt.

Zwischen den beiden Extremen wird die Entscheidung künftig nicht allzu schwer sein, also: entweder Permeabilität für Salz und Wasser, oder Impermeabilität für beide.

Es scheint mir dass die Sporen, wenn sie aus dem schützenden Sporangium in Freiheit gelangen um eine kürzere oder längere Frist unter ungünstigen Verhältnissen weiter zu leben, für diese Reise ein Panzer mitbekommen, das sich erst später unter günstigeren Umständen lockert. Das ist die eigene Zellwand, deren Zusammensetzung und Eigenschaften ganz andere sind als die der Hyphen. Dafür ein Beispiel.

Unter dem Mikroskop hatte ich auch Hyphen von *Mucor racemosus* in fortwährender Beobachtung als ich Farbstoffe (resp. Eosin und Methylenblau) durchsog. Die Wandungen der Hyphen färbten sich augenblicklich, die Färbung hielt gleichen Schritt mit dem Weiterschreiten der Lösung, auch da wo dieselbe umgebogene Hyphen erreichte und also nur von aussen und nicht durch ein offenes Ende eindringen konnte.

In irgend einem Stadium muss die Substanz der Sporenwand in die der Hyphenwand übergehen; und meine Meinung ist dass dieses geschieht in den vorbereitenden

Stadien der Keimung, wo die Membran quellungsfähig wird. Das Quellen ist keine Eigenschaft der Sporen solange sie sich in der Kultur befinden, denn darin fand ich nie gequollene oder gekeimte Sporen. Eine Vorbereitung ist notwendig unter dem Einfluss gewisser Stoffe, die selber keine Nährstoffe zu sein brauchen.¹⁾ Ich halte es für wahrscheinlich dass die Wirkung solcher Stoffe beruht auf einer Reizung des Protoplasma, wodurch dieses ein lockerndes Enzym ausscheidet.

Eine der frühesten Veränderungen der Wand vor der Keimung wird das Durchdringlichwerden für gelöste Stoffe, z.B. Farbstoffe, sein. Einer meiner Versuche, der anfangs schwer zu deuten war, weist darauf hin.

Ich hatte Sporen unter abgeschlossenen Deckgläsern in Zuckerlösungen verschiedener Stärke, gefärbt mit Eosin. Einzelne keimten, und zwar in den Lösungen mittlerer und schwacher Konzentration, aber Mangel an Sauerstoff muss sie bald getötet haben. Als ich nach vierwöchigem Liegen die Sporen besah, waren in den stärksten Lösungen, worin keine Keimung stattgefunden hatte, keine gefärbt, in den schwächeren Lösungen viele oder alle.

In:	2 mol. Sacch:	keine	gekeimt,	keine	gefärbt.
"	1,5	"	"	einzelne	"
"	1,0	"	"	"	50 %
"	0,75	"	"	wenige	90 %
"	0,5; 0,3; 0,2	"	"	"	90—100 %
"	0,1; 0,05	"	"	"	100 %
"	0	"	"	einzelne	fast 100 %

Wenn ich auch diesen Versuch nicht als streng beweiskräftig betrachte, so ist es doch auffallend dass in den höhern Konzentrationen Uebereinstimmung herrschte, und in den schwächern zwar ausser den gekeimten noch mehr Sporen sich färbten, aber das Ausbleiben der Quellung und

¹⁾ S. z. B.: B. M. Duggar, Bot. Gazette. XXXI. p. 38—66.

des Austreibens von Keimschläuchen leicht dem Sauerstoffmangel zuzuschreiben ist. Nur die vorbereitenden Stadien werden hier noch stattgefunden haben, wodurch die Wand permeabel geworden ist für das Eosin.

Ich brauche kaum zu sagen wie Vieles noch zur Erforschung übrig bleibt, wie z. B. die Permeabilität für andere Stoffe, die Uebergänge zwischen jungen und alten Sporen, die Verhältnisse bei andern Pilzen. Da ich jedoch meine Untersuchungen beenden musste, kann ich nur dieses Gebiet warm empfehlen.

Zusammenfassung der Resultate.

1. Bei *Mucor racemosus* ist scharf zu unterscheiden zwischen jungen und alten Sporen.
2. Für junge muss noch unentschieden bleiben ob sie absolut permeabel oder absolut impermeabel für Wasser und Salzteilchen sind.
3. Für alte darf ich schliessen dass ihr Protoplasma für Nitrate absolut permeabel ist, denn in den stärksten Lösungen zeigt sich keine Spur von Plasmolyse, während in anderen Medien wohl Wasser entzogen werden kann.
4. Ein solches Medium ist eine Lösung von Saccharose oder Glukose: da keine wahre Plasmolyse sondern Schrumpfung eintritt, schliesse ich auf Undurchdringlichkeit der Zellwand der Sporen für Zucker.
5. In *Muc. rac.* haben wir meines Wissens den ersten Fall von Undurchdringlichkeit einer Zellwand für gelöste Farbstoffe, so dass uns hier vorläufig eine direkte Methode fehlt um den Tod des Protoplasma zu konstatieren.
6. Die Wand der Sporen betrachte ich als ein Panzer das sich in den vorbereitenden Stadien der Keimung lockert, und für viele Stoffe erst dann durchdringlich wird.
7. Turgorbestimmungen können bei *Mucorsporen* nicht mit Salzlösungen geschehen, während Zuckerlösungen dazu

oft nicht in genügender Konzentration darzustellen sind: in diesen Fällen fehlt uns vorläufig ein Mittel zum Plasmolysieren.

8. Das Vermögen vieler Schimmelpilze, auf hochkonzentrierten Salzlösungen zu wachsen, wird beruhen auf Permeabilität und nicht wie Raciborski meint auf dem Vorhandensein bisher unbekannter organischer Stoffe.

UTRECHT, Juli 1906.
