Untersuchungen über die Gattung Coprinus.

Von James R. Weir.

(Mit 25 Abbildungen im Text.)

Einleitende Bemerkungen über die Vegetation mistbewohnender Coprinus-Arten.

Da ich bei meinen Arbeiten sehr häufig Coprinus-Arten auf den Misthaufen in Gärtnereien suchte, beobachtete ich einige merkwürdige Tatsachen in bezug auf die Aufeinanderfolge verschiedener Coprinus-Arten auf ein und demselben Misthaufen. Wenn eine Art von Coprinus in großen Massen aufgetreten und nach der Sporenentwicklung allmählich abgestorben ist, so tritt keine junge Generation derselben Art von neuem auf, sondern eine andere verschiedene Art in großer Ausdehnung, und dies wiederholt sich während des ganzen Sommers. Ohne Zweifel waren die Sporen der verschiedenen Arten schon vorher im Mist vorhanden, denn durch Anflug konnte kaum eine so ausgiebige Pilzproduktion plötzlich sich zeigen. Aber nicht nur bei Coprinus-Arten fand ich den sukzessiven Wechsel einer ganzen Anzahl von Arten, sondern auch bei anderen mistbewohnenden Pilzen beobachtete ich dasselbe Prinzip. Diese Beobachtungen veranlaßten mich, an einem frisch ausgeworfenen Haufen von Pferdedung das allmähliche Erscheinen verschiedener Coprinus-Arten näher zu verfolgen. Schon nach einigen Tagen stellten sich Pilobolus-Arten ein, dann folgten Mucor- und Rhizopus-Arten. Etwas später folgten mehrere Arten von Aspergillaceen, wie Aspergillus, Penicillium usw. Nach einigen weiteren Tagen erschienen die ersten Coprinus-Arten, und zwar die sehr zarten, schnell reifenden von weißer oder grauer Farbe, welche radial gespaltet werden der Richtung der Lamellen entlang, so Coprinus ephemerus, Coprinus ephemeroides usw. Diese Arten scheinen also den ganz frischen Mist zu bevorzugen, welcher naturgemäß noch viele unverdaute Teilchen von Proteinen, Nukleoproteinen, Stärkemehl und Pentosanen enthalten, außer der sogenannten Einstreu, welche aus Blättern, frischem Stroh oder auch Torf besteht, in welchen ebenfalls mancherlei gärfähige Substanzen noch vorhanden sind. Es wird somit das Erscheinen jener Coprinus-Arten mit dem unzersetzten Zustand der vorhandenen Stoffe und einer gewissen Konzentration der löslichen Stoffe zusammenhängen. Man könnte auch für möglich halten, daß die Sporen der Coprinus-Arten eine gewisse Zeit brauchen, bis sie reif zur Keimung sind, aber

meine Beobachtungen haben gezeigt, daß die Sporen fast unmittelbar nach ihrer Bildung wieder keimfähig sind. Wenn also nach jenem ersten Auftreten von Coprini nun eine zweite Form folgt, kann das nicht etwa damit zusammenhängen, daß eine gewisse Ruheperiode für die Sporen erforderlich wäre. Nachdem jene zarten Coprinus-Arten verschwunden sind, kommen größere und kräftigere Arten ebenfalls von weißer oder grauer Farbe zur Entwicklung, wie Coprinus fimetarius und Coprinus fimetarius var. macrorrhiza[1]). Nachdem diese Arten verschwunden sind, tritt Coprinus niveus auf, welcher nach meiner wiederholten Beobachtung immer nach den obigen Arten auftritt, was wohl durch einen veränderten chemischen Zustand in dem Miste zu erklären ist.

In dem Miste zeigen sich ja, wie bekannt, bei längerem Lagern mancherlei Gärungserscheinungen. Die Eiweißstoffe unterliegen der Fäulnis, wobei u. a. Amidosäuren, Indol, Scatol, Putrescin, Cadaverin und andere Basen, ferner kohlensaures Ammoniak und Schwefelwasserstoff produziert werden. Ferner werden die verschiedenen Kohlehydrate angegriffen, wobei u. a. Buttersäure, Ameisensäure, Essigsäure und manche Alkohole erzeugt werden. Unter diesen Gärungsprodukten werden sich wohl manche finden, welche gewissen Coprinus-Arten nicht zusagen. Durch diese Vorgänge wird natürlich auch die Konzentration der Extraktbestandteile eine höhere, sowie die Temperatur des Misthaufens gesteigert.

Wenn nun die obengenannten Arten ihre Vegetation vollendet haben, ist man überrascht von dem plötzlichen Auftreten von wieder anderen Arten, wie Coprinus narcoticus, lagopus, cyclodes, radiatus; zuletzt von allen Arten erscheint, wie mehrfach beobachtet, Coprinus papilleatus. Alle diese Arten haben eine weit dunklere Färbung von Oberhaut und Stengel als die früheren und was die letztgenannte Art betrifft, so zeigt sie eine Neigung, in Büscheln zu wachsen. Diese Arten finden offenbar die günstigsten Bedingungen im Misthaufen dann, wenn die Oxydation der Gärungsprodukte durch

---

1) Es war hier bei diesem Pilze ein Ausnahmefall zu bemerken. Einige Zeit nachdem die Hauptvegetation vorüber war, erschien hier und da ein vereinzeltes Exemplar dieser Art. Meine Untersuchung ergab hier nun einen merkwürdigen Ausnahmefall der Regeneration. Diese Exemplare hatten sich nämlich nicht aus Sporen entwickelt, sondern aus älterem Gewebe, das von der ersten Periode des Pilzerscheinens her nicht abgestorben war und den merkwürdigen wurzelartigen Ansatz an den Stiel zusammensetzt. Über diese merkwürdige wurzelartige Bildung und seine biologische Bedeutung werde ich später eine ausführliche Mitteilung machen.

die aerobischen Bakterien und Schimmelpilze ziemlich weit fortgeschritten ist, unter Vermehrung des Ammoniaks und Zerstörung der Amidosäuren, Fettsäuren und Schwefelwasserstoff, welch letzterer zu Schwefelsäure oxydiert wird. Auch Indol und Scatol und die intermediär gebildeten Phenole verschwinden allmählich durch Oxydation. Dieser sogenannte reife Mist ist bekanntlich viel günstiger auch für die Feldfrüchte als der frische. Die letzten Formen der Coprinus-Arten, welche auf dem ausgegorenen Mist erscheinen, haben manches gemein mit den erdbewohnenden Coprinus-Arten, so die dunkle Farbe und Zähigkeit der Gewebe, sowie die unvollständige Verflüssigung. Es zeigte sich auch, daß, wenn typische erdbewohnende Formen auf frischen Mist ausgesäet wurden, sie sich nur entwickelten, wenn die Sporen auf vollständig verrotteten Mist kamen.

Es war nun von Interesse, die in der Natur beobachteten Erscheinungen auch experimentell im Laboratorium hervorzurufen, und deshalb brachte ich in ein großes zylindrisches Gefäß eine ziemlich dicke Schicht frischen Pferde- und Kuhmistes, welche ich trotz der Sporen, welche schon vorhanden sein mochten, noch mit den Sporen derjenigen Arten, welche zu verschiedenen Zeiten auf dem Mist sich zeigen, gut durchmischte. Das Gefäß wurde mit einer Glasplatte bedeckt und zu gleicher Zeit an der Innenseite des Glasgefäßes einige Kugeln von Naphthalin aufgehängt, um etwa vorhandene Keime kleiner Tiere nicht zur Entwicklung kommen zu lassen. Es ergab sich zu meiner Überraschung, daß hier ebenfalls zuerst Pilobolus, Mucor, Aspergillus erschienen, dann Coprinus ephemerus und C. ephemeroides, C. niveus, dann C. fimetarius und endlich C. papilleatus, fast die gleiche Reihenfolge wie in der Natur. Die obigen Beobachtungen schienen mir der Erwähnung wert zu sein, obgleich ich nur ganz allgemeine Angaben bringen kann, ohne genauere Einzelheiten über die ganze Erscheinung machen zu können. Möglich ist es auch, daß Temperaturänderungen im Miste eine gewisse Rolle hierbei spielen.

Über die Verflüssigung bei den Coprinus-Arten.

Die eigentümlichen Erscheinungen der Verflüssigung des Hutes bei den Coprinus-Arten waren schon oft der Gegenstand von Spekulationen über ihre physiologische Bedeutung und ihre Ursache. Buller fand, daß diese Verflüssigung mit dem Ausstreuen der Sporen in Beziehung steht, und erklärt die Ursache der Erscheinung als eine Art von Selbstverdauung. Da aber noch keine experimentellen Tatsachen den Meinungen Buller's zugrunde liegen, so habe ich mich ent-

schlossen, die Verhältnisse jener Erscheinung genau zu studieren und meine Beobachtungen und Experimente im Folgenden mitzuteilen, zugleich mit anderen Studien über die Enzyme in jenen Pilzen überhaupt. Die Art von Coprinus, welche mir als hauptsächliche Grundlage beim Studium über die Enzyme zugrunde lag, war Coprinus fimetarius. Bei allen Versuchen, bei welchen eine andere Spezies nicht speziell erwähnt ist, hat dieser Pilz zum Versuch gedient. Bei denjenigen Versuchen, welche sich auf die Verdauungsenzyme bezogen, wurden Parallelversuche mit Coprinus micaceus angestellt, welche jedoch dieselben Resultate ergaben, wie bei der oben genannten Art. Gelegentlich wurden auch solche Coprinus-Arten benützt, welche auf dem Boden und auf Holz wachsen, und werden an der betreffenden Stelle erwähnt werden. Solche Versuche waren nötig zum Vergleich, denn es ist ja bekannt, daß die Natur des Substrats, auf welchem ein Pilz wächst, viel zu tun hat mit der Entwicklung gewisser Enzyme, welche das Substrat behufs Ernährung angreifen müssen.

Was zunächst die oxydierenden Enzyme betrifft, so ergab die Prüfung auf Laccase mit Guajactinktur und mit Guajacol positive Resultate, als Schnitte durch den Stiel und Hut mit diesen Reagenzien betupft wurden. Jenes Reagens lieferte eine blaue Färbung, die einprozentige Guajacollösung eine rote Farbe. Die Färbung tritt bei beiden Lösungen oft nur in bestimmten Geweben auf, nämlich im Zentrum des Stieles, oder an der Basis, oder an der Grenze von Hut und Stiel. Es wurde auch versucht, ob beim Befeuchten der Schnitte mit Hydrochinonlösung die Oxydation zu Chinon durch den Geruch wahrgenommen werden könnte. Allein selbst nach einer Stunde zeigte sich nur eine schwache Spur von diesem Geruch.

Tyrosinase. Da ein Extrakt aus älteren Hüten von Coprinus allmählich unter dem Einfluß der Luft dunkler wird, schien die Gegenwart von Tyrosinase wahrscheinlich, jedoch gab der erste Versuch mit jungem Gewebe dieser Pilze beim Befeuchten mit Tyrosinlösung keine dunkle Farbe, ebensowenig der 20 %ige Alkoholextrakt oder der konzentrierte ausgepreßte Saft. Wurden jedoch ältere Hüte, bei denen der Zerfließungsprozeß begonnen hatte, verwendet, so ergab sich auf Zusatz von Tyrosin eine Beschleunigung der Dunkelfärbung. Dieselbe trat ein auf Zusatz von Adrenalin oder Kresol. Daraus kann man wohl auf die Bildung von Tyrosinase, welche ja auch in anderen Pilzen gefunden wurde, schließen, jedoch nur in dem älteren Stadium.

Dasselbe Experiment wurde mit Coprinus micaceus mit positivem Resultat wiederholt.

Peroxydase. Dünne Schnitte durch den Stengel und Hut des Pilzes wurden in einer 50 ccm-Flasche mit 1 ccm wässeriger Lösung von Paraphenylendiamin und einigen Tropfen Wasserstoffsuperoxyd befeuchtet. Es stellte sich sofort eine violette Färbung ein, die nach 18 Minuten so dunkel wurde, daß sie fast schwarz erschien. Die Lamellen wurden zuerst gefärbt, viel weniger schnell der Stiel. Der zentrale Teil des Stieles ergab die Färbung viel eher und stärker als die peripheren Schichten, welche sich oft überhaupt nicht färbten.

Katalase. Von einem Pilz, der im Stadium der Selbstverflüssigung war, wurde sowohl der Stiel im Gewicht von 0,320 g, als auch der Hut im Gewicht von 0,195 g zerrieben und der ausgedrückte Saft mit einer verdünnten Lösung von Wasserstoffsuperoxyd in einem kleinen Kolben mit aufgesetztem Glasrohr zum Messen des entwickelten Gases übergossen. Es ergab sich bei dem Hute, daß nach 5 Minuten unter rapider Gasentwicklung 22 ccm Gas entwickelt wurde, und beim darauffolgenden Schütteln des Glases nach 10 Minuten noch weitere 12,5 ccm. Nach weiteren 10 Minuten blieb die Entwicklung stehen, die Totalmenge des Gases betrug 50,5 ccm. In ähnlicher Weise entwickelte der Stielsaft in 15 Minuten 30 ccm. Der Pilz ist deshalb als ziemlich reich an Katalase anzusprechen.

Emulsin. Als Schnitte durch den Hut und Stiel mit einer Lösung von Amygdalin in verdünntem Alkohol befeuchtet wurden, ergab sich schon nach 15 Minuten ein sehr entschiedener Geruch nach Benzaldehyd. Nach 18 Stunden war außer intensivem Geruch dieses Aldehyds auch Blausäuregeruch wahrzunehmen. Hiermit ist zum ersten Male Emulsin in einem mistbewohnenden Pilz nachgewiesen, wo eigentlich die physiologische Wirkung des Emulsins gar nicht benötigt würde; in holzbewohnenden Pilzen ist ja von Guignard Emulsin nachgewiesen worden, z. B. in Polyporus-Arten. Bei einem Vergleich von mistbewohnenden Coprinus-Arten mit einer holzbewohnenden Art fand ich, daß bei letzterer die obige Reaktion auf Emulsin rascher und stärker auftrat, als bei den mistbewohnenden.

Amidase. Für diesen Versuch wurde eine 1 %ige Lösung von Asparagin benutzt, welches, wie bekannt, leicht eine Amidogruppe in Form von Ammoniak abspaltet. Als nun 2 g von frisch zerriebenem Pilz bei 40° mit jener Lösung einige Zeit digeriert wurde, ergab Nessler's Reagens nur eine schwache Spur einer Gelbfärbung, welcher jedoch bald eine Reduktion von Quecksilber aus Nessler's Reagens folgte, eine Erscheinung, welche ja leicht immer eintritt, wenn redu-

zierende Stoffe in der Lösung sind. Offenbar kann, wenn überhaupt, nur von Spuren von Amidase in Coprinus die Rede sein.

Diastase. Hier wurde ein Mistbewohner mit einem Erdbewohner und einem Holzbewohner verglichen, wobei sich ergab, daß der mistbewohnende Coprinus keine Diastase zeigte, wohl aber der erdbewohnende C. micaceus und C. fimetarius, und der holzbewohnende C. fuscescens. Die Reaktion wurde in der Weise ausgeführt, daß die reifen sich verflüssigenden Hüte fein zerrieben und mit etwas Wasser, unter Zugabe von löslicher Stärke und einigen Tropfen Chloroform, bei 40° digeriert wurden. Von Zeit zu Zeit wurden einige herausgenommene Tropfen mit Jodtinktur geprüft und mit der ursprünglichen Jodreaktion verglichen. Bei den letztgenannten Arten verschwand allmählich diese Jodreaktion, aber bei den mistbewohnenden Arten nicht.

Coagulase. Verwandt mit Diastase ist die sogenannte Coagulase, wie von Wolf und Fernbach bei Malz und von Buller in Polyporus squamosus beobachtet wurde. Letzterer Autor erhielt einen Extrakt von Fruchtkörpern des Polyporus squamosus, welcher aus gelöster Stärke den Stärkekleister wieder abschied. Ebenso, fand ich, verhielt sich der Extrakt von Coprinus fimetarius und C. micaceus. Der Extrakt von je 20 g Hut mit 50 ccm Wasser wurde in zwei Zylindern verteilt und zu dem einen Zylinder direkt 60 ccm einer 5 %igen Lösung von Lintner's löslicher Stärke gesetzt, während der Extrakt des zweiten Zylinders zuerst gekocht wurde, ehe die Stärkelösung zugesetzt wurde. Es zeigte sich nun, daß nach 24 Stunden in jenem Zylinder ein dicker Niederschlag von Stärkekleister gebildet war, und die überstehende Lösung mit Jod sich violett bis rot färbte, während in dem zweiten Zylinder gar keine Veränderung eingetreten war. Da in dem ersteren Fall sich nach längerer Zeit gar keine Reaktion mit Jod mehr erhalten ließ, nachdem sie zuvor purpurrot ausgefallen war, so liegt hier außer der Wirkung der Coagulase auch die der Diastase vor.

Invertase. Es wurden 20 ccm eines Hutextraktes zu 40 ccm einer 20 %igen Lösung von Rohrzucker zugesetzt, während in einem zweiten Versuch der Hutextrakt zuerst gekocht wurde. Als nun nach 24 Stunden Aufenthalt bei 40° in der üblichen Weise mit Fehling's Lösung geprüft wurde, ergab sich die Abwesenheit von reduziertem Zucker in beiden Fällen. Es muß daher geschlossen werden, daß Invertase in einem mistbewohnenden Coprinus nicht enthalten ist.

Cytase. Hier wurde nur ein holzbewohnender Coprinus geprüft, nämlich C. fuscescens (Fig. 2). Ich habe bei diesem Pilze genaue

Beobachtungen gemacht, wie sich das Mycel in dem Holze von Ulmus verbreitet, und beobachtet, daß es Löcher durch die Zellwände bohrt. Merkwürdig ist jedoch, daß es nicht gelingt, lebendes Holz mit dem Pilze so zu infizieren, daß er durch das Holz sich verbreiten könnte. Während jene Beobachtung schon den Schluß zuläßt, daß dieses Mycel Enzyme ausscheide, welche sowohl Zellulose als auch Lignin lösen können, wurde doch ein spezieller Versuch gemacht mit den zerriebenen Fruchtkörpern jenes Pilzes, um so mehr, als sich ergeben hatte, daß das von dem Mycel angegriffene Ulmusholz die bekannte rote Farbe mit Phloroglucin und Salzsäure lieferte. Jene Pilzmasse wurde eine Woche lang mit Glyzerin unter Zusatz von Chloroformwasser extrahiert, und die filtrierte Lösung dann mit dünnen Schnitten Ulmusholz 3 Monate lang stehen gelassen. Es zeigte sich eine sehr deutliche Reaktion mit Chlorzinkjod auf Zellulose an den Holzschnitten. Ein Querschnitt zeigte ferner ein sehr weit gediehenes Zerfallstadium des Holzes. Nach einigen weiteren Wochen zeigte sich sehr deutlich, daß die Mittellamelle gelöst war, so daß die einzelnen Zellen voneinander getrennt erschienen, weshalb auch das Vorkommen der sogenannten Pectinase wahrscheinlich wurde.

Pectase. Ein frisch hergestellter Extrakt von reifen Himbeeren wurde mit Alkohol niedergeschlagen und der Niederschlag in etwas warmem Wasser gelöst. Ein Teil dieser Lösung wurde mit frisch hergestelltem Auszug von Kleeblättern versetzt, in welchen bekanntlich Pectase vorkommt, und in der Tat wurde nach Zusatz von einer kleinen Menge Chlorkalzium nach einigen Stunden ein flockiger Niederschlag erhalten. Nun wurde der andere Teil des Himbeerextraktes mit einem Extrakt eines sich eben verflüssigenden Hutes von Coprinus micaceus und etwas Chlorkalzium versetzt. Aber selbst nach 2 Tagen wurde keine Koagulation in der Flasche beobachtet. Dasselbe negative Resultat wurde auch erhalten, als Extrakte von holzbewohnenden und mistbewohnenden Coprinus-Arten versucht wurden. Es kann daher als sicher gelten, daß in Coprinus-Arten Pectase nicht vorhanden ist.

Lipase. Ein Extrakt von Hüten verschiedener Coprinus-Arten wurde in vollständig neutraler Lösung mit Äthylacetat unter Zusatz von etwas Lackmus längere Zeit bei 30—40° einige Zeit digeriert, aber die Mischung blieb vollständig neutral, so daß also keine Hydrolyse des Äthylacetats anzunehmen war. Als jedoch die Methode von Green angewandt wurde, lieferten Coprinus fuscescens und C. Alopecia ein positives Resultat. Beide Arten sind Holzbewohner, mit dem Mistbewohner Coprinus niveus jedoch wurde auch hier ein negatives

Resultat erhalten. Die Methode von Green besteht bekanntlich darin, daß eine Emulsion von etwas Öl mit Gummi arabicum, etwas Wasser und Lackmus bei 40° mit dem zu prüfenden Extrakt einige Zeit digeriert wird, wobei die Rötung der Mischung auf Lipase deutet. Diese Reaktion wurde besonders stark mit Coprinus atramentarius beobachtet. Es scheint somit, daß Mistbewohner bei den Coprinus-Arten keine Lipase enthalten, wohl aber die Holzbewohner und auch die Erdbewohner.

Rennetase. Es wurden zu 20 ccm ganz frischer Milch 6 ccm frischen Extraktes von in Verflüssigung begriffenen Coprinus-Fruchtkörpern gefügt, und die Mischung bei 38° gehalten. Bei einem Kontrollversuch wurde der Extrakt zuerst gekocht. Nach 2 Stunden fand sich die Milch zu einer dicken Masse koaguliert im ersteren Fall, aber nicht im letzteren. Der Versuch wurde wiederholt, wobei jedoch der zerriebene Fruchtkörper nicht von dem Saft getrennt wurde. Hier zeigte es sich, daß schon 10—20 Minuten hinreichten, die Milch vollständig zu koagulieren. Es besteht daher kein Zweifel, daß Rennetase in dem Coprinus fimetarius enthalten ist.

Prüfung auf Verdauungsenzyme.

Die merkwürdige Erscheinung der Verflüssigung von reifen Fruchtkörpern der Coprinus-Arten deutet auf eine Selbstverdauung hin. Es war jedoch nötig, die Bedingungen für diese Autolyse näher zu erforschen. Besonders eignete sich zu diesen Versuchen Coprinus fimetarius, der auf Misthaufen oft reichlich anzutreffen ist. Seine Fruchtkörper sind sehr dick und unterliegen einem hohen Grad von Verflüssigung. Für die folgenden Experimente wurden stets in starker Verflüssigung begriffene Fruchtkörper verwendet, welche zerkleinert und ausgepreßt wurden. 50 g Fruchtkörper mit Zusatz von etwas Wasser geben genügende Menge Extrakt für ein Experiment. Der von den Sporen durch Filtration befreite Extrakt war von mäßig saurer Reaktion.

Um die Wirkung dieses Extraktes auf verschiedene Teile des Stieles zu beobachten, wurde zunächst der Stiel eines sehr jungen Fruchtkörpers verwendet, und zwar wurden kleine Teile von der Basis und der Spitze desselben aus dem inneren Gewebe des Stieles mit 20 ccm des eben erwähnten Fruchtkörperextraktes in mehreren Proberöhren bei 38° digeriert. Ein Teil der Proberöhren blieb bei Zimmertemperatur stehen. Nach 24 Stunden ergab sich in keinem Falle irgend

welche Wirkung auf diese Stielteilchen. Es läßt sich wohl daraus der Schluß ziehen, daß Stiele in diesem jungen Stadium sich wesentlich unterscheiden in chemischer oder physikalischer Hinsicht von dem Gewebe der sich verflüssigenden Hüte.

Zweiter Versuch. Der oben erwähnte Hutextrakt wurde in vier Proberöhren verteilt. In Nr. 1 wurde er mit kohlensaurem Natron genau neutralisiert, zu Nr. 2 wurde soviel kohlensaures Natron zugesetzt, daß eine schwach alkalische Reaktion erhalten wurde. Zu Nr. 3 wurde eine sehr kleine Menge von Salzsäure gesetzt, während Nr. 4 keinen weiteren Zusatz erhielt. Alle Proben erhielten etwas Toluol zu den Lösungen zugesetzt. Nun wurde ein viel älterer Stiel als beim vorigen Versuch ausgewählt und zwar in einem Stadium, in welchem der zentrale Teil sich von den Randpartien unterscheidet durch seine Zusammensetzung aus feinen, dünnen Hyphen. Sowohl Längs- als Querschnitte dieses Stieles wurden in jene Lösungen gebracht und bei 38° 24 Stunden digeriert. Die mikroskopische Untersuchung ergab nun das interessante Resultat, daß in Nr. 4 die feinen Hyphen der Zentralzone (Fig. 1) sehr stark angegriffen waren. Bei den Längsschnitten durch den dicksten Teil des Stieles ergab sich, daß die zwei seitlichen Regionen von stärkerem Gewebe vollständig voneinander getrennt wurden durch die Auflösung des zentralen Teiles. Es zeigt sich also, daß die zarte und protoplasmareiche Zentralzone, welche als Leitbahn für die Nährstoffe dient und jetzt ziemlich alt und erschöpft war, durch den Extrakt des zerfließenden Hutes angegriffen wurde. Ferner ergibt sich, daß der Saft in seinem natürlichen Zustand ohne weiteren Zusatz von Soda oder Salzsäure am besten gewirkt hat. Es blieb nun weiter zu untersuchen, wie sich das periphere Gewebe des Stieles in einem anderen Entwicklungsstadium zu jenem Extrakt verhalten würde.

Dritter Versuch. Es wurden 50 g von Fruchtkörpern im Verflüssigungszustand zerdrückt, mit 150 ccm destillierten Wassers angerührt und 1 Stunde lang stehen gelassen. Diese Masse wurde nun nicht filtriert wie bei den vorigen Versuchen, sondern als Ganzes verwendet zu folgenden Versuchen, bei welchen Längs- und Querschnitte von einem Stiel eingelegt wurden, welcher infolge weiterer Entwicklung schon hohl geworden war und zwar lange nach der letzten Streckung. Diese Schnitte wurden in etwas Leinwand eingebunden, damit sie wieder aus der breiigen Masse leicht herausgefunden werden konnten. In kleine konische Flaschen kamen je 20 ccm jener Mischung und zwar wurden zu 10 solcher Flaschen verschiedene Zusätze gemacht:

Nr. 1 kein Zusatz,
Nr. 2 neutralisiert mit Soda,
Nr. 3 0,5 % Soda,
Nr. 4 1 % „
Nr. 5 2 % „
Nr. 6 5 % „
Nr. 7 0,5 % Salzsäure,
Nr. 8 1 % „
Nr. 9 2 % „
Nr. 10 5 % „

Sämtliche Mischungen blieben bei 40° 30 Stunden stehen, worauf die mikroskopische Untersuchung folgende Resultate ergab: In Nr. 1 und 2 war eine erhebliche Einwirkung auf das Material zu konstatieren, in den anderen Flaschen mit 0,5 bis 5 % Soda war keine Einwirkung zu beobachten. Ferner war bei den Salzsäure enthaltenden Flaschen bloß in Nr. 7 mit 0,5 % Säure eine Wirkung zu sehen und zwar in einer sehr unvollkommenen Art. Die beste Wirkung war bei Nr. 1 zu beobachten, also da, wo der Saft seine natürliche saure Beschaffenheit bewahrt hatte. Die Schnitte waren in eine breiförmige Masse verwandelt, in welcher die alten zelligen Elemente überhaupt nicht mehr zu unterscheiden waren. Es zeigt sich hier, daß diese Stielteile aus zwei verschiedenen Substanzen, einer verdaulichen und unverdaulichen, bestehen. In dem Stiel ist somit eine Substanz enthalten, welche im Hut sich nicht findet, da sie der Verflüssigung widersteht. Um hierüber weitere Beobachtungen zu machen, wurden sowohl ganz junge als auch sehr alte Stiele mit sich verflüssigenden Hüten bei Zimmertemperatur in direkte Berührung gebracht und beobachtet, daß der junge Stiel intakt blieb, während der alte unter den gleichen Umständen an der Berührungsstelle weit verändert wurde, so daß nur eine formlose schleimige Masse an dieser Stelle des Stieles zu sehen war. Die nicht vom Hut bedeckten Stellen des älteren Stieles waren dabei vollständig intakt geblieben. Der Grund, warum der Stiel der Verflüssigung nicht unterliegt, obgleich das Trama von derselben Beschaffenheit ist als die Zentralzone des Stieles, ist darin zu suchen, daß diese Zentralzone bei der Sporenbildung im Hut bereits alle ihre Nährstoffe abgegeben und ihr Protoplasma verloren hat. Deswegen können in dem Stiel auch gar keine Enzyme für die Verflüssigung gebildet werden zur Zeit, wenn diese verdauenden Enzyme reichlich in dem Hut entstehen. Es mag noch darauf hingewiesen werden, daß schon vor der Sporenbildung eine protoplasmareiche Zellschicht aus-

gebildet wird an der Grenze von Stiel und Hut und daß diese Ausbildung schon einen großen Teil des protoplasmareichen Zentralstranges des Stieles verbraucht, so daß zuletzt — auch durch später zu besprechende Streckungen im Stiel — eine Höhlung im Zentrum entsteht. Von besonderem Interesse ist, daß jenes neue an der Spitze des Stieles sich ausbildende Nährgewebe schließlich auch rasch durch die eigenen Enzyme aufgelöst wird, sobald die Sporen reif sind. Ein weiterer Grund, warum der Stiel nicht verflüssigt wird, trotzdem er in Kontakt mit dem sich verflüssigenden Hute ist, ist darin zu suchen, daß nach der Verflüssigung sofort Vertrocknung der Masse eintritt. Bloß bei sehr feuchtem Wetter kommt es zum Abfallen der verflüssigten Masse in Tropfen. Es kommt in der Natur zu gar keinem direkten Kontakt der sich verflüssigenden Hutmasse mit den Geweben des Stieles in hinreichender Quantität, so daß ein Angriff auf die angreifbaren Stellen des Stieles stattfinden könnte. Nur hier und da findet man eine gewisse Lockerung der Gewebe, wenn ein Tropfen jener Flüssigkeit mit dem Gewebe des Stieles einige Zeit in Berührung war.

Es ist von großer biologischer Bedeutung für diese Pilze, daß der Stiel nicht verflüssigt wird, und es ergibt sich hier eine Verwirklichung eines sehr schönen Mechanismus von Sporenentleerung.

Es ist also von wesentlichem Interesse, daß, wie obige Versuche gezeigt haben, der natürliche Saft des Hutes ein Enzym enthält, welches durch Alkalisierung der Lösung oder stärkeren Zusatz von Säure leicht unwirksam gemacht wird, und daß es am besten in seinem natürlichen Zustand wirkt. Dieses Enzym wird nur in einem gewissen Stadium der Entwicklung gebildet[1]), in ganz jungen Fruchtkörpern ist es nicht enthalten, andererseits werden auch junge Stiele durch das Enzym von älteren Fruchtkörpern nicht angegriffen.

Während wir bis jetzt nur die Wirkungen des verflüssigenden Enzyms auf den Stiel in verschiedenen Stadien beschrieben haben, wollen wir jetzt auch die Wirkung jenes Enzyms auf den Hut in den verschiedenen Stadien der Entwicklung beschreiben. Es ergab sich da bei im wesentlichen, daß die Lamellen des Hutes im jungen Stadium nicht von den Enzymen der alten Hüte angegriffen werden. Es ist ein bestimmtes Alter und Protoplasmazustand nötig, damit die Verflüssigung eintreten kann, sowohl in dem natürlichen Zustand als bei unseren Versuchen mit dem Extrakt der sich verflüssigenden Hüte.

---

1) Weitere ähnliche Versuche mit jungen Hüten zeigten, daß dieselben keine Spur eines die Lamellen verflüssigenden Enzyms enthalten.

Bei meinen Versuchen mit dem Safte der sich verflüssigenden Fruchtkörper, welchen ich auf die Lamellen derselben Art in verschiedenen Stadien der Entwicklung wirken ließ, ergab sich stets, daß die Verflüssigung dieser Lamellen nur dann eintrat, wenn sie nahe dem Stadium waren, wo ihre Selbstverdauung ohnehin eingetreten wäre.

Um den unmittelbaren Zusammenhang der Enzymproduktion mit dem Akt der Verflüssigung zu erkennen, wurde folgender Versuch gemacht: Ein Fruchtkörper, welcher soeben angefangen hatte sich zu verflüssigen, wurde bei 25° in verdünntem Alkohol von 30% oder Aceton längere Zeit gehalten. Es ergab sich, daß mit der Tötung des Protoplasmas der Zellen auch die Verflüssigung unterblieb, daß also jede Zelle sich sofort verflüssigen wird, sobald sie anfängt, das Enzym zu produzieren. In einem Kontrollversuch, in dem ebensolche Fruchtkörper bei Abwesenheit von Alkohol beobachtet wurden, zeigte sich vollständige Verdauung und Verflüssigung in ungefähr 12 Stunden. Daß bei obigem Experiment nicht etwa ein bereits vorhandenes Enzym durch Alkohol oder Aceton bei 25° verändert worden war, ergab ein fernerer Kontrollversuch. Der Extrakt, der unter solchen Bedingungen erhalten wurde, wirkte mit Leichtigkeit auf Wittepepton unter Produktion von Tryptophan.

Weitere Beobachtungen zeigten, daß ein beträchtlicher Unterschied in der Resistenz der verschiedenen Gewebe gegen das verflüssigende Enzym im Fruchtkörper existiert, was durch das folgende Experiment außer Zweifel gestellt wurde. Größere Mengen von Coprinus-Hüten wurden unter aseptischen Bedingungen der Verflüssigung überlassen, bis die Masse einen beträchtlichen Flüssigkeitsgrad zeigte. Nach einem Tag wurde die Masse dann verdünnt und näher untersucht auf die nicht verflüssigenden Anteile. Die Sporen lagerten sich zuerst unten ab, während die Oberhaut des Hutes in einzelne Fetzen zerspalten war mit Ausnahme des zentralen Teiles, welcher eine dickere Schicht darstellt als die peripheren Anteile der Oberhaut. Die Substanz der Lamellen war vollständig verschwunden. Es ist in dieser Beziehung auch noch darauf aufmerksam zu machen, daß in der Natur bei dem allmählichen Kürzerwerden der Lamellen durch Verflüssigung sich die zugehörige Oberhaut aufrollt und in einzelnen Fetzen nach den Seiten hängt. Doch sieht man öfters auch eine allmähliche Verflüssigung der ganzen Oberhaut samt dem zentralen Gipfel; diese Erscheinung hängt nicht nur von gewissen Arten ab, sondern auch von großer Feuchtigkeit der Umgebung, welche es gestattet, daß ein Tropfen der verflüssigten Masse längere Zeit mit dem Gipfel in Kontakt ist. Über

den Unterschied im chemischen Verhalten von Lamellen und Oberhaut werden später noch einige Bemerkungen folgen.

Autolyse des Hutes.

Zunächst überzeugte ich mich, daß die Hüte sehr reich an Eiweißstoffen sind, indem der Saft von reifen, zerdrückten Hüten, welche mit Wasser einige Zeit digeriert waren, ein Filtrat lieferten, welches mit starkem Alkohol einen flockigen Niederschlag lieferte, der die allgemeinen charakteristischen Reaktionen auf Eiweißstoffe zeigte. Um die Selbstverdauung näher kennen zu lernen, wurden 30 g von Hüten, welche Reinkulturen von Coprinus niveus entnommen waren und eben angefangen hatten, eine dunkle Färbung anzunehmen, in eine Flasche gebracht zugleich mit einem kleinen offenen Toluolfläschchen und bei 35° gehalten. Nach 6 Stunden war die ganze Masse verflüssigt, und nach dem Auswaschen blieb bloß 1 g feuchtes Material zurück. In allen Versuchen, bei welchen verflüssigende Hüte unter aseptischen Bedingungen in kleinen Flaschen bei 35° gehalten wurden, verbreitete sich die Verflüssigung nur bis zu dem Punkt, an dem der Stiel befestigt war, oder bis dahin, wo noch lebende Zellen vorhanden waren. Segmente von reifen Hüten, welche auf antiseptischem Fließpapier in einem Dessikator mit den Lamellen nach oben belassen wurden, erlitten vollständige Autolyse, so daß schließlich nur eine dünne, häutige Schicht zurück blieb. Es hat sich bei sämtlichen Versuchen, welche unter vollständig sterilen Bedingungen ausgeführt wurden (d. h. bei Verwendung eines Materials, das aus Reinkulturen stammte), herausgestellt, daß Bakterien niemals an der Verflüssigung einen Anteil haben und daß diese Verflüssigung eine echte Autolyse ist, welche durch die eigenen Enzyme bewirkt wird. Ferner hat sich ergeben, daß solche Arten, welche in Natur sich nur schwierig selbst verflüssigen, doch bei Kultur unter günstigen Bedingungen sich leicht verflüssigen können, was ohne Zweifel auf einen gewissen nötigen Feuchtigkeitszustand zurückzuführen ist.

Bei dem folgenden Versuch wurde Coprinus radiatus, ein Erdbewohner, verwendet und zunächst der Extrakt auf eine Veränderung durch Selbstverdauung untersucht. Von 137 g wurde mit Zufügung von etwas Wasser 140 ccm Saft gewonnen. 70 ccm dieses Saftes wurden gekocht, um durch Koagulation die gelösten Eiweißkörper abzuscheiden. Der Niederschlag wurde abfiltriert und im lufttrockenen Zustand gewogen; er wog 0,15 g. Die andere Hälfte wurde unter aseptischen Bedingungen bei 38° 40 Stunden gelassen, dann

gekocht und der geringe Niederschlag ebenfalls gewogen; er betrug nur 0,02 g. Es waren also 86,6 % des vorhandenen Eiweißes verdaut worden.

Ferner ließ ich 70 ccm jenes Extraktes auf 0,2 g Fibrin 40 Stunden lang einwirken, die Flüssigkeit wurde dann verdampft und mit starkem Alkohol versetzt. Dieser Niederschlag war in Wasser löslich, und diese Lösung, mit Ammoniumsulfat gesättigt, gab einen Niederschlag von 0,1 g Albumose. Das Filtrat von diesem Niederschlag wurde mit Phosphorwolframsäure versetzt und erwärmt, wobei ein geringer Niederschlag von Pepton erhalten wurde, der 0,02 g wog. Interessant ist es, daß bei Verlängerung der Verdauungszeit auf 2 Tage nicht nur die Albumose und das Pepton vollständig verschwanden, sondern auch der ursprüngliche Eiweißkörper in dem Saft und daß lediglich Amidosäuren und Hexonbasen als weitere Verdauungsprodukte nachzuweisen waren [1]). Die Biuretreaktion wurde nicht mehr erhalten, dagegen eine intensive Reaktion auf Tyrosin mit Millons reagenz und auf Tryptophan mit Chlorwasser.

Es verdient erwähnt zu werden, daß trotz der Verflüssigung des Hutes der ausgepreßte Saft unmittelbar nachher auf Tryptophan geprüft, keine Reaktion darauf ergab. Vergleichende Experimente haben mir gezeigt, daß Zusätze von 0,1—0,15 % Salzsäure die Wirkung des proteolytischen Enzyms vollständig aufhoben, daß ferner Zusätze von 1 % Soda und weniger den Prozeß verlangsamten, aber 2 % Soda denselben vollständig aufhoben. Es ergab sich hier, was sich schon bei den früheren obigen Experimenten herausstellte, daß das verflüssigende Enzym am besten mit der natürlichen Azidität des Saftes wirksam ist.

Daß das Enzym auch Gelatine verflüssigen kann, ergab sich schon bei Versuchen, diese Pilze auf Gelatineplatten zu kultivieren. Es wurden ferner verschiedene Teile von Hut und Stiel auf Gelatineplatten gelegt und unter aseptischen Bedingungen beobachtet. Es ergab sich hierbei, daß die Fruchtkörper um so energischer verflüssigend auf die Gelatine wirkten, je älter dieselben waren, daß ferner ganz junge Gewebe des Stieles unwirksam blieben. Diese Unterschiede gingen vollständig parallel mit den Reaktionen auf oxydierende Enzyme.

Versuch mit Kasein. Es wurden 5 g reifen Fruchtkörpers zerdrückt und mit etwas Wasser einige Stunden digeriert, sodann die

---

1) Es geht hieraus hervor, daß jener Saft weit mehr Protein verdauen kann, als in ihm schon vorhanden war.

Flüssigkeit filtriert. Diese Flüssigkeit, welche noch keine Reaktion auf Tryptophan gab, lieferte diese Reaktion nach 18 Stunden Digestion mit Kaseinlösung, welche hergestellt wurde, indem etwas Kasein und Soda zu einer 1 %igen Lösung gelöst wurde. Ein Kontrollversuch mit gekochtem Saft gab diese Reaktion nicht. Während ferner in ersterem Fall bei der Kaseinverdauung durch Neutralisation mit sehr verdünnter Essigsäure bloß ein sehr schwacher Niederschlag erzielt wurde, erschien in letzterem Fall hierbei ein ziemlich starker Niederschlag von unverdautem Kasein. Da bei einem zweiten Versuch das gleiche Resultat erhalten wurde, so folgt, daß das proteolytische Enzym des Fruchtkörpers auch Kasein peptonisieren kann.

Ein Versuch mit Wittepepton in 1 %iger Lösung, welches, wie gewöhnlich, reich an Albumosen war und mit Ferrocyankalium und Essigsäure einen starken Niederschlag lieferte, zeigte diese Reaktion nicht mehr, wenn mit etwas zerriebenem Fruchtkörper bei 40° 18 Stunden digeriert wurde.

Es war nun von Interesse, zu sehen, ob auch die Peptonisierung der Albumosen in Wittepepton durch Zusatz von geringen Mengen Salzsäure oder Soda beeinflußt würde. Es wurde deshalb zu 30 ccm konzentrierten Hutextraktes 1 g Wittepepton zugesetzt und zu einer Probe 1 % Soda, zu einer zweiten 1 % Salzsäure, eine dritte diente zur Kontrolle ohne Zusatz, während eine vierte den vorher gekochten Saft enthielt. Nach ungefähr 40 Stunden bei 38° zeigte das schwachgelbliche Filtrat eine starke Tryptophanreaktion bei derjenigen Probe, die keinen Zusatz erhalten hatte, eine schwache Reaktion, wo 1 % Soda zugesetzt war, ferner keine Reaktion bei der Salzsäure enthaltenden Probe und der Probe mit gekochtem Saft. Bei einem zweiten Versuch wurde die Salzsäuremenge vermindert auf 0,5 und 0,8 %, während die Sodamenge auf 2 und 2,5 % erhöht wurde. Es ergab sich, daß 0,5 % Salzsäure noch eine schwache Eiweißspaltung ermöglichte; denn es wurde noch eine schwache Tryptophanreaktion erhalten, während 0,8 % Salzsäure schon die verdauende Wirkung vollständig aufhob. Die Probe mit 2 % Soda gab nur eine sehr schwache Tryptophanreaktion, während die mit 2,5 % gar keine mehr gab. Selbstverständlich wurden auch hier wieder Kontrollversuche gemacht mit den unteren Teilen der Fruchtkörper, welche der Autolyse überlassen wurden unter aseptischen Bedingungen. Hier war die Tryptophanreaktion weit schwächer als in denjenigen Proben, denen Wittepepton zugesetzt war. Selbstverständlich ist die Tryptophanreaktion nur ein Zeichen der weiteren Verdauung

der zunächst gebildeten Peptone, aber kein Maß für die bereits stattgefundene Peptonbildung aus Albumosen.

Solche vergleichende Versuche wurden auch mit Fibrin ausgeführt. Zu 40 ccm des Extraktes wurde in Nr. 1 nichts weiter zugesetzt, in Nr. 2 0,2 g Fibrin, Nr. 3 erhielt weiteren Zusatz von 0,1% Salzsäure, Nr. 4 0,5% Salzsäure, Nr. 5 0,5% Soda, Nr. 6 1% Soda, Nr. 7 erhielt gekochten Extrakt mit ebensoviel Fibrin. Sämtliche Proben wurden 40 Stunden bei 38° gehalten, worauf die Fibrinmischung ohne weiteren Zusatz eine sehr intensive Tryptophanreaktion gab, aber nur eine sehr schwache, wo 0,1% Salzsäure zugesetzt war, und bei 0,5% Soda. Sehr schwach war sie in der Probe ohne Fibrinzusatz, gar nicht trat sie auf, wo 0,5% Salzsäure und wo 1% Soda zugesetzt war, ebensowenig wie bei der Probe mit dem gekochten Saft.

Parallel mit der Tryptophanreaktion ging die Biuretreaktion[1]), welche nur in Nr. 2 sehr stark erhalten wurde. Es mag noch erwähnt werden, daß in einer Menge von 50 ccm filtrierten Saftes 0,2 g Fibrin in 24 Stunden vollständig verschwunden waren.

Nach Vines extrahiert eine 2%ige Lösung von Kochsalz mehr verdauendes Enzym als bloßes Wasser, was ich vollständig bestätigt fand, als ich solche Extrakte auf Wittepepton und Fibrin wirken ließ. Nach 30 Stunden Digestion bei 38° ergab sich aus den angestellten Tryptophanreaktionen, daß dieselben weit intensiver erhalten wurden in den Proben mit dem Kochsalzextrakt als in den Proben mit dem Wasserextrakt. Es nahm ferner fast zweimal soviel Chlorwasser, um die Tryptophanreaktion in ersterem Falle wieder zu zerstören als im letzteren Falle, ferner ergab sich bei diesem Vergleich noch, daß Wittepepton in der angegebenen Zeit eine weit stärkere Tryptophanreaktion lieferte als Fibrin. Ein zweites Experiment bestätigte die Resultate des ersten. Es zeigte sich in diesem, daß schon nach 7 Stunden eine Tryptophanreaktion bei Anwendung von Fibrin erhalten wurde, und daß der Kochsalzextrakt mehr verdauendes Enzym durch diese Reaktion erkennen ließ als der Wasserextrakt. Vines hat ferner beobachtet, daß ein schnell hergestellter und sehr verdünnter Wasser-Pilzextrakt von Agaricus campestris nur auf Wittepepton verdauend wirkte und nicht auf Fibrin, während ein konzentrierterer und durch längere Digestion erhaltener Extrakt auch auf Fibrin wirkte. Dieser Versuch zeigt, daß das Pepton zerspaltende Enzym oder Erepsin

---

1) Mit dem ursprünglichen Saft wurde diese Reaktion nicht erhalten.

schneller extrahiert wird als die eigentliche Peptase, welche die echten Eiweißkörper in Albumosen und Pepton verwandelt.

Vines fand ferner, daß ein Kochsalzextrakt, schnell hergestellt, sowohl auf Fibrin als auf Wittepepton verdauend wirkte, daß also Kochsalz die Extraktion von Peptase befördert.

Da ich beobachtet hatte, daß ein mit 20 %igem Alkohol hergestellter Extrakt keine verdauende Wirkung auf Fibrin ausübte, so vermutete ich, daß vielleicht durch verdünnten Alkohol man wohl das Erepsin, aber nicht die Peptase extrahieren könne, und stellte deshalb viele Versuche an, um die Bedingungen zu finden, unter denen durch Alkohol von einer gewissen Verdünnung jene beiden Enzyme getrennt werden könnten. Es zeigte sich zunächst, daß ein Extrakt mit 60 %igem Alkohol hergestellt und bei niederer Temperatur verdunstet, völlig wirkungslos sowohl auf Wittepepton als auch auf Fibrin war. Wurde dagegen 30 %iger Alkohol angewendet — 50 g Fruchtkörper mit 150 ccm — so ergab sich, daß die ursprünglich keine Tryptophanreaktion gebende Lösung doch dieselbe sehr stark gab, als Wittepepton bei 38° längere Zeit damit digeriert wurde, während bei Digestion mit Fibrin dieses ungelöst blieb und hier auch die Tryptophanreaktion ausblieb. Es ergibt sich also, daß Erepsin leicht mit 30 %igem Alkohol extrahiert werden kann, Peptase aber nicht. Wird nun das mit 30 bis 35 %igem Alkohol zweimal extrahierte Material mit Wasser extrahiert, so zeigt sich eine stark verdauende Wirkung auf Fibrin, während Wittepepton nicht angegriffen wurde.

Bei einem weiteren Versuch wurden 60 g Fruchtkörper einen Tag lang mit 60 %igem Alkohol in Berührung gelassen, wobei kein proteolytisches Enzym extrahiert wurde. Nun wurde die Masse mit 35 %igem Alkohol extrahiert und der Extrakt bei niederer Temperatur verdunstet. Es ergab sich eine Wirkung auf Wittepepton, aber nicht auf Fibrin. Die Masse wurde nun mit Wasser rasch extrahiert, und mit dem Extrakt eine Wirkung auf Wittepepton, aber nicht auf Fibrin konstatiert. Nun wurde zum zweiten Male mit Wasser extrahiert; dieser Extrakt verdaute sehr energisch Fibrin, hatte aber kaum eine Wirkung mehr auf Wittepepton, soweit Tryptophanbildung in Betracht kommt. Es wurde noch ein Versuch gemacht, ob durch Sättigung mit Ammoniumsulfat aus dem Safte der Fruchtkörper[1]) die Enzyme gefällt werden

1) Es mag noch erwähnt werden, daß zerfließende Hüte einen Extrakt lieferten, welcher sowohl mit Phosphorwolframsäure nach Zusatz von etwas Schwefelsäure, als auch mit Mercurinitrat starke Niederschläge lieferte, was sowohl auf

könnten. In der Tat wurde ein starker, flockiger Niederschlag erhalten, dieser ergab, 3 Tage der Dialyse unterworfen, dann auf verdauende Wirkungen geprüft, daß wohl Wittepepton, aber nicht Fibrin angegriffen wurde.

Chitingehalt bei Coprinus.

Um die Sporen auf Chitin zu prüfen, wurde genau nach Wisseling's Methode verfahren und die Sporen von Coprinus fimetarius zunächst mit konzentrierter Kalilauge auf 160° erhitzt. Nach Waschen mit Alkohol und schließlich mit Wasser wurde mit Jodlösung und dann mit mäßig starker Schwefelsäure geprüft, wobei die Wand der Sporen sofort eine schöne violette Farbe annahm, welche in einigen Fällen so stark war, daß sie fast schwarz erschienen. Statt Erhitzen mit Ätzkali auf 160°, reicht auch ein längerer Kontakt mit Kali bei gewöhnlicher Temperatur aus; die so behandelten Sporen wurden leicht in starker Schwefelsäure gelöst, etwas langsamer in 3 %iger Essigsäure. Ich habe die Sporen von sieben verschiedenen Coprinus-Arten geprüft und keinen Anhaltspunkt für die Gegenwart eines anderen Körpers als Chitin in der Sporenmembran dabei wahrgenommen. Nur die schwarze Farbe der Sporenwandung kam hier noch in Betracht. Diese konnte weder mit Ammoniak noch mit verdünntem Kali extrahiert werden, wohl aber mit starken Alkalien und starken Mineralsäuren, wobei die Farbsubstanz offenbar etwas verändert wurde. Die Lösung in starkem Alkali gab einen braunen Niederschlag bei Neutralisation, die Lösung in starker Salzsäure nahm eine violette Farbe an. Die Lösung in konzentrierter Schwefelsäure lieferte auf Zusatz von Wasser einen Niederschlag. Es scheint, daß der dunkle Farbstoff der Coprinus-Sporen verschieden ist von demjenigen anderer Sporen, soweit bis jetzt Beobachtungen vorliegen. Die biologische Bedeutung der schwarzen Farbe ist wohl darin zu suchen, daß diese Sporen resistent sind gegen direktes Sonnenlicht, welchem farblose Sporen verschiedener Pilze sehr bald erliegen.

Bei der Untersuchung von Schnitten durch den Stiel auf Chitin ergab sich ein großer Unterschied zwischen dem inneren zentralen Gewebe und den peripherischen Schichten. Letztere gaben eine viel stärkere Chitinreaktion als erstere. Besondere Erwähnung verdient, daß die Milchgefäße, welche bei späterer Gelegenheit beschrieben werden,

---

Peptone, als auch auf Hexonbasen und Amidosäuren deutet. Nach längerem Stehen der eingedickten, nach Fleischextrakt riechenden Extrakte ließen sich feine Nadeln erkennen, welche Tyrosin zu sein schienen.

eine besonders starke Chitinreaktion lieferten. Es wurden ferner einzelne Hyphen vom zentralen und peripheren Teile in bezug auf die Chitinreaktion verglichen und auch hier beim peripheren Teile ein stärkere Reaktion erhalten. Dies kann jedoch nur teilweise auf der dickeren Zellmembran beruhen, wahrscheinlich werden verschiedene Begleitstoffe mit daran Schuld tragen. Immerhin ist der Chitingehalt der peripheren Zone im allgemeinen weit bedeutender als der Chitingehalt der zentralen Zone.

Was den Hut anbelangt, so zeigten hier Längs- und Querschnitte eine sehr entschiedene Differenzierung im Chitingehalt. Die dickwandigen Zellen der Oberhaut lieferten eine sehr starke Chitinreaktion, ungefähr ebenso stark als das mechanische Gewebe des Stieles. Querschnitte ergaben einen großen Kontrast in der Reaktion der äußeren Haut und dem Gewebe der Lamellen. Letztere färbten sich nur gelblichbraun, was möglicherweise darauf beruht, daß die Chitinreaktion durch einen anderen Körper verdeckt wird. Diese Vermutung wird sehr wahrscheinlich dadurch, daß bei langdauernder Einwirkung von starker Kalilauge die Lamellen eine deutlichere Reaktion auf Chitin geben als anfangs, immerhin aber nur schwach, so daß man unbedingt schließen muß, daß die Hauptmasse der Membranensubstanz aus etwas anderem als Chitin besteht. Ich vermute, daß hier besondere, Protein ähnliche Stoffe eine Rolle spielen, weil sich die Lamellen auch am leichtesten verflüssigen [1]). Erwähnenswert ist noch meine Wahrnehmung, daß die Lamellen sich sofort und leicht in starker Schwefelsäure auflösen, aber nicht das Gewebe des Stiels und der Oberhaut.

Die Prüfung auf Zellulose nach Wisseling's Methode lieferte mit keinem Teil des Pilzes positive Resultate. Es mögen vielleicht statt Zellulose die sogenannten Hemizellulosen eine Rolle in den Pilzmembranen spielen. Aber in kleinen mikroskopischen Schnitten können diese Substanzen nicht leicht nachgewiesen werden.

Was die mineralischen Bestandteile der Coprinus-Arten betrifft, so ist zunächst zu erwähnen, daß Coprinus fimetarius in trockenem Zustand 14,71 % Asche lieferte, und zwar Stiel und Hut zusammengenommen. Ferner ergab sich, daß alte Pilze etwas reicher an Mineralstoff waren als junge, ferner, daß das Substrat, auf dem die Pilze

---

1) Es mag hier noch angeführt werden, daß nach Extraktion der Proteinstoffe durch längere Digestion mit verdünntem Kali der ausgewaschene Rückstand beim Kochen mit konzentrierter Kalilauge eine starke Ammoniakentwicklung lieferte, ob diese dem Chitin oder besonderen, schwerer extrahierbaren Proteinstoffen zuzuschreiben ist, gedenke ich später weiter zu prüfen.

wuchsen, einen großen Einfluß auf den Prozentsatz an Mineralstoffen hat; die erdbewohnenden Formen zeigten einen höheren Aschengehalt als die mistbewohnenden Formen. Was den Wassergehalt betrifft, so wurde derselbe im Hut zu 93 % bestimmt; viel hängt auch hier natürlich von dem Entwicklungsstadium des Pilzes ab. Ich habe auch die Wassertropfen, welche aus dem Pilz in gewissem Entwicklungsstadium aus Stiel und Hut hervortreten, auf einen Gehalt an Enzymen untersucht, aber dieselben darin nicht gefunden. Der Prozentsatz an Kieselsäure ist am größten in den erdbewohnenden Formen; bei Coprinus atramentarius wurde der Prozentsatz daran zu 5,98 % bestimmt.

Es verdient noch bemerkt zu werden, daß der mit 20 %igem Alkohol hergestellte Fruchtkörperextrakt bei längerem Stehen schöne Kristalle absetzt, welche sich bei der Untersuchung als Magnesium-Ammonium-Phosphat erwiesen.

Bei mehreren Arten, welche auf verschiedenen Substraten gedeihen, gelang es mir, im ganzen 13 verschiedene Enzyme: Laccase, Tyrosinase, Peroxydase, Catalase, Emulsin, Diastase, Coagulase, Cytase, Pectinase, Lipase, Rennetase, Peptase und Ereptase nachzuweisen, in Zusammenhang mit der Beschaffenheit des Substrates; für Peptase und Invertase erhielt ich negative Ergebnisse, die Anwesenheit von Amidase scheint zweifelhaft zu sein.

Regeneration.

Die obigen Untersuchungen haben gezeigt, daß der Fruchtkörper von Coprini in seinen Geweben stärkere Differenzierungen aufweist, als man eigentlich erwarten würde, wenn man die kurze Dauer seiner Existenz und seine allgemeine Entwicklung betrachtet. Es schien interessant, zu untersuchen, welchen Einfluß diese Differenzierung der Gewebe und die entsprechenden Verschiedenheiten in chemischer Hinsicht auf die Vorgänge bei der Regeneration und auf die allgemeinen Lebenserscheinungen besitzen.

Die bekannten Arbeiten von Brefeld über Coprinus stercorarius und Coprinus ephemerus haben gezeigt, daß im allgemeinen jede einzelne Zelle von Hut und Stiel die Fähigkeit besitzt, einen ganzen Fruchtkörper neu zu bilden, doch wurde nie die Abhängigkeit der Regenerationserscheinung von der geweblichen Differenzierung eingehender beobachtet. Meine eigenen Untersuchungen haben nun ergeben, daß derartige Beziehungen offenbar in ziemlich ausgedehntem Maße bestehen; sie wurden zumeist an Coprinus niveus ausgeführt, der sich hierzu sehr geeignet erwies.

Die Gewebe, welche wir, wenn wir vom Hute absehen, bei Coprini antreffen, sind im jungen Stiel dreierlei: in der Mitte eine Zone locker verwobener Hyphen, dann ein Mantel normal verwobener Hyphen und endlich außen eine Randschicht aus mechanischen Geweben und Zellen mit stark verdichten Wänden bestehend (Fig. 1).

Die Zentralzone geht kurz vor der Reife des Hutes zugrunde, und zwar wird sie, wie schon Brefeld gezeigt hat, zerrissen infolge der stärkeren Streckung der äußeren Zonen, welchen die Zentralzone nicht mehr folgen kann; ihre Reste verbleiben nachher noch als dünne, dem Hohlraum anliegende Schicht, der auf diese Weise in der Mitte des Stieles entsteht; meist reicht dieser Hohlraum nicht ganz bis zur Basis des Stieles herab.

Verschiedene Fruchtkörper wurden nun halbiert und auf sterilisiertes Filtrierpapier in Petrischalen gelegt; schon am folgenden Tage erschienen Anzeichen von Myzelbildung auf der Schnittoberfläche und in 5 oder 6 Tagen zeigten sich Fruchtkörper mit ausgewachsenem Hut, zwei in einem Fall, sechs in einem andern. Die Fruchtkörper wurden in größerer Zahl vom Stiel gebildet als vom Hut, auch war die Schnittoberfläche mehr produktiv als die nicht verletzten Teile. Die neuen Fruchtkörper wurden fast stets zuerst vom zentralen Teil des Stieles oder Hutes gebildet. In einem Falle wurde eine Reihe kleiner Anlagen vom zentralen Gewebe des geteilten Stieles gebildet, später erschienen zwei und drei Fruchtkörper an den äußeren Partien. Im obigen Versuch waren die Fruchtkörper im dem Entwicklungsstadium, in dem eine zentrale Zone sehr deutlich die ganze Länge des Stieles durchläuft.



Fig. 1. Coprinus niveus. Längsschnitt durch einen Stiel mit Regeneration, die Gewebedifferenzierung zeigend.

An sehr jungen Fruchtkörpern, an denen eine Unterscheidung zwischen Hut und Stiel noch schwer ist, tritt diese Lokalisierung der Regeneration nicht so deutlich hervor, da die Gewebe noch nicht so stark differenziert sind und die ganze Fruchtanlage mehr oder weniger gleichen protoplasmatischen Inhalt führt. Das zeigte sich an gefärbten Schnitten, d. h. es war in den Anlagen von Stielen die Färbung eine gleichmäßige durch das homogene Gewebe, während später eine zentrale Zone gebildet wird. Jeder junge Fruchtkörper zeigt einen dichten protoplasmatischen Inhalt in den Teilen, welche die Lamellen bilden, nach

gefärbten Schnitten zu schließen; auch das folgende Experiment deutet darauf hin.

Verschiedene junge Fruchtkörperanlagen, an welchen mit bloßem Auge weder Stiel noch Hut unterschieden werden konnte, dagegen an gefärbten Schnitten eine Häufung des Plasmas in den die Lamellen bildenden Teilen sich zeigte, wurden sorgfältig halbiert und auf steriles feuchtes Fließpapier gelegt. Drei der sechs Hälften regenerierten, ohne daß jedoch eine Lokalisation der Regeneration zu sehen war in den Geweben, welche später den Stiel bilden. Eine Untersuchung mit der Lupe ergab, daß kleine Punkte an verschiedenen Stellen des basalen Teiles der halbierten Anlagen sich gebildet hatten — offenbar waren diese Punkte neue Fruchtkörperanlagen, aber die als Ausgangsmaterial dienenden Anlagen waren selbst noch zu jung, um eine Regeneration am Leben zu erhalten und es ist zu verwundern, daß sie überhaupt regenerierten.

Was den oberen Teil der Anlage betrifft, der dem Hute entspricht, so zeigte er gleichfalls Regeneration und in gewissem Grade auch Lokalisation derselben, die Neubildungen traten nämlich zuerst an den Stellen auf, welche später die Lamellen bilden. Anscheinend hängt die Regeneration vom protoplasmatischen Inhalt und der Ernährung der betreffenden Gewebe ab. In späteren Stadien sind die verschiedenen Funktionen angepaßten Gewebe stark differenziert und diese Differenzierung äußert sich auch darin, daß sie sich verschieden verhalten bezüglich der Regeneration. Diese Tatsachen gehen aus den folgenden zahlreichen Versuchen hervor.

In älteren Stadien, bei ausgesprochener Differenzierung in Hut und Stiel, besitzt der zentrale Teil des Stieles eine größere Regenerationsfähigkeit als die übrigen Teile des Stiels. Die Gewebepartien rings um die Zentralzone sind gleichfalls kräftig bez. der Regeneration, aber nicht in dem Maße wie die Zentralzone während ihrer Existenz, wie aus der Tatsache hervorgeht, daß eine Regeneration meist aus den Geweben der Zentralzone erscheint. Nach dem Verschwinden dieser Zone besitzt das sie umgebende Gewebe die beste Regenerationsfähigkeit. Es wurde auch beobachtet, daß an älteren Früchten, lange nachdem die Höhlung im Stiel gebildet war und der Teil, welcher den Hohlraum umgab, keinen reichen protoplasmatischen Inhalt mehr führte, die Regeneration dann zuerst einsetzte an der Außenkante der halbierten Fruchtkörper oder an der äußeren unverletzten Seite des Stieles. Es scheint somit wahrscheinlich, daß der Protoplasmainhalt der Zellen im Stiel sich ändert mit dem Wachstum, welches von innen nach außen fortschreitet während der Entwicklung des Hutes. Wie später gezeigt werden soll,

wird der alte Stiel in den letzten Stadien mehr oder weniger in seinen äußeren Teilen verjüngt durch neue Hyphen, welche zwischen den alten Zellen von unten aufwachsen. Dies mag die gute Regenerationsfähigkeit eines alten Stieles verursachen. Es liegt die Annahme nahe, daß die innere Zone regenerationsfähiger ist, da sie offenbar größere Mengen Nährmaterial enthält und ihre Gewebe in direktem Zusammenhang stehen mit der basalen oder zentralen Gewebemasse, welche den Fruchtkörper überhaupt bildet. Wenn später die Zentralzone durch Bildung des Hutes erschöpft ist, rückt die Regenerationsfähigkeit ganz nach außen hin, während diese Teile vorher im Vergleich zur Zentralzone nur schwach regenerieren. In allen Versuchen, wo Teile von Fruchtkörpern verwendet wurden, war die Regeneration, in der am Schlusse Stiel und Hut gebildet wurden, ganz normal; Sporenreife wurde in diesen vorläufigen Versuchen erlangt durch Kultur auf sterilem Filtrierpapier, das mit sterilisiertem Mistextrakt gesättigt wurde.

In einem Falle wurden auf einem halben Stiel und Hut vier Fruchtkörper gebildet, drei wurden entfernt und der Zurückbleibende erzeugte Sporen, ohne daß Myzelbildung auftrat und auf dem Nährboden wucherte. Die so gebildeten Sporen schienen an Zahl stets hinter denen normaler Hüte von gleicher Größe zurückzubleiben. Ohne Zweifel hat der Umstand, daß einzelne Hüte nicht zur Sporenreife gelangten, eine Ursache in dem Mangel an genügender Stoffmenge im alten Gewebe.

Versuch I. Als Nährboden diente sterilisierter Mist, er wurde in Petrischalen ausgelegt und von Zeit zu Zeit mit sterilem Mistextrakt angefeuchtet.

Teile von Fruchtkörpern aus sterilen Kulturen — Hut und Stiel waren gebildet — wurden halbiert, Teile von Hüten von der Verbindungsstelle von Stiel und Hut bis zur Spitze entzweigeschnitten, ferner Stücke mit Lamellen aus weiter unten befindlichen Teilen verschiedener Entwicklungsstadien, Teile desselben Fruchtkörpers mit Basis, Mitte und Spitze usw. Diese Gewebeteile wurden in den oben beschriebenen Petrischalen ausgelegt und bei Laboratoriumstemperatur gehalten. Es zeigte sich eine starke Neigung zur Regeneration gemäß dem Zustande der Gewebe, welche von den Fruchtkörpern genommen worden waren bei kräftigem Wachstum, und in Berührung mit einem Nährboden, der die Gewebe mehr oder weniger durchdrang, so daß, wenn die Gewebe zu regenerieren beginnen, sie in guten Wachstumsbedingungen gehalten wurden. Es wurde dafür gesorgt, daß das Substrat nicht zu feucht wurde, da in diesem Falle die Gewebe braun werden und absterben. Auch findet dann nur vegetatives Wachstum statt ohne Bildung von Fruchtkörpern,

letzteres bei fast allen Pilzen. Wie bei anderen einleitenden Versuchen waren auch hier mehr Fruchtkörper auf der Schnittfläche gebildet, als auf den unverletzten Teilen. An alten Stielen dagegen war dies nicht der Fall; solche, bei denen schon eine Höhlung gebildet war, regenerierten zuerst immer aus den die Höhlung umgebenden Partien, später erschienen Fruchtkörper auf dem Rande der Schnittoberfläche und dann traten sie auch auf den äußeren Partien auf. Ein Stiel mit intakter Zentralzone erzeugte eine Reihe junger Fruchtkörperanlagen von der Basis bis zur Spitze an der Berührungsstelle mit dem Hute. Sie erschienen zuerst an der Basis in kleinen Klumpen und erreichten beträchtliche Größe, bevor an anderen Stellen irgendwelche auftraten; bald darauf jedoch zeigten sich kleine weiße Punkte an allen Stellen der Zentralzone, so daß die größten an der Basis, die kleinsten an dem entgegengesetzten Ende standen; in diesem Entwicklungsstadium liegt also die größte Regenerationsfähigkeit in der Zentralzone des Stieles, und zwar an der Basis (dies wird noch in anderem Zusammenhang erwähnt werden). Die Regeneration von Hutteilen zeigte nicht so große Lokalisation wie Stielteile, doch schienen Fruchtkörper ganz allgemein über der ganzen Oberfläche der ausgelegten Lamellen zu erscheinen mit einer Bevorzugung der Stellen, wo die Lamellen an den Stiel angrenzen. Dies tritt desto deutlicher hervor, je älter der Stiel ist; auch am Rande der Lamellen treten sie oft auf.

Der Grund dafür, daß hier die Regeneration reichlicher stattfindet, liegt darin, daß nach Absorption der in der Zentralzone befindlichen Nährstoffe und Bildung der Höhlung an der Berührungsstelle von Hut und Stiel eine zweite Region starken Wachstums zu entstehen scheint, aus welcher das Trama bei der Bildung seiner Gewebe unterstützt wird; die diese Region bildenden Gewebe können deutlich verfolgt werden in die Lamellen hinein, welche das Trama bilden. Es liegt also in dem Zeitpunkt, in dem die Höhlung entsteht, der Teil, welcher am meisten regeneriert, im Hute an der Berührung von Hut und Stiel. Halbierte Hüte dieses Alters regenerierten immer zuerst hier, dann erscheinen weitere Fruchtkörperchen an anderen Teilen der Lamellen, besonders an den vorspringenden Ecken. Bevor die Basidien Sterigmen gebildet haben, also in einem noch weniger differenzierten Stadium, scheinen alle Teile der Lamellen gleiche Regenerationsfähigkeit zu besitzen, da Fruchtkörper überall erschienen auf der Oberfläche der Lamellenränder von ausgelegten Lamellen an der Länge nach halbierten Hüten. Um zu bestimmen, in welchem speziellen Teil der Lamellen die Regeneration ihren Ursprung nahm, wurden junge Hüte quer halbiert und auf Mist-

substrat ausgelegt. Da auch der Stiel durchschnitten wurde und er die Zentralzone noch besaß, nahmen die jungen Fruchtkörper ihren Ursprung immer aus der Zentralzone des durchschnittenen Stieles, so daß die Erscheinung auftrat, welche Brefeld beschreibt an einem Pilz mit zwei Hüten und einem Stiel dazwischen. Als die quer durchschnittenen Lamellen regeneriert hatten, wurde der Hut sorgfältig entfernt und mit dem Mikrotom geschnitten; es zeigte sich, daß die Regeneration aus Tramazellen entstand; später beteiligten sich auch die anderen Hymeniumzellen daran durch Bildung neuer Hyphen.

Daß Basidien und Paraphysen, bevor sie Sporen erzeugt haben, fähig sind, neue Hyphen zu bilden, geht aus der Tatsache hervor, daß ein kleiner Teil einer Lamelle, in einem Tropfen von Nährlösung aufgehängt, Hyphen erzeugte aus der Spitze der Basidien und Paraphysen. In keinem Versuche beobachtete ich einen Fall, in dem die Regeneration zuerst aus den Hymeniumzellen entstand (Basidien, Zystiden, Paraphysen); das starke Wachstum schien von den tiefer liegenden Schichten des Tramas auszugehen. Ferner ließ sich auch nicht ein Fall beobachten, in dem die Regeneration aus den Zellen der Oberhaut des Hutes begann; solche Zellen halfen später durch Bildung von Hyphen nach. An sehr jungen Hüten, welche noch wenig differenziert waren, oder an Fruchtkörpern, welche noch nicht deutlich in Hut und Stiel getrennt waren, traten die Regenerationen ganz gleichmäßig auf der Oberfläche des Fruchtkörpers auf (siehe oben).

Die Bildung einer Höhlung im Stiele findet bei mehreren Coprinusarten sehr frühe statt, und manche Beobachter haben offenbar die Tatsache ganz übersehen, daß in einer bestimmten Zeit eine Zentralzone existiert. So lange sie erhalten bleibt, ist sie der Ort, an dem zuerst Regenerate auftreten. Wenn sie zerstört, entfernt oder am Rande der Höhlung zur Seite gedrückt wird, indem Zellen der äußeren Partien sich verlängern, bleiben ihre Zellen doch noch im Umkreis der Höhlung bestehen. Man kann dies deutlich aus Querschnitten durch den Stiel in diesem Alter sehen (Fig. 1). Diese Zellen scheinen noch immer genügend Protoplasma zu besitzen, um auch nach der Bildung eines Hohlraumes eine Zeitlang bei geeigneten Bedingungen regenerieren zu können.

Derartige Stiele, welche schon einen Hohlraum besaßen, wurden längs geteilt, sie erzeugten Fruchtkörper immer zuerst aus diesem Teil. Die jungen Regenerationsprodukte erschienen stets an der Oberfläche der Höhlung, bevor an anderen Stellen irgendwelche auftraten; später erschienen Fruchtkörper am äußeren Rande der Schnittoberfläche, wo

sie aus den kleinen Zellen der Stieloberfläche entstanden. Auch hier war stets die Basis am meisten regenerationsfähig.

Versuch II. Junge kräftig wachsende Fruchtkörper wurden aus verschiedenen Kulturen ausgewählt, nachdem sie Stiel und Hut gebildet hatten. Letzterer wurde entfernt, nach 24 Stunden erschienen bereits kleine weiße Punkte, die ersten Regenerationsprodukte, genau in der Mitte des Stielstumpfes (Fig. 3), sie entwickelten sich weiter und bildeten allmählich Hüte von normalem Aussehen; zwei unter sechs gelangten bis zur Sporenreife.

Die Regeneration ging ganz auffallend schnell vor sich. Besonders eine Kultur, welche sehr reichlich Fruchtkörper bildete, bot gute Gelegenheit, die Regeneration weggeschnittener Hüte weiter zu verfolgen.

In allen Fällen, wo die Zentralzone intakt war, entstanden nach Entfernung des Hutes die ersten Regenerationsprodukte; sie erschienen an der Zentralzone als kleine weiße Punkte, welche allmählich größer und dicker wurden unter Mitwirkung der seitlichen die Zentralzone umgebenden Gewebe. Ein Tangentialschnitt durch den alten Stiel mit dem regenerierten Hut lehrt, daß das Wundgewebe (welches immer zuerst auf der Schnittfläche entsteht), von der Schnittfläche aus die Basis des neuen Hutes rings umwächst, und nicht aus den Geweben des regenerierten Hutes kommt, sondern aus den Teilen, welche seitlich der Zentralzone anliegen; erst später treffen sie mit den Hyphen des neuen Stieles zusammen. Das Wundgewebe wächst weiter um die Basis des neuen Stieles herum, während der neue Stiel und Hut größer werden; es erscheint sehr frühzeitig, wenn die Basis der Zentralzone erst einen kleinen Punkt regeneriert hat. Die transversale Lage dieser Hyphen quer über der Schnittfläche tritt auf Schnitten sehr klar hervor. Offenbar ist die Wachstumsenergie der seitlichen Teile aber nicht so stark wie die der Zentralzone, da die Hyphen der Zentralzone immer einen neuen Hut zu bilden anfangen; so lange die Zentralzone intakt ist, beginnt hier die Regeneration.

Weiterhin wurde, so lange die Zentralzone erhalten blieb, auch ein Stiel ebenso leicht regeneriert, wenn er weggeschnitten wurde dicht unter der Grenze von Hut und Stiel, als dann, wenn er kürzer abgeschnitten wurde und nur ein kleiner Stumpf erhalten blieb; doch wurde er hier schneller regeneriert.

Etwas ältere Fruchtkörper mit hohlen Stielen regenerierten bei Entfernung des Hutes gleichfalls aus der Mitte; eine Prüfung von gefärbten Schnitten zeigte, daß die Regeneration aus den die Höhlung umgebenden

Geweben begann, die Hyphen wuchsen nach der Mitte hin, bis sie sich trafen und dann im Zentrum der Schnittoberfläche erschienen, so daß das gleiche Bild zustande kam, wie bei intakter Zentralzone (Fig. 1).

Versuch III. Über das die Höhlung umgebende Gewebe.

Der kleine Punkt von Hyphen, welche aus der Zentralzone sich entwickeln, wurde getötet durch Verbrennen mit heißer Nadelspitze. Die ganze protoplasmareiche Zentralzone ging zugrunde unter Zurücklassung der peripheren Teile, welche becherförmig auf dem Substrat stehen blieben, an der Spitze offen. Die erste Anlage eines neuen Fruchtkörpers entwickelte sich im inneren Raum dieses Bechers an der Basis der Höhlung und zwar unmittelbar aus deren äußersten Schichten; in gleicher Weise erschien ein anderer Fruchtkörprer am oberen Ende des äußeren Randes des Stieles. Das normale Wundgewebe wurde an der Schnittfläche des alten Stieles gebildet.

Ein fertig gebildeter Hut wurde vom Stiel weggeschnitten, der auf natürlichem Substrat zurückblieb. Die mittlere sich entwickelnde Neuanlage wurde zerstört. Zwei Fruchtkörper traten nun auf. Der eine war mehr zentral gelegen als der andere, obwohl sicherlich beide von den seitlichen, die Höhlung umgebenden Partien ernährt wurden. Der Fruchtkörper, welcher der Mitte mehr genähert war, wurde durch Hyphen ernährt, welche reichen protoplasmatischen Inhalt führten, und sich in Schnitten dunkler färbten. Nachdem diese zweite Serie von Fruchtkörpern beträchtliche Größe erlangt hatte, d. i. wenn Hut und Stiel gebildet waren, wurden die Hüte entfernt durch einen Schnitt, so daß zwei Stiele auf dem einen alten zurückblieben. Die Schnittfläche des einen sekundären Stieles regenerierte nicht mehr; nur sehr wenige Hyphen traten zu einem kleinen Punkte zusammen. An der Schnittfläche bildete sich wie gewöhnlich Wundgewebe aus. Der andere Stiel erzeugte den charakteristischen Punkt von beginnender Regeneration aus der Zentralzone. Der rudimentäre Fruchtkörper erreichte fast normale Größe, bildete einen wohlgeformten Hut und Lamellen.

Versuch IV. Über die Fähigkeit des Stieles aus unverletzten Teilen zu regenerieren.

Aus allen obigen Versuchen geht hervor, daß eine starke Verschiedenheit der Regenerationsfähigkeit in den verschiedenen Teilen besteht.

Es wurde ein verhältnismäßig junger Pilz ausgewählt, der einen Hut gebildet hatte. Der ganze Hut und ein Teil des Stieles wurde mit einer dicken Schicht Gips bedeckt, der das Wachstum an dieser Stelle

hemmte. Daß die zarten Gewebe eines jungen Coprinus unter starkem Druck stehen, geht aus einer großen Zahl von Beispielen hervor, in denen die Kraft hineinreichte, um eine Gipskappe von ansehnlicher Dicke zu sprengen. Nach 4 Tagen erschienen zwei kleine Neuanlagen an der Stielbasis. Anstatt normale Form anzunehmen, waren sie gestreckt, indem sie fingerförmigen Fruchtkörpern glichen, die im Dunkeln gewachsen sind.

Diese Fruchtkörper erreichten nie richtige Größe, wahrscheinlich hätten sie auch nie Sporen erzeugt; wahrscheinlich war ihre Ernährung

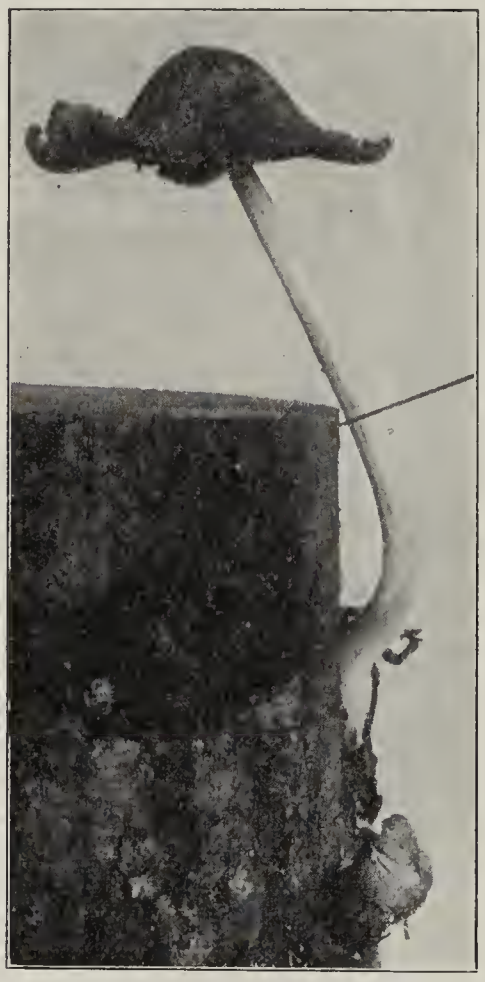


Fig. 2. Coprinus fuscescens, auf Ulmus.



Fig. 3. Coprinus niveus. Längsschnitt durch den zentralen Teil des Stieles, mit Regeneration.

unzureichend. Schnitte zeigten die normale Differenzierung des Hutes. Am meisten Interesse verdient das Ergebnis, daß es anscheinend schwer fällt, eine Regeneration aus den Seiten eines Stieles zu erzwingen, und daß an der Basis des Stieles ein Gewebepolster auftrat, das dicht mit Protoplasma gefüllt war. Dieses Gewebe stand in Zusammenhang mit der Stielbasis und war materiell nicht zu unterscheiden von deren Geweben, außer daß die Hyphen mehr oder weniger unregelmäßig und gedreht waren. Die zwei Fruchtkörper wurden aus diesem Gewebepolster gebildet und nicht direkt aus den Hyphen des Stieles. Es liefen

keine Hyphen von dem alten Stiel in die jungen Fruchtkörper, obwohl der ganze alte Stiel und die jungen Anlagen in engem Gewebezusammenhang standen. Es wird der basale Teil zur Bildung der Gewebsmassen angeregt, aus welchem wiederum neue Fruchtkörper entstehen. Diese stellen offenbar eine seitliche Sprossung dar, da es unwahrscheinlich ist, daß die Zentralzone sich hieran hätte beteiligen können, selbst wenn sie noch existiert hätte; außerdem besteht in den basalen Teilen keine solche Differenzierung in Zentrum und Rand. Es scheint, daß die Gewebe der äußeren Partien eines Stieles, speziell an der Basis, die Fähigkeit zu regenerieren erlangen können, ohne verletzt zu werden, sofern die Entwicklung darüber verhindert wird.

Versuch V. Ein kräftiger, gesund aussehender Pilz wurde, zugleich mit dem Stück Mist, auf dem er gewachsen war, isoliert und in einem feuchten Raume aufgestellt. Der Mist blieb auf sterilisiertem Filtrierpapier, das mit Mistextrakt gesättigt wurde.

Der Hut wurde entfernt, und um eine Neuentwicklung auf der Schnittfläche zu verhindern, wurde diese eingegipst. Das Ergebnis war fast das gleiche wie in den vorigen Versuchen, nur daß hier beide neugebildete Fruchtkörper groß wurden und ganz normal Lamellen bildeten mit Basidien. Die Fruchtkörper entstanden gleichfalls an der Basis des Stieles aus einer Gewebemasse, welche sich auf der Unterseite des gekrümmten Stieles (also an der Konvexseite) entwickelte. Sie standen übereinander und der untere der beiden war fast eine genaue Fortsetzung des alten Mutterstieles. Eine andere merkwürdige Regeneration war die Bildung eines kleinen völlig entwickelten Fruchtkörpers aus den Geweben der Außenseite des alten Stieles in der Mitte zwischen Basis und Schnittfläche. Er entstand offenbar aus peripheren Hyphen des alten Stieles, da der ganze Pilz isoliert war und er somit nicht aus fremdem Myzel stammen konnte. Diese Neubildung hatte sich dem alten Stiel fest angedrückt und die umgebenden Gewebe waren dicht gefärbt, ein Zeichen, daß der Einfluß der Regeneration sich hier, wenn auch schwach, geltend machte. Aus den obigen Resultaten scheint hervorzugehen, daß Coprinus niveus schwach aus den äußeren Stielgeweben regenerieren kann, leicht aber aus den basalen Teilen. In jungen Stadien färbten sich diese Stellen auch mit Guajaktinktur, was auf reicheren Gehalt von Nährstoffen hindeutet. (Eine Erscheinung, welche ich an ausgelegten Teilen des Stieles beobachtete). Bei Hemmung des Wachstums an der Spitze entsteht ein Callus an der Basis, der keine Differenzierung besitzt, aber leicht regeneriert und zwar war dies meist an der Stelle, wo der Stiel mit dem ursprünglichen Substrat in Berührung stand. Obwohl dies auch an anderer Stelle besprochen

wird, möchte ich hier auch auf die Tatsache hinweisen, daß der Zustand der Basis mit seinem Callus ein Mittel für die Verjüngung des Stieles liefert, indem von hier Hyphen zwischen den alten Zellen emporwachsen; diese Hyphen sind auf Querschnitten als kleine Zellen zwischen den großen Zellen der alten Hyphen zu erkennen.

Versuch VI. Der Stiel eines kräftig wachsenden Fruchtkörpers wurde nach der Entfernung des Hutes eingegipst. Neue Fruchtkörper erschienen an der Basis des Stieles innerhalb von 4 Tagen. Eine Untersuchung zeigte, daß sie in Verbindung standen mit dem Mutterstiel an dessen äußerster Basis.

Die Fruchtkörper (drei nach der Zahl) hatten beträchtliche Größe erlangt, einer hatte auch einen Hut gebildet, bevor irgendwie weiteres Wachstum stattfand; kurz nachher erschien aber ein Klumpen von kleinen Fruchtkörpern ganz hoch am Stiele und durch Entfernung der anderen erreichte er ansehnliche Größe mit Bildung eines Hutes. Gefärbte Schnitte durch den Stiel zeigten, daß die Fruchtkörper aus den äußersten Zellen des Stieles entstanden, welche zum Wachstum veranlaßt wurden durch das Myzel, das aus den basalen Teilen teils an der Außenseite, teils zwischen dem seitlichen Gewebe emporwuchs. Die großen Fruchtkörper an der Basis des Mutterstieles entstanden natürlich aus dem basalen Callus. Man kann demnach nicht sagen, daß die Regeneration an der Spitze aus dieser entstand, sondern sie wurde von unten her angeregt.

Versuch VII. Es wurde schon bemerkt, daß bei den Versuchen mit Stielen in allen Fällen (Regeneration auf der Schnittfläche, auf oberen Partien usw.) immer zwischen den großen Hyphen der seitlichen Teile eine sehr große Zahl kleiner Hyphen vorhanden war, welche häufig die ursprünglichen Hyphen des Stieles völlig umhüllen und bedecken. Es fragte sich, woher diese sekundären Hyphen stammen; entstehen sie aus den großen Hyphen oder kommen sie von unten, indem sie zwischen den großen Zellen emporwachsen, wie vorher angenommen?

Es wurde versucht, ob eine reichlichere Regeneration erhalten werden konnte aus den seitlichen Geweben des Stieles, wenn man ihn unverletzt ließ, den Hut mit Gips bedeckte und den Stiel dicht über dem Substrat abschnitt, so daß nur die unteren Partien des Stieles aus dem Gips hervortraten. Der so behandelte Fruchtkörper begann zuerst auf dem inneren Teil der Oberfläche, d. h. der Zentralzone des Stieles zu regenerieren, durch beständiges Entfernen dieser Neubildungen aber erschienen allmählich Fruchtkörper gleichmäßig über der ganzen Oberfläche des Stieles. Es waren zwei Möglichkeiten vorhanden, entweder entstanden diese Regenerate aus Hyphen, welche unmittelbar aus den

Zellen der Oberfläche kamen oder aus Hyphen, welche sich an der Schnittoberfläche nicht weiter entwickeln konnten und zwischen den Stielzellen emporwachsend entweder in Fruchtkörper auswuchsen oder die Zellen dieser Teile zur Regeneration veranlaßten. Ein junger Fruchtkörper mit Hut wurde also wie oben behandelt, an der Basis abgeschnitten und das basale Ende eingegipst, so daß Mantelform entstand. Da keine Entwicklung möglich war am basalen Ende, dachte ich an eine Regeneration aus den nicht bedeckten seitlichen Teilen, welcher nach früherer Untersuchung viel weniger kleine, mit Plasma erfüllte dazwischen wachsende Hyphen enthält. Zwei kleine Anlagen von Fruchtkörpern entwickelten sich am basalen Ende, ohne jedoch richtige Größe zu erlangen, obwohl der Hut schon unterschieden werden konnte. Schnitte durch den Stiel zeigten, daß die kleinen Hyphen, welche zwischen den äußeren Hyphen emporwuchsen, diesen Fruchtanlagen ihren Ursprung gaben.

Der Versuch zeigt, daß es sehr wohl möglich ist, daß diese kleinen dazwischen wachsenden Hyphen viel bei der Regeneration an älteren Stielen mitwirken, nachdem die Höhlung im Stiel gebildet ist. Coprinus-Arten, welche kein reiches System sekundärer Hyphen entwickeln, wie Coprinus fuscescens, zeigen nur schwache oder gar keine Regenerationsfähigkeit.

Versuch VIII. Ich möchte zu den vorigen Versuchen noch nachtragen, daß sich zuerst neue Fruchtkörper immer an der Basis bildeten. Da die zuletzt besprochene Regeneration aus oberen Teilen durch die von unten aufwachsenden Hyphen verursacht sein kann, auch im letzten Versuch sehr schwach war und nur im basalen Teil des eingegipsten Stieles erschien, so schien es von Interesse zu sein, zu untersuchen, welche Rolle diese sekundären Hyphen bei Regenerationserscheinungen überhaupt spielen.

Zwei junge Fruchtkörper mit kräftigem Wachstum und fertigen Hüten, welche auf sterilisierten Kulturen gewachsen waren, wurden ausgewählt; Hut und oberer Teil des Stieles des einen wurde fest eingegipst. Der Hut des anderen wurde entfernt und der zurückbleibende Stiel gleichfalls in Gips eingeschlossen, auch an einem anderen wurde der Hut weggeschnitten an seinem unteren Rand und die Schnittfläche eingegipst. Die drei so behandelten Stiele ließ ich auf dem Nährboden 3 Tage sich entwickeln, nach Ablauf dieser Zeit zeigte sich keinerlei Regeneration. Die Stiele wurden nun dicht über dem Mist abgeschnitten und dann umgekehrt, mit den Gipskappen im Substrat, ausgelegt. Zugleich wurden zwei andere Fruchtkörper von anscheinend gleichem Alter wie die ersten vom Substrat abgeschnitten, Hut und oberer Teil des

Stieles eingegipst und die zwei Stiele umgekehrt mit den drei anderen ausgelegt. Nach kurzer Zeit (3 Tagen) begannen drei Stiele zu regenerieren (an allen fünf war die Schnittfläche mit Gips bedeckt worden) und die kleinen Neuanlagen erschienen in großer Zahl als Haufen auf der Oberfläche, so daß der alte braune Stiel weiß erschien. Der Stiel mit entferntem Hute regenerierte reichlicher, als die beiden anderen. Die beiden anderen Stiele, deren Hüte nicht mit Gips bedeckt worden waren, erzeugten zu dieser Zeit keinen einzigen Fruchtkörper, 2 Tage später aber erschienen zwei kleine Neubildungen auf dem einen und einige Punkte auf dem anderen.

Ich präparierte nun, um einem Faulen zuvorzukommen, die Pilze zu Mikrotomschnitten.

Die Stiele der drei Pilze, welche auf ihrem Substrat belassen wurden, waren ganz voll von feinen Hyphen zwischen denen des alten Stiels, wobei die alten Hyphen oft völlig von ihnen verdeckt wurden; es war stets zu erkennen, daß diese Hyphen von unten stammten. In sehr wenigen Fällen gaben offenbar Stielzellen den sekundären Hyphen ihren Ursprung. Das Wachstum wurde manchmal an der Außenseite zum Teil, in einigen Fällen sogar gänzlich verdeckt, indem ein Gewebemantel diese Teile umhüllte; aus diesem Hyphensystem entstanden die Regenerate des Stieles. Auf Schnitten durch die jungen Fruchtkörper zeigte sich, daß sie nur eine Fortsetzung dieser Hyphen waren und man konnte leicht die allgemeine Richtung der Hyphen sehen, welche zur Fruchtkörperbildung zusammentreten.

Eine ähnliche Untersuchung der zwei Stiele, welche einfach abgeschnitten und umgekehrt worden waren, ergab das interessante Ergebnis, daß nur sehr wenige zwischengewachsene Hyphen zu sehen waren. Es zeigte sich allgemein, daß Stiele von frischem Material, welche nicht am Wachstum behindert wurden, sondern normal sich entwickelten, nur sehr wenige dieser sekundären Hyphen besaßen, und es scheint, daß von diesen eben die Regeneration von Fruchtkörpern ausgeht. An alten normalen Stielen ist der Mangel sekundärer Hyphen die Ursache ihrer schwachen Regenerationsfähigkeit, während Stiele mit sekundären Hyphen sehr leicht regenerieren. Schnitte durch normale Stiele zeigen zwar kleine sekundäre Hyphen, doch stets in größerer Menge an der Basis, so daß auch ihre Entstehung von unten her wahrscheinlich ist.

Versuch IX, welcher bestimmen soll, wie weit die an der Stielbasis gebildete Gewebemasse regenerieren kann.

In allen Versuchen, in denen eine Entwicklung an der Spitze verhindert wurde, trat Regeneration an der Basis des Stieles ein und es

hatte sich ergeben, daß die Neubildungen aus plasmareichen Hyphen bestanden, welche ringsum und im Zusammenhang mit dem Stiel sich gebildet hatten. (Diese Hyphenmassen fehlen bei normalen Fruchtkörpern.) Eine Untersuchung der Ursache dieser Hyphenbildung schien interessant zu sein und auch darauf hinzuweisen, daß es vielleicht möglich wäre, diese Art zur Bildung eines sklerotiumähnlichen Körpers zu veranlassen.

Ein kräftig wachsender Fruchtkörper wurde ausgewählt, der Hut abgeschnitten und die Schnittfläche eingegipst; am dritten Tage erschien ein junger Fruchtkörper an der Stielbasis; er wurde getötet, ein anderer zeigte sich bald darauf und wurde wieder entfernt. Am fünften Tage wurde alles getötet, geschnitten und gefärbt. Die mikroskopische Untersuchung zeigte, daß wie gewöhnlich das Callusgewebe gebildet war, aus dem die beiden jungen Fruchtkörper stammten. Die Hemmung der beiden jungen Anlagen schien das bereits große Callusgewebe weiter gereizt zu haben und die Hyphen entwickelten sich in allen Richtungen von der zentralen Masse aus, besonders auf der Konvexseite des alten Stieles, welcher sich krümmte, oder an der Callusseite, wo der erste Fruchtkörper gebildet war. Die Hyphen verbanden eine ganz große Masse des Substrates zu Knollen und entwickelten sich allmählich in einer einzigen Wachstumslinie; schließlich entstand ein fingerähnliches Gebilde, das eine Gewebedifferenzierung zu besitzen schien, nämlich das innere Gewebe des Callus, das bei einer Färbung infolge seines großen Plasmagehaltes sich tiefer färbte, und die Hyphen der Außenseite.

Daß nach der Zerstörung des zweiten Fruchtkörpers keine weiteren mehr gebildet wurden, hatte aller Wahrscheinlichkeit nach seinen Grund in dem erschöpften Zustande des Callus, so daß eine Zeit der Ruhe eintreten mußte.

Diese Versuche scheinen darauf hinzuweisen, daß bei dieser Art eine Region starker Bildungsfähigkeit vorhanden ist, eine Region mit mangelnder Differenzierung, die dazu dient, die Basis des Stieles zu verjüngen, indem sie an die oberen Partien neue Hyphen liefert; wird weiter oben das Wachstum gehemmt, so bildet dieses Gewebe an der Basis einen Callus, der einem Sklerotium gleicht und hohe produktive Kraft besitzt. Es stellt dies ein wichtiges Schutzmittel bei Verletzung dar (Fig. 4).

Wenn bei derartigen Versuchen eine Kultur austrocknete, so waren die Stümpfe der Stiele doch stets imstande, zu regenerieren, sowie neuer Mistextrakt zuzugeben und für die nötige Wärme gesorgt wurde.

In der Natur kommt es oft vor, daß der ganze Fruchtkörper zerstört und von Tieren gefressen wird und nur die Basis stehen

bleibt; in solchen Fällen ist die hohe Regenerationsfähigkeit von großem Werte.

Versuch X. Ein Fruchtkörper, dessen Wachstum im oberen Teile verhindert wurde, bildete zunächst zwei Neuanlagen an der Basis, diese wurden gleichfalls daran verhindert, Hüte zu bilden; es entwickelte sich ein Callus von ansehnlicher Größe. Dieser wurde entfernt und auf sterilisiertes, mit Mistextrakt getränktes Papier gebracht. Nach 5 Tagen beobachtete ich kleine Punkte von Neubildungen, die auf der einen Seite

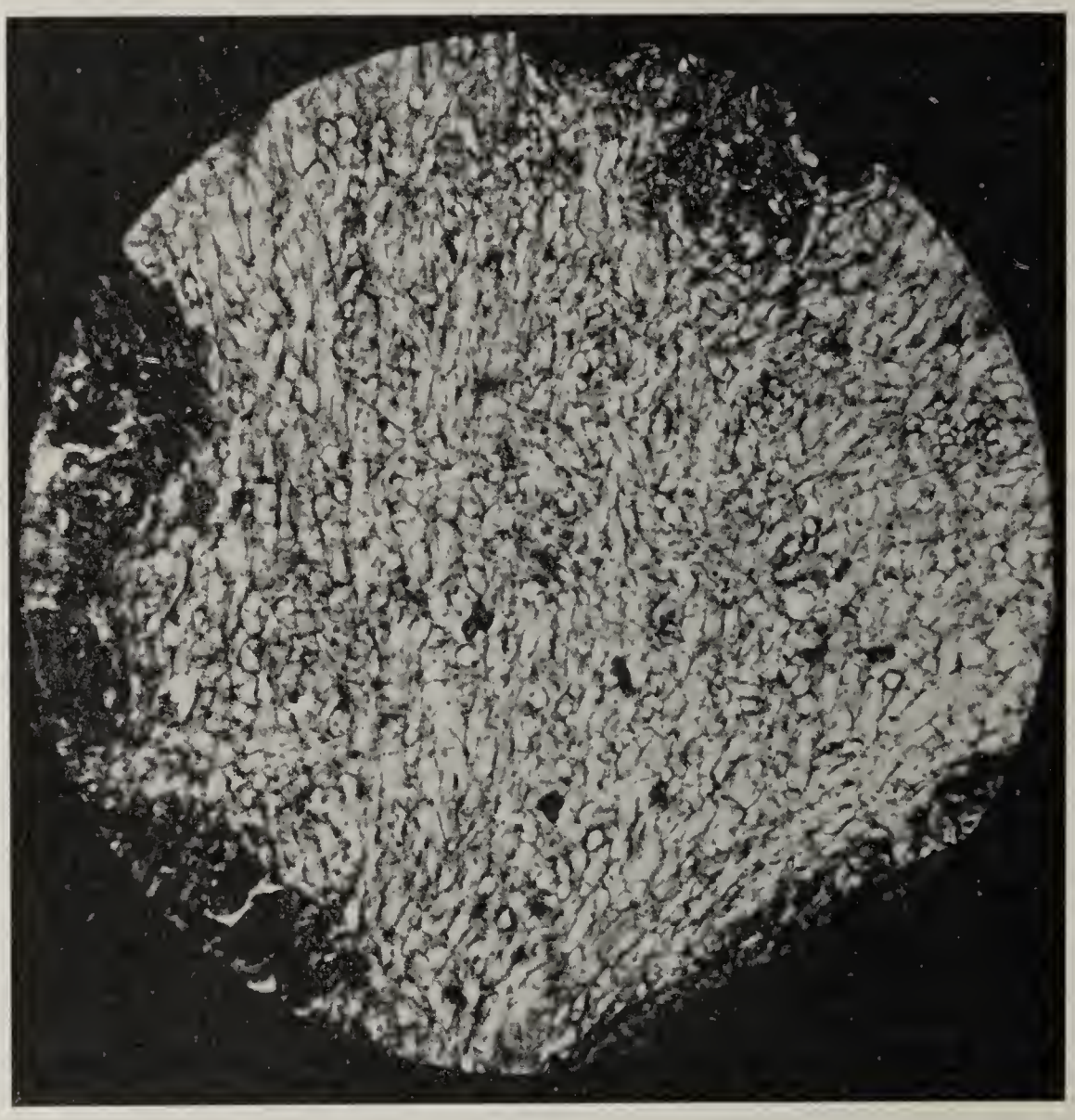


Fig. 4. Coprinus niveus. Schnitt durch die basale Wucherung.

der Masse auftraten. Sie boten keinen normalen Anblick und entwickelten sich nicht weiter, um eventuell Hüte zu bilden. Die ganze Masse wurde getötet, fixiert und gefärbt, dann wurden die fünf Fruchtkörper in einer Ebene durchschnitten. Sie besaßen die Form wirklicher Fruchtanlagen ohne Differenzierung in Teile, nur ein Auswachsen des Callusmyzels, eine Fortsetzung desselben und nicht von einem anderen stammend, wie dies bei Stielregenerationen der Fall ist.

Die Differenzierung der Gewebe bei Coprinus und ihre Beziehung zu ihren physiologischen Funktionen.

Die vorhergehenden Beobachtungen haben gezeigt, daß in den Zellen eines Pilzes bedeutende Veränderungen vor sich gehen; da sie nicht gleichwertig sind, kommt es zu einer Differenzierung einzelner Teile. Wir müssen dies auch in gewissem Sinne erwarten, da z. B. manche Teile weit vom Substrat entfernt sind und von anderen Teilen die Stoffe zugeführt erhalten, so daß für diese Aufgabe eine verschiedene Ausbildung der Gewebe wahrscheinlich ist.

Bei allen bis jetzt untersuchten Agaricus-Arten findet sich eine mehr oder weniger allgemeine Differenzierung der Stielhyphen; bei manchen Arten besteht sie darin, daß die Hyphen im Zentrum nur locker verflochten sind im Vergleich mit den äußeren Partien, wo sie dicker und fest aneinander gepreßt sind. Bei anderen Arten wie Coprinus ist, wie wir gesehen haben, der Unterschied zwischen zentralen und peripheren Hyphen sehr groß, auch entstehen beide aus getrennten Anlagen. Wie erwähnt, bleibt der zentrale Teil am Leben bis zur Bildung des Hutes. Später bildet sich infolge Längsstreckung und seitlicher Ausdehnung der Randzone eine Höhlung in der Mitte des Stieles; dies geschieht erst, wenn die Hutgewebe schon ziemlich weit entwickelt sind und eine Menge von Nährstoffen an der Spitze des Stieles und in den Hymeniumschichten für zukünftigen Bedarf angesammelt sind.

Bei vielen Russula- und Lactarius-Arten bleibt der zentrale Teil dauernd erhalten, doch besteht insofern ein Unterschied, als in den Randpartien die Hyphen dickere Wände besitzen, mehr parallel verlaufen und auch dichter aneinander gedrückt sind; die zentralen Teile besitzen Hyphen mit dünnen Wänden, welche sich mehr verzweigen, eine Neigung zur Verschmelzung besitzen, locker verflochten sind und reichlich Protoplasma führen.

Bei Arten mit Hohlraumbildung bilden die ursprünglich zentralen Hyphen später eine Schicht um die Höhlung, ohne jedoch nur für die Stoffleitung in Betracht zu kommen.

Mit Rücksicht auf die Aufgabe des Fruchtkörpers, Sporen zu bilden und auszustreuen, kommt dieser Differenzierung zweifache Bedeutung zu. Der zentrale Teil des Stieles steht in direktem Zusammenhang mit den Hymeniumzellen, welche allein von allen Hutzellen gänzlich mit Nahrung versorgt werden müssen und wenn wir die zentripetale Entwicklung des Hutes betrachten und mit der zentrifugalen des Stieles vergleichen, finden wir, daß eine andere Anordnung nicht gut möglich

wäre, daß die äußeren Gewebe des Stieles überhaupt nicht beitragen zur Reifung des Hutes, oder doch nur in den allerersten Stadien, wenn der Rand des Hutes noch in Verbindung mit der Stielaußenseite steht; auch dann würde aber wohl nur die Oberschicht in Betracht kommen. Das Trama erhält seine Nährstoffe ausschließlich durch die Zentralpartien. Diese Anordnung der Leitungsbahnen in der Mitte und der mechanischen Hyphen außen hat bei gestielten Pilzen dieselbe Bedeutung wie die Hohlraumbildung im Stamme von allen Graspflanzen. Bei dem wachsenden Gewichte des Hutes müssen die äußeren Teile des Stieles kräftiger werden; es wird mehr Chitin eingelagert in den Zellwänden, die inneren Zellen werden stark gedehnt, so daß ein Druck ausgeübt wird.



Fig. 5. Coprinus fuscescens. Stielquerschnitt mit deutlicher Gewebedifferenzierung und sekundärem Hohlraumsystem.



Fig. 6. Coprinus niveus. Milchgefäße, Verschmelzung von vier Zellen.

Bei Coprinus fuscescens und Coprinus atramentarius findet später die Bildung eines sekundären Hohlraumsystems statt durch tangentiale und radiale Dehnung der äußeren mechanischen Gewebe; es mag sein, daß dies auch eine Durchlüftungsvorrichtung darstellt (Fig. 5).

Der ununterbrochene Zusammenhang zwischen Hymenium und dem Zentralteil des Stieles zeigt sich auch in ihrer chemischen Beschaffenheit.

Für die Funktion des Zentralgewebes als Leitungsbahn spricht die Tatsache, daß außer starkem Plasmagehalt bei mehreren Arten dieser Teil allein (und zwar besonders an der Grenze von Hut und Stiel) mit

Guajaktinktur sich blau färbte, was die Anwesenheit von Oxydasen anzeigt; es war dies der Fall bei Russula emetica, Russula vesca, Russula virescens, Lactarius piperatus, Lactarius deliciosus, Amanita muscaria. Oxydasen deuten, wie an anderer Stelle angegeben wurde, auf einen reichen Gehalt von Albumosen hin. Manchmal trat diese Reaktion nur im mittleren Alter des Fruchtkörpers an der Stielbasis auf; in älteren Stadien würde man sie nur an der Grenze von Hut und Stiel erhalten, ferner in den Lamellen. Dies ist deshalb von Interesse, weil es zeigt, daß die Strömung aller Stoffe nach oben stattfindet, gleichzeitig mit einer beständigen Veränderung des chemischen Inhalts in Hut und Stiel in den verschiedenen Altersstadien.

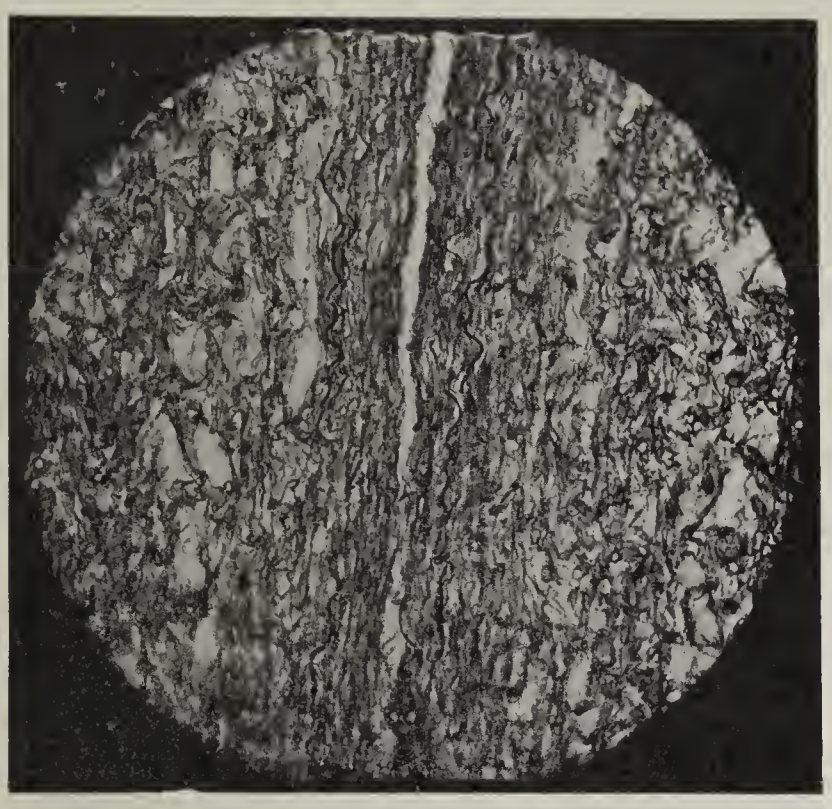


Fig. 7. Coprinus fuscescens. Milchgefäße im zentralen Teil des Stieles.

Gelegentlich dieser Untersuchungen machte ich die Entdeckung, daß sich durch alle Teile verbreitet in Hut und Lamellen ein System verzweigter Hyphen findet, das durch charakteristischen Bau und Inhalt ausgezeichnet ist (Fig. 6 bis 11). Dieses System bei Coprinus hat alles gemeinsam mit dem bei Lactarius und anderen Agaricineen. Als seitliche Sprossung aus den allgemeinen Zellgeweben entstehend, können diese Röhren früh erkannt werden an ihrer Eigentümlichkeit, sich weiter zu verzweigen und mit anderen gleich-



Fig. 8. Coprinus niveus. Milchgefäße im Gewebe an der Grenze von Hut und Stiel.

artigen Hyphen zu verschmelzen. An jungen Fruchtkörpern kommt es vor, daß ganz junge Hyphen sich abweichend differenzieren und diesem System angehören, das sehr frühe schon zu erkennen ist. An Regenerationsprodukten werden diese Röhren mit der ersten Differenzierung eines Hutes gebildet; sie wachsen, miteinander verschmelzend, aufwärts. Die Bildung solcher Röhren dauert an, bis der Hut vom Stiel abbricht. Solange die äußersten Teile des Stieles solche Röhren bilden, ist dies die einzige Zeit, in welcher die äußeren Stielgewebe zur Ernährung des Hutes beitragen. Nachdem der Hut abgebrochen ist, sind sie überall noch zu erkennen an ihren dickeren Wänden und deren Chitingehalt, ohne jedoch noch Inhalt zu führen. Obgleich die Mehrzahl in mehr oder weniger paralleler Anordnung in der Zentralzone verläuft, werden sie doch auch ganz allgemein zwischen den mechanischen Hyphen angetroffen. Die meist zur Ernährung des Hutes bestimmten Hyphen verlaufen unmittelbar in der Mitte der Zentralzone und sind zu erkennen daran, daß sie, parallel verlaufend, ein lockeres Gewebe bilden, ohne sich reich zu verzweigen wie in den seitlichen Partien. Das ganze System tritt an der Grenze von Hut und Stiel zusammen, um von hier in die subhymenialen Schichten und schließlich in die Tramazellen zu gehen.

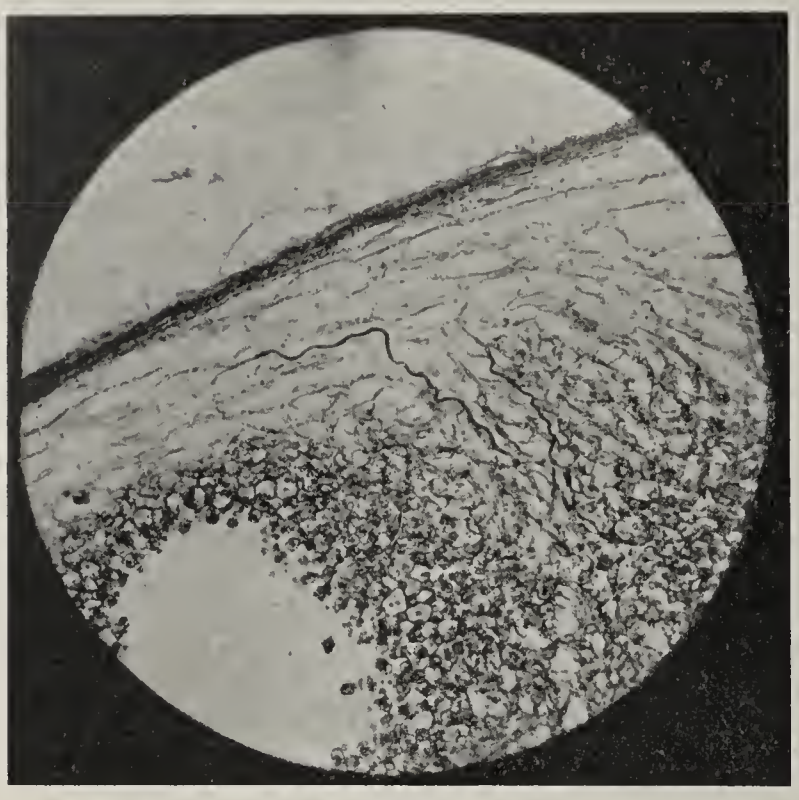


Fig. 9. Coprinus fimetarius. Schnitt durch einen Teil des Hutes; Milchgefäße in die Tramaschicht eintretend.

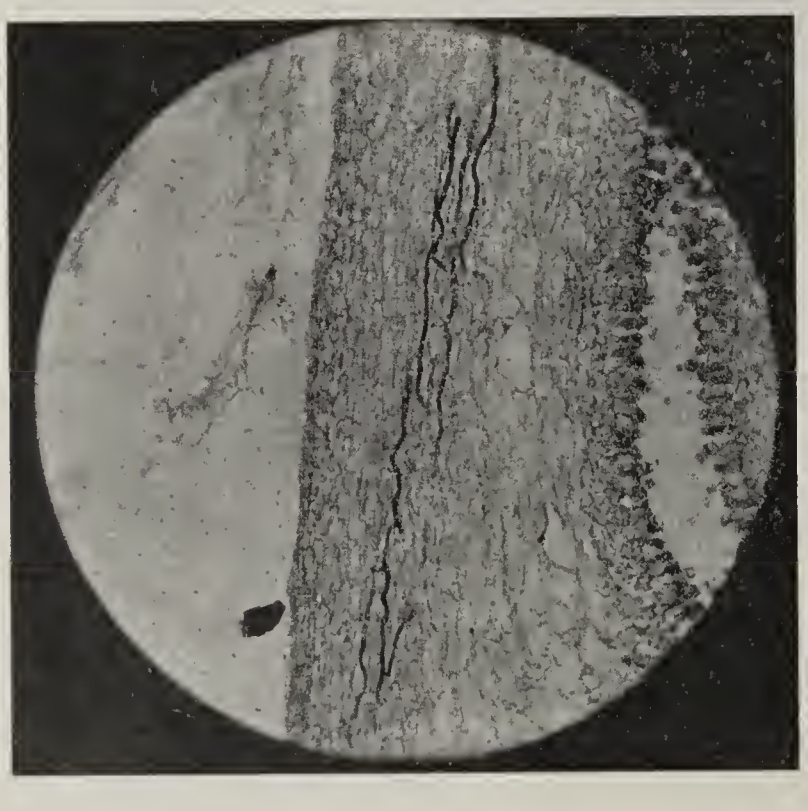


Fig. 10. Coprinus fimetarius. Milchgefäße.

Eine Beziehung zur Sporenproduktion läßt sich infolge der Tatsache annehmen, daß sie in jüngeren Entwicklungsstadien ganz angefüllt sind mit Fettstoffen, Albumosen, Dextrin usw., zur Zeit der Sporenreife aber völlig leer sind.

Dieses Milchgefäßsystem fand ich bei sieben verschiedenen Coprinus-Arten und es schien bei Coprinus höher entwickelt zu sein als bei vielen anderen Pilzen, bei denen sein Vorkommen lange bekannt ist. Es findet sich ohne Zweifel bei allen Agaricineen. Ich untersuchte ferner die Fruchtkörper von Pleurotus ostreatus, Polyporus sulphureus und fand auch hier die Anwesenheit eines Milchgefäßsystems, besonders in den Hymeniumschichten.

Mit der Strömung der Nährstoffe von unten nach oben scheint eine sehr interessante Erscheinung im Zusammenhang zu stehen, die bei höheren Pflanzen allgemein bekannt ist, ich meine die Polarität.



Fig. 11. Coprinus fuscescens. Milchgefäße im Trama.

Zuerst möchte ich einige Versuche anführen.

Ich entdeckte die Polarität bei Versuchen, Coprinus-Arten aufeinander zu pfropfen; auf diese Versuche werde ich im einzelnen an anderer Stelle zu sprechen kommen und möchte hier nur einige Tatsachen angeben. Wenn ich einen jungen Stiel von Coprinus niveus auf einen anderen Stielstumpf pfropfte, wuchsen sie gut zusammen und regenerierten bald; wurde aber das Schnittstück umgekehrt gepfropft, so blieb eine Regeneration aus, obwohl beide Teile miteinander verwuchsen. Das Wachstum stammt meist vom unteren Pfropfstück. Ich untersuchte nun andere Arten. Stücke aus dem Stiele von Polyporus brumalis wurden in verschiedenen Lagen ausgelegt. Um eine kürzere Ausdrucksweise zu ermöglichen, wollen wir das eine dem Hut zugekehrte Ende mit +, das entgegengesetzte, basale Ende mit — bezeichnen. Das + Ende lag bald oben, bald unten, dann lagen Stücke horizontal. Das + Ende regenerierte in sechs horizontal gelegten Stücken und auch bei anderen Lagen (Fig. 12) zuerst und entwickelte manchmal einen langen Stiel; zur Hutbildung konnte es bei dem Mangel an Nahrung natürlich nicht

kommen, doch geht aus der Tatsache, daß trotz verschiedenster Lage stets das + Ende zuerst regeneriert, das Vorhandensein einer Polarität deutlich hervor. Der Einfluß von Temperatur, Feuchtigkeit, Licht usw. schien ohne Wirkung zu sein, das — Ende war manchmal stärker beleuchtet, oder wurde über Wasser aufgehängt. Manchmal regenerierte das — Ende zuerst, hielt aber gewöhnlich bald im Wachstum ein, während die + Seite regenerierte und kräftig weiterwuchs. Diese Versuche wurden

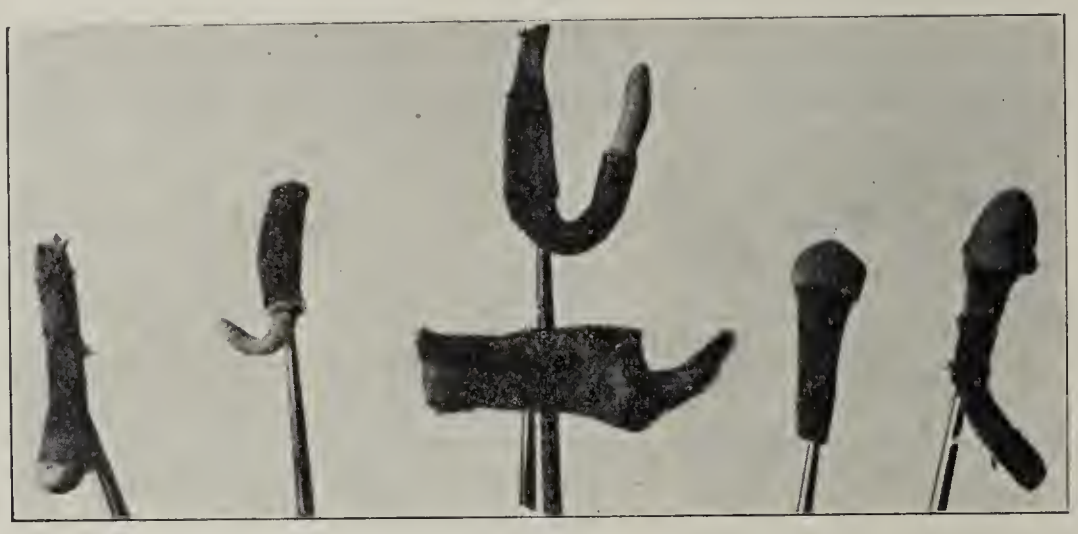


Fig. 12.



Fig. 12 a.

Fig. 12 und 12 a. Polyporus brumalis Polarität bei der Regeneration, die Stücke der Reihe a lagen alle horizontal.

oft wiederholt und ca. 98% zeigten eine größere Regenerationsfähigkeit des + Endes. Ein Wundgewebe wird, wie zu erwarten, auch am — Ende gebildet, was ja an jeder Schnittfläche eintritt.

Pfropfte ich Stielstücke von Polyporus brumalis aufeinander, so unterblieb eine Weiterentwicklung, falls + auf + zu liegen kam; im andern Fall (+ auf —) wurde ein kräftiger Stiel mit kleinem Hut gebildet. Die Tatsache, daß gelegentlich ein oder zwei Stielstücke von etwa 12

mit ziemlicher Kraft am — Ende regenerierten, scheint für das Gesamtergebnis ohne Bedeutung, möglich, daß die Ursache dafür in einem verschiedenen Zustande während verschiedener Altersstadien liegt; schwache Fruchtkörper z. B. schienen meist weniger starke Polarität zu besitzen als normal entwickelte.

An Versuchen mit Pleurotus ostreatus zeigten nicht nur Stücke des Stieles Polarität, sondern auch die Lamellen verhielten sich so. Junge Hüte, welche bereits Lamellen gebildet hatten, wurden in einiger Entfernung unter der Ansatzstelle der Lamellen abgeschnitten und auf die frische Schnittfläche eines Stieles gesetzt, dessen Hut auf den Stiel des anderen gepfropft worden war. Wurde + auf — gesetzt, so verwuchsen beide Teile innig miteinander und bildeten Hüte von normaler Größe (Fig 12 b); bei einer Umkehrung der Stücke jedoch unterblieb eine derartige Entwicklung.

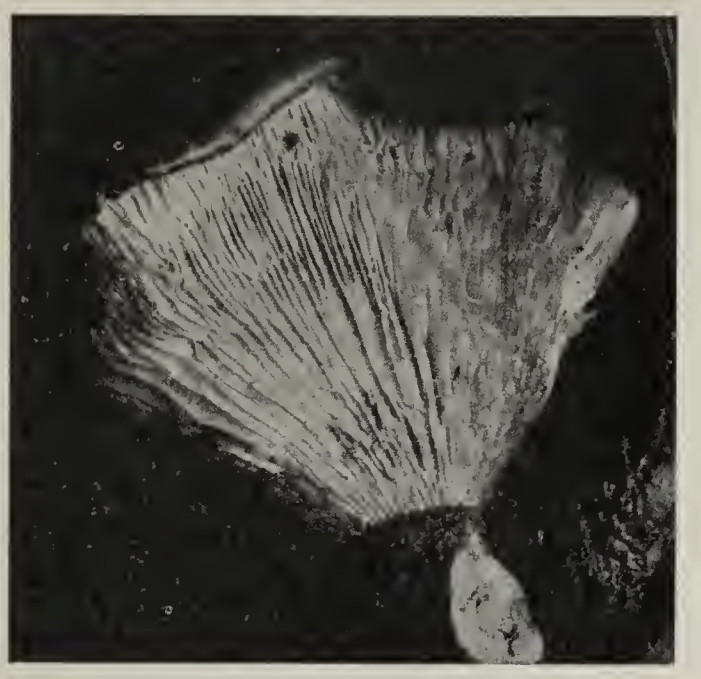


Fig. 12 b. Pleurotus ostreatus. Pfropfung von + auf — Ende.

Da nun bei den gestielten Formen der Agaricineen und Polyporus-Arten eine Polarität offenbar besteht, war es interessant zu untersuchen, ob auch ungestielte Fruchtkörper, wie solche von Polyporus-, Trametes- und Fomes-Arten, eine (horizontale) Polarität besäßen. Ich pfropfte also Teile von Fruchtkörpern

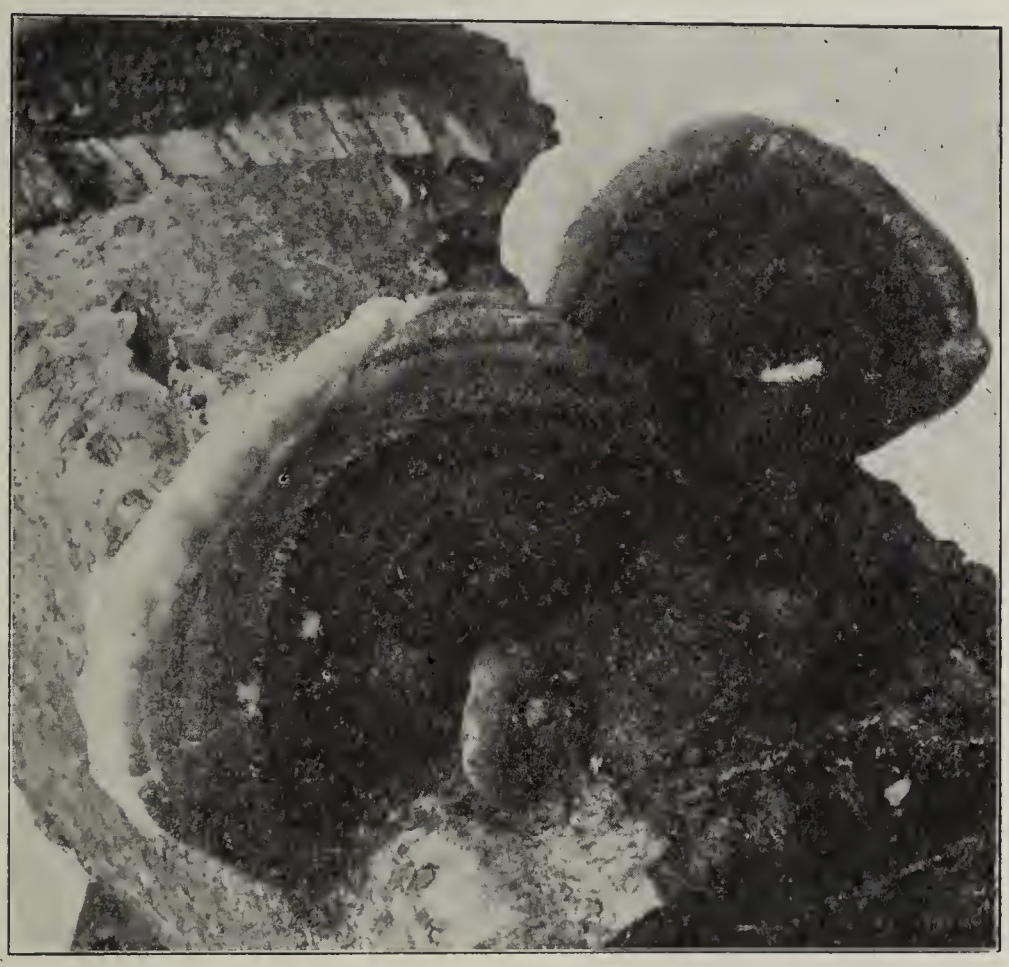


Fig. 13. Polystictus hirsutus. Pfropfung von + auf — Seite.

Polystictus hirsutus aufeinander und zwar sowohl Teile desselben Fruchtkörpers, als auch solche von verschiedenen. Im ersten Falle erhielt ich ein sehr deutliches Ergebnis. War + auf — gesetzt, so verwuchsen die Teile und das Reis regenerierte stark, in einem Grade, der bei einfacher Regeneration nie erreicht würde; es erhielt Nahrung von dem Stock (Fig. 13). Die Pfropfung + auf + regenerierte nicht während eines ganzen Monats, obwohl unter gleichen Bedingungen gehalten (Fig. 14).

Ich beobachtete hierbei, daß je näher dem Rande des Fruchtkörpers das Reis entstammte, desto leichter eine Regeneration aus der — Seite auftrat, wenn + auf + gesetzt wurde. Es ist wohl möglich, daß hier am Rande, wo sich die Stoffe nicht in gleichgerichteter Strömung befinden, sondern mehr angestaut werden, auch eine Polarität weniger deutlich ausgeprägt ist.

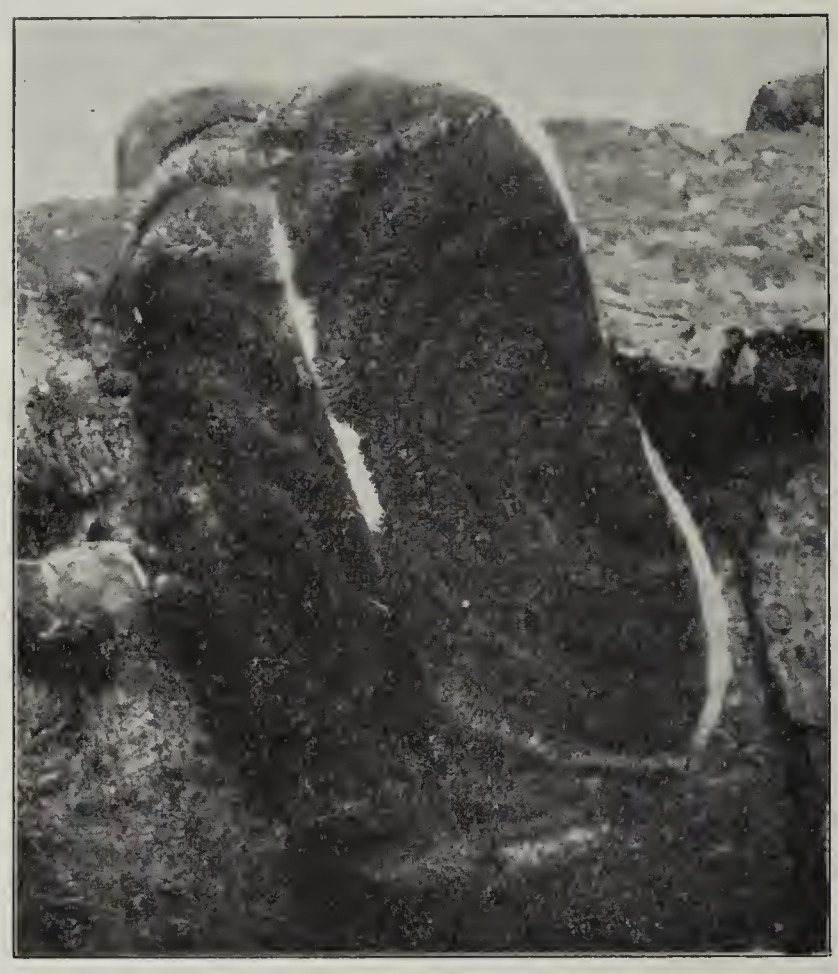


Fig. 14. Polystictus hirsutus. Pfropfung von + auf + Seite.

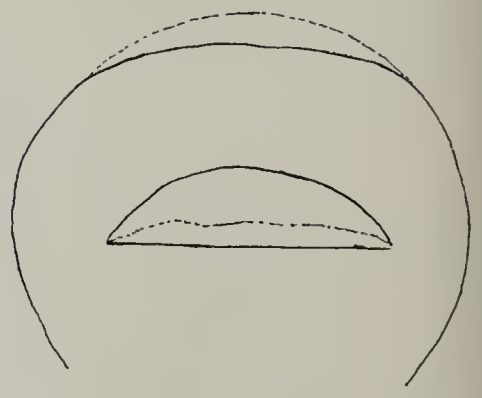


Fig. 14 a. Polarität bei der Regeneration.

Fruchtkörper, welche in der Weise geschnitten wurden, wie sie Fig. 14 a zeigt, regenerierten so, wie ich durch die punktierten Linien angedeutet habe. Das Resultat läßt sich hier verändern, je nachdem man durch die Schnittflächen die Zonen des Wachstums oder die dazwischen liegenden Schichten freilegt. Die Gewebe, welche den Schluß jeder Zone bilden, enthalten mehr Nährstoffe und werden also auch kräftiger regenerieren.

Ich untersuchte nun dasselbe bei Ascomyceten und zwar bei Xylaria hypoxylon und Xylaria polymorpha. Wenn der junge „Sproß“ dieser Art untersucht wurde, zeigte sich auch in feuchter Kammer keine Re-

generation; es kam meist nur zur Bildung eines Wundgewebes. Stücke von älteren Fruchtkörpern, welche der Perithecienbildung nahe waren, zeigten deutliche Polarität, besonders an Stücken, die der Basis eines Fruchtkörpers entnommen waren. Teile vom oberen Ende regenerierten meist überhaupt nicht. Doch besitzen diese gleichfalls polare Differenzierung, wie dies aus folgenden Versuchen hervorgeht. Ich pfropfte Teile von der Spitze auf Stücke desselben Fruchtkörpers oder anderer Früchte; kam + auf —, so trat Weiterwachstum ein, bei + auf + fehlte eine Weiterentwicklung.

Pfropfung.

Obgleich es schon mehrfach erwähnt wurde, daß es gut möglich ist, Pilze zu pfropfen, möchte ich hier doch eine Anzahl von Versuchen zusammenstellen und die Ergebnisse mitteilen, die man damit erhält. Da manche Arten sehr schnell wachsen, lassen sich hier in kurzer Zeit Resultate gewinnen.

Die Methode war folgende:

Ich setzte einfach die glatten Schnittflächen aufeinander, die Schnitte wurden weder tief noch keilförmig ausgeführt, da stärkere Verwundung häufig den Tod herbeiführt infolge der Zartheit des Materials; auch ließ sich dadurch leichter erreichen, daß die Wunde völlig bedeckt war und kein Teil der Schnittfläche frei lag, d. h. wenn Reis und Unterlage von gleicher Größe waren, was selbstverständlich notwendig ist. Bei dieser Methode war es zugleich auch leichter möglich, an Formen mit zarten Stielen die zentralen Gewebezonen genau aufeinander zu bringen; ich fand, daß dies nötig ist, um ein gutes Resultat zu erhalten. Demgemäß mußten auch die Pfropfungen mit einem Material ausgeführt werden, an dem die Zentralzone noch erhalten war, oder an noch jüngerem, bevor überhaupt der Hut irgendwie in seiner Verbindung mit dem Stiel gelöst ist.

Die Bedeutung der Zentralzone ist aus den vorhergehenden Untersuchungen leicht zu verstehen; sie regeneriert am leichtesten und dient der Leitung von Nährstoffen. Da ferner in jungen Entwicklungsstadien, je weiter unten der Stiel durchschnitten wird, desto schneller eine Regeneration stattfindet, werden die Schnitte unmittelbar zusammenwachsen und zwar besteht eine stärkere Neigung der Hyphen der Unterlage emporzuwuchern und die Gewebeverbindung zu festigen. Die Hyphen der seitlichen Teile spielen hierbei gleichfalls eine wichtige Rolle, und ihre Verwachsung ist durchaus nötig; unterbleibt sie, so geht die Pfropfung zugrunde, sie bildet einen Schutz der zarten inneren Teile

gegen die Außenbedingungen. Das Wundgewebe, das sich immer bildet, wächst gleichfalls in die Gewebe des Reises ein, so daß bald eine Vereinigung zustande kommt. Ebenso spielen die sekundären Hyphen eine wichtige Rolle, welche, wie oben angegeben, aus den basalen Teilen entstehen, wenn der Fruchtkörper an der Spitze verletzt wird.

Pfropfungen mit keilförmigen Schnittflächen waren nicht von viel Erfolg begleitet, besonders bei Coprinus, da der Turgor im Stiel ein Bestreben zeigte, den Stiel nach beiden Seiten hin auswärts zu spreizen; doch erwies sich diese Methode bei manchen Ascomyceten, bei Agaricineen mit mehr verholzten Stielen und bei Polyporus-Arten manchmal als erfolgreich.

An Coprinus müssen Pfropfungen mit jungem Material vorgenommen werden. Die junge Frucht, welche einen Hut gebildet oder doch zu bilden begonnen hatte, wurde dicht unter dem Hute durchschnitten, je weiter unten, desto besser. Die Entdeckung, daß es möglich ist, Pilze zu pfropfen, machte ich infolge der Beobachtung, daß ein solcher abgeschnittener Hut weiter wuchs und zur Reife gelangte, als er einfach wieder auf seinen alten Stiel gelegt wurde (es wäre bei bloßer Lage auf einem Substrat nie solches Wachstum möglich); wenn ein Fruchtkörper von einem verschiedenen Stiel genommen wurde, war das Ergebnis das gleiche. Selbstverständlich ist es gut, solche Versuche möglichst bei antiseptischen Bedingungen auszuführen. Es war nun interessant zu sehen, ob man möglicherweise aus dem Reis eine Regeneration erhielt. Ich schnitt nun, als Reis und Unterlage völlig miteinander verwachsen waren, und das Reis seine Nahrung durch die Unterlage erhielt, den Hut des Reises weg und ließ noch ein Stück auf der Unterlage zurück. Nach mehreren Versuchen mit Material von verschiedenem Alter und bei vorsichtigem Experimentieren fand ich, daß tatsächlich das Reis regenerieren kann; es bildete sich, wie in normalen Fällen aus der Zentralzone ein junger Fruchtkörper und erlangte Reife. Dieses Ergebnis erhielt ich mehrmals mit Coprinus niveus, indem ich manchmal denselben entfernten Fruchtkörper wieder aufsetzte oder auch einen anderen pfropfte. Diese Spezies lieferte sehr gutes Material zu solchen Versuchen, da sie in jüngeren Stadien einen festen kräftigen und verhältnismäßig langen Stiel besitzt und auch in Kulturen gut wächst.

Ich versuchte, verschiedene Arten zu pfropfen, und zwar begann ich damit, junge Fruchtanlagen von Coprinus fimetarius var. macrorrhiza auf Stiele von Coprinus niveus zu pfropfen. Das Resultat war sehr überraschend. Das Reis, das von der Wurzel von Coprinus fimetarius var. macrorrhiza stammte, begann nach etwa 2 Tagen zu wachsen, um eventuell

mit Sporenerzeugung abzuschließen; dieses Ergebnis wurde mehrmals erhalten, daneben aber fanden sich auch negative Resultate. Da der Erfolg von dem Alterszustand sowohl des Reises als auch der Unterlage abhängt, war es nötig, eine große Menge Pfropfungen auszuführen. Es war merkwürdig, daß junge Fruchtkörper von Coprinus fimetarius var. macrorrhiza, welche aus Sporen gezogen waren, besser wuchsen als solche, die Regenerationsprodukte darstellten (ohne Zweifel rührt dies von der geringen Menge Nährmaterial her, die ein regenerierter Hut erhält). Ferner zeigte sich, daß das Wachstum leichter vor sich geht, wenn als Reis Coprinus niveus verwendet wurde. Um ein Resultat zu erhalten, dürfen besonders als Unterlage immer nur Arten benützt werden, welche schnell und kräftig regenerieren. Da infolge der Polarität das Reis an seiner Schnittfläche nur schwach und langsam regeneriert (diese Schnittfläche ging stets durch einen Teil, wo die Gewebe des Stieles schon differenziert waren und nicht durch die Spitze der Basis selbst, welche ja hohe Regenerationsfähigkeit besitzt), ist dies sehr notwendig, damit möglichst bald die Bahn für die Stoffzufuhr wieder hergestellt wird. Tritt die Regeneration von Hyphen aus der Unterlage schnell ein, so ist es ziemlich belanglos, ob das Reis etwas schneller oder langsamer wächst, es wird stets zur Reife gelangen.

Die Versuche wurden wiederholt mit Coprinus fimetarius var. macrorrhiza als Unterlage und Coprinus niveus als Reis und zwar wurde überall nur junges Material verwendet. Der Versuch gelang, was mich etwas überraschte, da Coprinus fimetarius var. macrorrhiza viel langsamer regeneriert als Coprinus niveus. Der junge Fruchtkörper bildete, wenn auch nicht reichlich, Sporen; im allgemeinen waren solche Fruchtkörper bleich und wichen stark vom Typus ab. Ich dachte selbst zuerst nicht, daß zwischen einem normalen Hut und einem solchen, der auf einen anderen, einer fremden Spezies angehörigen Unterlage gewachsenen Hute sich andere Unterschiede fänden, als etwa solche, die durch Wachstumshemmung oder Nahrungsmangel zu erklären wären. Trotzdem aber fanden sich Eigentümlichkeiten, die es wahrscheinlich machten, daß die Unterlage auf das Reis eingewirkt hatte. Der Hut von Coprinus niveus ist bei natürlichem Wuchse elliptisch und mit einem weißen flockigen Überzug bedeckt. Entwickelte sich der Fruchtkörper als Reis auf Coprinus fimetarius, so war der Hut nur halb so lang als normal und nur schwach mit dem flockigen Überzug bedeckt, am meisten noch an der Spitze; er war auch spitzer und deutlich gestreift (Fig. 15, Mittelstück).

Diese Veränderungen sind umso mehr überraschend, als anscheinend die Elemente des Hutes schon vorher angelegt waren, wenn auch in ganz

rudimentärem Zustande. Offenbar war noch nachträglich durch dazwischen wachsende Hyphen einer anderen Art der Charakter etwas beeinflußt worden. Es blieb nun noch übrig, zu untersuchen, wie die Verwachsungszone der Gewebe der beiden Arten regeneriert, wenn der Hut entfernt wird. Ich wählte also junge, kräftig wachsende Fruchtkörper von Coprinus fimetarius var. macrorrhiza aus, die jungen Hüte wurden sorgfältig weggeschnitten und auf diese Unterlage dann junge Früchte von Coprinus niveus gesetzt. Als der Hut eine Entwicklung zeigte und größer wurde, wurde er durch einen schräg geführten Schnitt entfernt, der auch einen kleinen Teil der Unterlage freilegte; in anderen Fällen ließ ich, gleichfalls bei schrägem Schnitte, noch eine dünne Schicht über der Verwachsungslinie zurück.



Fig. 15. Coprinus niveus und Coprinus fimetarius var. macrorrhiza. Links: C. niveus normal; Mitte: Pfropfung einer jungen Anlage von C. niveus auf C. fimetarius var. macrorrhiza; rechts: Regeneration aus der Verwachsungsstelle einer solchen Pfropfung.

Von etwa 12 so behandelten Pfropfungen regenerierte die Hälfte überhaupt nicht, einige regenerierten zum Teil ohne Bildung eines Fruchtkörpers, einer regenerierte und bildete einen kleinen typischen Fruchtkörper von Coprinus niveus, und zwar war dies merkwürdigerweise eine Pfropfung, wo durch den Schnitt Reis und Unterlage freigelegt worden waren. Unter den übrigen trat die Regeneration ein (wie das rechte Stück von Figur 15 zeigt), wo über der Verwachsungsstelle noch etwa 3 mm des Reises stehen gelassen wurden (der Schnitt war hier horizontal geführt worden).

Das Regenerationsprodukt wuchs kräftig und reifte in sehr kurzer Zeit, wobei der Fruchtkörper keinerlei Anzeichen von ungenügender Ernährung aufwies, und die normale Menge von Sporen zu erzeugen schien. Ein Vergleich dieses Fruchtkörpers mit dem typischen Hut von Coprinus niveus (links in Fig. 15) ergab mehrere Eigentümlichkeiten, welche keiner der beiden verwendeten Spezies angehören. Der Habitus gehört der Unterlage an (Fig. 21), ist aber kürzer und nicht so deutlich kegelförmig, der Rand ist nicht so ausgebuchtet wie im typischen

Hut der Unterlage von Coprinus fimetarius var. macrorrhiza, aber dicht bedeckt mit weißen flockigen Schuppen, während Coprinus niveus mit Flaum bedeckt ist. Andererseits zeigte der Hut keinerlei Neigung, sich zu spalten, wie dies für Coprinus fimetarius var. macrorrhiza charakteristisch ist; die Lamellen zeigten Neigung mit dem Stiel in Verbindung zu treten, während sie am Pilze der Unterlage frei sind, die Sporen zeigten große Differenz in ihrer Größe von 12—16 und 7 bis 11 μ. Die Sporen beider verwendeten Arten zeigen keine solche Schwankung in ihrer Größe;

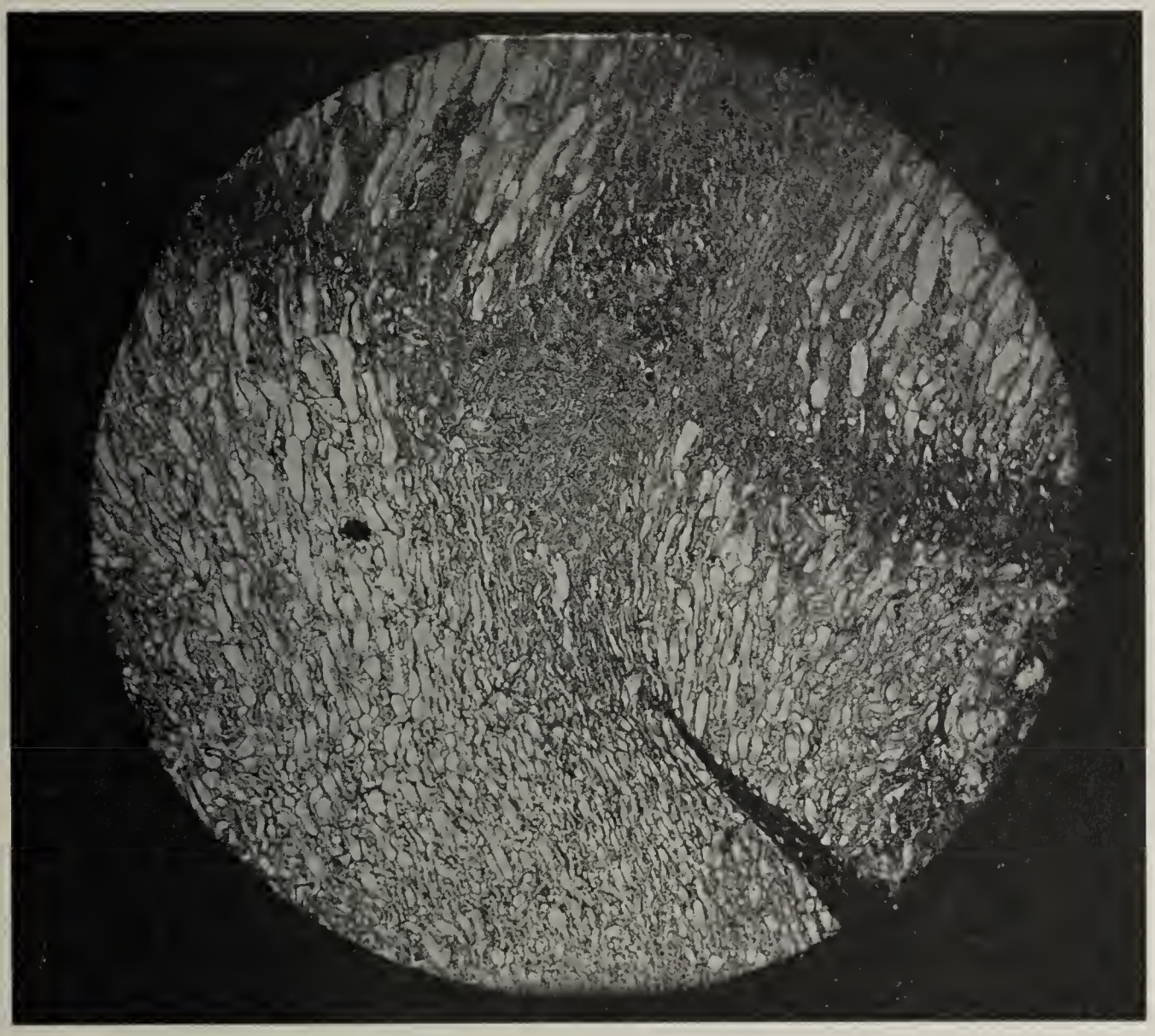


Fig. 16. Längsschnitt durch die Pfropfungsstelle von Coprinus niveus auf Coprinus fimetarius var. macrorrhiza.

der Stiel war sehr weich und weiß, während er bei Coprinus niveus in gewissen Stadien mit feinen Haaren bedeckt ist, ebenso bei Coprinus fimetarius var. macrorrhiza. Der Habitus des ganzen Fruchtkörpers glich mehr dem von Coprinus fimetarius var. macrorrhiza als dem von Coprinus niveus, mit Ausnahme des glatten Randes und des glockenförmigen Hutes. Ein weiterer interessanter Punkt war, daß, obgleich die Kultur in starkem Licht gewachsen war, sie doch keinerlei heliotropische Eigen-

schaften zeigte, was einen Einfluß der als Unterlage dienenden Art anzeigt, die nicht heliotropisch empfindlich ist. Obiges Resultat überrascht umsomehr, wenn man die Tatsache bedenkt, daß das Reis Coprinus niveus war; es ist kaum möglich, daß die Hyphen der Unterlage durch das Reis hindurchwuchsen und den Hauptteil des Regenerationsproduktes darstellten, da in sehr kurzer Zeit das Reis regenerierte, anfangs nur langsam — später wuchs das Regenerat schneller, was vielleicht einen Einfluß der Unterlage auf das regenerierende Reis anzeigt.



Fig. 17. Verschmelzung von Hyphen dicht über der Verwachsungszone einer Pfropfung von Coprinus niveus auf Coprinus fimetarius var. macrorrhiza. (Fig. 15 rechts.)

Sobald die Sporen reiften, behandelte ich das Material in der gewohnten Weise, um es mit dem Mikrotom zu schneiden. Die alten Zellen von Unterlage und Reis waren fast gänzlich überwuchert durch das kräftige Wachstum neuer Hyphen (Fig. 16). Da kein Unterschied bestand zwischen der Größe der alten Zellen und den Zellen der neuen Hyphen beider Arten, ließ sich der Ursprung dieses Hyphensystems schwer ermitteln; doch waren Zellkombinationen (Fig. 17) nicht nur über der Pfropfungsstelle in den Geweben des Reises bemerkbar, sondern oberhalb der Pfropfungszone waren junge Hyphen, welche aus alten Zellen entstanden, in ihren Wänden oft aufgelöst und der Inhalt war in die Nachbarzelle eingetreten. Diese Hyphen besaßen den Charakter gewöhnlicher Hyphen, ohne denen der oben besprochenen Milchgefäße zu gleichen. Die Hyphen-Enden verschmolzen häufiger miteinander mit dem Resultate, daß fast immer die eine leer wurde. Da bei Coprinus-Arten Zellverschmelzungen vorkommen, ist es wohl möglich, daß auch hier derartige Verbindungen auftraten und der entstehende Fruchtkörper kann so sehr wohl in seiner Entwicklung beeinflußt worden sein, wenn nicht

in der Sporenerzeugung, so doch in den vegetabilen Teilen. Für die Erzeugung der Sporen wird wohl das Reis allein von Bedeutung sein.

Diese Ansicht erfuhr eine Bestätigung in den Fruchtkörpern, welche sich aus den Sporen des der Pfropfung entstammenden Fruchtkörpers entwickelt hatten. Sie keimten leicht und bildeten nach zwei Wochen Früchte, die ganz den typischen von Coprinus niveus glichen (Fig. 18), auch in der nächsten Generation war dies der Fall. Es scheint so, daß die Sporen nicht beeinflußt werden können, sondern nur der allgemeine Bau des Fruchtkörpers. Die Versuche an Coprinus-Arten wurden nicht fortgestzt.

Ähnliche Versuche mit anderen Agaricineen lieferten weniger gute Resultate. Eine Pfropfungszone zwischen Polyporus brumalis und



Fig. 18. Normale Fruchtkörper aus Sporen des Pilzes Fig. 15 rechts.

einer anderen kurzgestielten Art regenerierte leicht und bildete einen langen Stiel, aber keinen Hut.

Auf einem Baumstumpf, auf dem Stereum hirsutum und Stereum purpureum in Massen zusammenwuchsen, fand ich, daß die Fruchtkörper beider Arten miteinander verwachsen waren; ich trennte nun Stereum hirsutum vom Substrat ab, so daß sein Fruchtkörper nur mehr mit dem von Stereum purpureum in Verbindung blieb. Er wuchs in dieser Lage gut weiter, wie ein Parasit; Nahrung konnte ihm nur von Stereum purpureum zukommen. Es brachte mich diese Beobachtung auf den Gedanken, auch ungestielte Arten aufeinander zu pfropfen.

Eine Anzahl Versuche wurden mit Polyporus-, Trametes- und Fomes-Arten gemacht. Die Fruchtkörper wurden auf ihrem Substrat

gelassen, angeschnitten und so gestellt, daß die frischen Schnittflächen zusammenwachsen konnten. Als dies eingetreten war, wurde der eine vom Substrate abgeschnitten und auf dem anderen gelassen; es ist dies dieselbe Methode, die ich auch bei den Versuchen über Polarität anwendete. Obgleich ich in vielen Fällen bei Anwendung von nahe verwandten Arten Erfolg hatte, schien die Verbindung doch stets nur ein Parasitismus zu sein, und nicht eine absolute Vereinigung. Wenn also irgend ein Einfluß bestünde, könnte er erst nach monate- oder jahrelangem Wachstum wahrgenommen werden. Es war merkwürdig, daß nur Arten von Trametes, Fomes und Polyporus verwuchsen, welche einander ähnlich waren in Farbe, Wachstum, Zähigkeit usw. Trametes suaveolus wuchs nicht auf Trametes Pini — Trametes Pini nicht auf Fomes applanatus usw. Es schien, daß entweder infolge einer Differenzierung der Wachstumsgeschwindigkeit oder des chemischen Inhalts die Spezies in gewissem Sinne widerstrebten.

Obgleich diese harten und holzigen Formen sehr schnell regenerierten, bedürfen derartige Untersuchungen doch sehr langer Zeit, und es wird auch dann nur der eine Pilz als Parasit auf dem anderen weiter wachsen.

Die hier mitgeteilten Untersuchungen über Pfropfungen stellen nur vorläufige Versuche dar, doch möchte ich später bei längerer Dauer derselben noch eingehender auf diese interessanten Verhältnisse und besonders auf die Möglichkeiten gegenseitiger Beeinflussung der beiden Pfropfstücke zu sprechen kommen.

Coprinus fimetarius var. macrorrhiza.

Da dieser Pilz in seiner Entwicklung und seinen Beziehungen zum Licht von dem Verhalten anderer Coprinus-Arten bedeutend abweicht, mag es berechtigt sein, ihm einen eigenen Abschnitt zu widmen.

Wie schon erwähnt, besitzt er eine mächtige wurzelartige Verlängerung des Stieles, welche schon sehr frühe sich differenziert. Sporen, welche auf harte Kuchen von Kuh- und Pferdemist ausgesät und in eine feuchte Kammer gestellt worden waren, bildeten bald ein Myzel; hier ließ sich nun die Wurzelbildung gut studieren. Es begann in einem bestimmten Teil eine außerordentlich starke Verzweigung nach der Art wie wenn Coprinus stercorarius ein Sklerotium bildet. Der Knoten, der dadurch entsteht, wächst in die Größe, beginnt sich zu verlängern und verhält sich auch in den oberen und unteren Teilen verschieden, indem die Hyphen der unteren Hälfte positiv geotropisch werden. Bald nach dieser Anlage verdichten sich die Hyphen an der Unterseite in einem

Punkte und wachsen abwärts wie eine Wurzel. Es ist merkwürdig, daß die Hyphen auch hier im Substrat zu einem festen einheitlichen Gebilde vereinigt weiterwachsen, wobei sie sich immer mehr vom Lichte entfernen und offenbar die optimalen Bedingungen von Feuchtigkeit und Nährstoffen aufsuchen. Auch die Hyphen, welche bestimmt sind, später einen Fruchtkörper zu bilden, wachsen zuerst wie eine Wurzel aus. Kleine wurzelähnliche seitliche Verzweigungen finden sich nicht an jüngeren Stadien, wohl aber später; aus diesen kleinen „Seitenwurzeln" kann nie ein Fruchtkörper hervorgehen. Die erste Differenzierung eines Fruchtkörpers zeigte sich nach der Verlängerung eines huttragenden Teiles, wenn die Wurzel eine Zeitlang sich weiterentwickelt hatte und negativ geotropisch reagierte. Es ist bemerkenswert, daß diese Veränderungen in vollkommener Dunkelheit vor sich gehen. An der Grenze von Stiel und Wurzel tritt eine für junge Entwicklungsstadien charakteristische Vergrößerung auf (Fig. 21), eine Anschwellung bildend, welche bei Regenerationsversuchen sich am produktivsten zeigt. Eine Zeitlang vergrößert sie sich mit dem Wachstum des Fruchtkörpers, später aber, zur Zeit der Sporenreife, hat dieser Teil an Größe wieder stark abgenommen, und seinen Inhalt offenbar zur Entwicklung des Hutes und der Sporen abgegeben.

Die Wachstumsrichtung der Wurzel geht bei gleichzeitiger Beschaffenheit des Substrates senkrecht abwärts, harten Körpern weicht sie durch seitliche Krümmung aus. Die Länge schwankt zwischen 18 bis 20 cm und erreicht sogar noch höhere Werte.

Merkwürdig verhielten sich Dunkelkulturen auf hartem Mist. Das Myzel breitete sich auf der Oberfläche aus, und obwohl eine Wurzel nicht ins Substrat einzudringen vermochte, unterblieb doch deren Bildung nicht; sie wuchs horizontal über das Substrat hin und erlangte 1—4 cm Länge, ohne anscheinend einen Fruchtkörper zu bilden. Später jedoch krümmte sich die Spitze des Wurzelteiles schwach aufwärts und bildete die charakteristische Anschwellung, welche einen Fruchtkörper anzeigt; das Längenwachstum hörte nun auf, es kamen Hut und Stiel zur Entwicklung, sie wuchsen sehr schnell und auch Sporen wurden erzeugt. Die Fruchtkörper derartiger Kulturen blieben unter normaler Größe und waren bleich an Farbe; ohne Zweifel war dies eine Folge von Nahrungsmangel, da die Wurzel nicht ins Substrat eingedrungen war und keine Stoffe aufnehmen konnte, was offenbar ein Teil ihrer Funktionen ist. Wichtig dagegen ist die Tatsache, daß ohne Licht überhaupt der Hut zur Sporenreife kam; es liegt hier eine Ausnahme von der allgemeinen Regel vor, daß für Coprinus das Licht notwendig ist.

Es scheint, daß man bei der Gattung Coprinus eine Reihe verschiedener Formen aufstellen kann mit entsprechenden Verschiedenheiten in ihren Beziehungen zum Licht, von den schnell reifenden, wenig differenzierten Formen angefangen bis zu solchen mit hoher Differenzierung. Z. B. bei Coprinus niveus, Coprinus nycthemerus; hier bleiben die Mycelien bei Dunkelheit völlig steril, es werden gar keine Fruchtkörper angelegt. Bei Coprinus stercorarius, Coprinus plicatilis, Coprinus ephemerus werden im Dunkeln zwar Früchte angelegt, kommen aber nicht zur Reife. Coprinus logopus und Coprinus fimetarius var. macrorrhiza werden zwar vom Lichte beeinflußt, erzeugen aber auch im Dunkeln Sporen.

Auf die Entwicklung des Wurzelteiles wirkt das Licht direkt nachteilig ein. Sporen, welche auf einer sehr dünnen Schicht fein pulverisierten Mistes ausgesät und auf einer Glasplatte von oben und unten stark beleuchtet wurden, entwickeln sich nur kümmerlich, es wurden nur sehr wenige und dann nur schwache Fruchtkörper gebildet; die Wurzel war rudimentär geblieben, was anzeigte, daß die Hutbildung an eine entsprechende vorherige Entwicklung des Wurzelteiles gebunden ist, und daß diese im Lichte unterbleibt. Es wurden nun zwei Kulturen gemacht, Nr. 1 im Licht, Nr. 2 im Dunkeln; in Nr. 2 erschienen zahlreiche Früchte, in Nr. 1 sehr wenige; die Lichtkultur besaß auch keine Wurzeln, während im Dunkeln diese ganz normal gewachsen waren. Die Kulturen wurden nun vertauscht, Nr. 1 ins Dunkle und Nr. 2 in Licht gebracht. Nach einigen Tagen erschienen neue kräftige Anlagen in Nr. 1, die vorher beleuchteten Anlagen dagegen entwickelten sich überhaupt nicht normal. Augenscheinlich kann sich, wenn der Fruchtkörper einmal ganz differenziert ist, die Wurzel nicht mehr weiter entwickeln und da sie der Teil ist, durch den die Nahrung aufgenommen wird, kann ohne ihre Entwicklung auch kein normaler Fruchtkörper gebildet werden. Die nun neugebildeten Fruchtkörper von Nr. 1 hatten die charakteristische Wurzel entwickelt; in Nr. 2 war nun das Resultat ganz dasselbe. Die Versuche zeigen eindeutig den negativ heliotropen Charakter der Wurzel; da aber die normale Entwicklung einem Fruchtkörpers an die entsprechende Ausbildung der Wurzel gebunden ist, scheint es sehr wahrscheinlich, daß bei dieser Art das Optimum für die Entwicklung des Hutes nicht so sehr vom Lichte abhängt wie sonst. Bei Licht- und Dunkelkultur erlangen die kleinen Hüte stets Sporenreife, doch immer nur diejenigen mit langen Wurzeln. Beobachtungen in der Natur mögen hier von Interesse sein. Misthaufen waren oft ganz bedeckt von reifen Früchten, die ihre Hüte herausstreckten. Ich grub etwa 2—3 Fuß tief in den Misthaufen und fand hier nun

völlig reife Früchte vor; bei dieser Tiefe ist es wohl kaum möglich, daß das Licht in den Mist eingedrungen ist. Hut, Stiel und Wurzel waren oft, infolge der geringen Größe der Höhlungen, in denen sie wuchsen, gekrümmt. Es ist wohl möglich, daß das Bestreben des Hutes vom Miste weg ans Licht zu kommen, weniger wichtig ist bezüglich des Lichtes, sondern mehr dazu dient, den Hut frei zu stellen und die Sporen ausstreuen zu können; denn reife Sporen finden wir bei Lichtkultur und Dunkelkultur. Vielleicht hat diese Art infolge ihres Wachstums im Misthaufen die Abhängigkeit vom Lichte etwas verloren, ebenso wie Kulturen der Champignons. Die jungen Fruchtkörper zeigten nie ein deutliches Anzeichen von positivem Heliotropismus.



Fig. 19. Regeneration aus dem Innern einer „Wurzel“ (im Dunkeln).

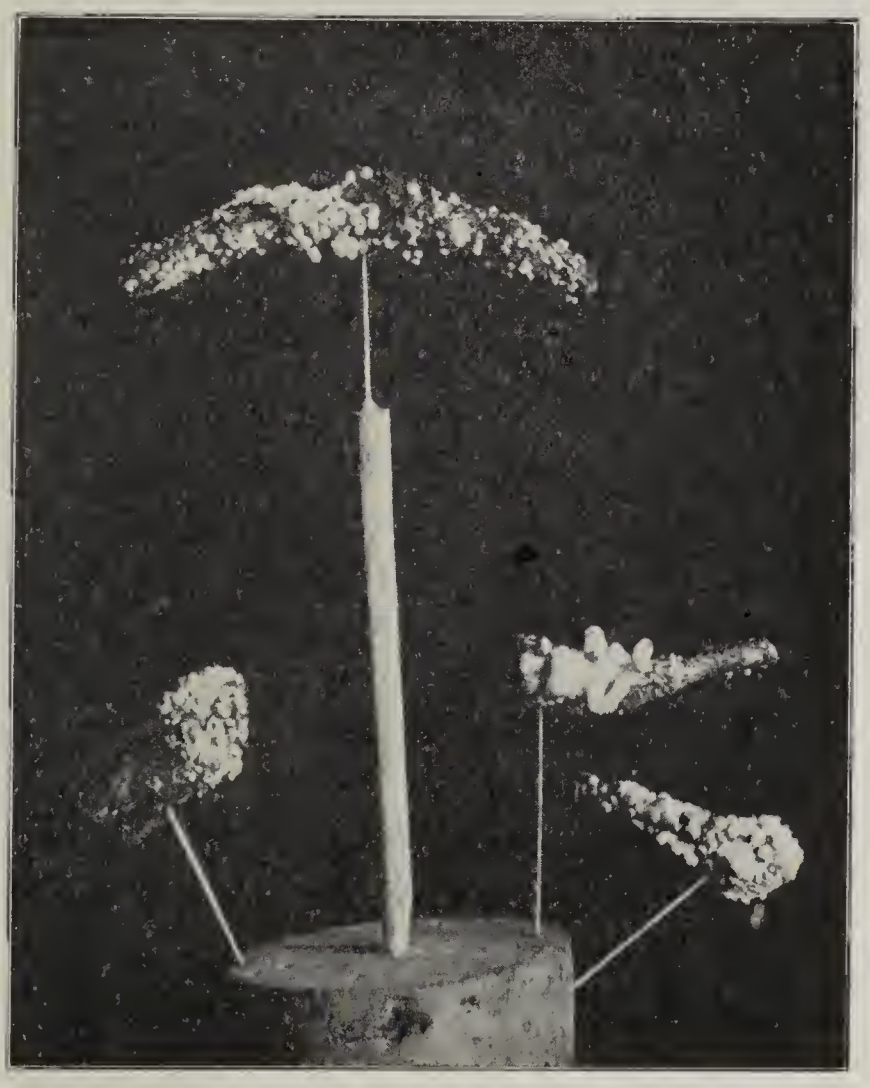


Fig. 20. Regeneration aus der „Wurzel“, zeigt die Bevorzugung der Anschwellung an der Grenze von Stiel und Wurzel.

Regeneration und Licht: Wie anzunehmen, ist das Licht zu Regenerationen an der Wurzel nicht notwendig. Sie ist positiv geotropisch und muß zur Ausübung ihrer Funktion vom Lichte wegwachsen. Wurzeln, welche langgewachsene Fruchtkörper gebildet hatten, wurden in Stücke geschnitten und auf Mist in Glasschalen ins Dunkle gebracht; nach kurzer Zeit waren die Stücke ganz bedeckt mit jungen Neuanlagen, manchmal so dicht, daß die alte Wurzeloberfläche nicht mehr zu sehen war und ganz weiß erschien (Fig. 20). Die Neubildungen erschienen auf der ganzen Oberfläche, doch zeigte sich der Zahl nach eine Bevorzugung

der Grenze von Wurzel und Stiel. Verdunkelt man derartige Wurzelstücke einseitig, so erscheinen alle Regenerate auf der dem Licht abgekehrten Seite. Dasselbe Resultat erhält man, wenn man Stücke bei Licht horizontal auf Mist auslegt und diesen etwas andrückt. Es war nach einiger Zeit die Unterseite ganz bedeckt mit jungen Fruchtanlagen, d. h. mit Wurzelanlagen, welche bestimmt waren, nachher zu Früchten auszuwachsen. Diese jungen Fruchtanlagen wuchsen in den Mist hinein; vielleicht würden sie sich später nach der Oberfläche emporkrümmen, um den Hut an einer freien Oberfläche zu entwickeln. Es ließ sich auch beobachten, daß manchmal eine Wurzelregeneration sitzende Fruchtkörper bildete ohne eine Wurzel zu bilden; doch war dies sehr selten der Fall und kam nie vor, wenn die Früchte aus einem Myzel stammten, das aus Sporen gezogen war. Ein weiteres Beispiel für die Bevorzugung von nicht belichteten Teilen bei der Regeneration liefert folgender Fall: Eine Wurzel, welche am Fenster lag, hatte auf der Unterseite reichlich neue Anlagen gebildet; ich schnitt sie der Länge nach durch und fand hier einen Hohlraum vor, der ganz gefüllt war mit jungen Früchten, welche in gänzlicher Dunkelheit sich entwickelt hatten (Fig. 19).

Regenerationsfähigkeit der Wurzel.

Ich ließ zuerst einige Wurzelregenerate bilden und entfernte dann die zu Dutzenden angelegten Neubildungen; sie regenerierten wieder, es wurde abermals eine Schicht entfernt; es fand weitere Regeneration statt, so daß anscheinend diese an keine bestimmte Zone gebunden ist. Doch findet sich eine deutliche Differenzierung der Gewebe vor, in drei Zellarten. Die Außenschicht besteht aus kleinen dickwandigen Zellen, die fest aneinanderschließen und Farbstoffe, aber auch reichlich Protoplasma enthalten. Die Zellen der Zentralzone sind groß, unregelmäßig, plasmaarm, ohne Kerne und funktionieren offenbar als Speicherzellen, da weißer Hyalininhalt sich hier vorfindet. Zwischen den großen Zellen liegen eine Menge kleiner Hyphen, die anscheinend aus älteren Zellen stammen und aus ihnen reichen Plasmainhalt bekommen. Diese kleinen Hyphen verursachen besonders die schnelle Regeneration der Wurzeln. An jüngeren Wurzeln ist die Differenzierung nicht so stark, so daß alle Hyphen noch regenerationsfähig sind. Die Menge von Stoffen, welche in diesen Wurzeln aufgespeichert liegen, muß sehr groß sein. Die erste Reihe von Neuanlagen wurde weggebrochen, nach einigen Tagen war die große Wurzel wieder völlig bedeckt; auch eine dritte Reihe erschien usw., bis die Wurzel fünfmal regeneriert hatte. Die Zahl der Regenerationsprodukte wurde daher immer geringer, die Wurzel selbst aber immer

kleiner, bis sie ganz zusammengeschrumpft war; ihre Hyphen waren schlaff geworden und ohne Plasmagehalt und Nährstoffe.

Offenbar müssen wir in dieser Wurzel einen Typus von Sklerotiumbildung erblicken, ein Speicherorgan, das zugleich auch der vegetativen Vermehrung des Pilzes dient. Es scheint, daß die Wurzel auch bis zu einem gewissen Grade austrocknen kann, ohne dadurch ihre Regenerationsfähigkeit zu verlieren. Die gleiche Art von Wurzelbildung findet auch bei den seitlich entstehenden Anlagen statt, auch hier wächst die Neubildung stark in die Länge, um später Hut und Wurzel zu bilden. In Natur findet es sich häufig, daß zur gleichen Zeit, wenn der Fruchtkörper gebildet wird, auch unten eine Regeneration auftritt, so daß, während der erste Hauptfruchtkörper in Reife ist, andere Früchte in allen Wachstumsstadien stehen; wenn die Bedingungen günstig sind, erlangt die zweite Wurzel gleiche Größe wie die erste und vermag ihrerseits wieder neue Anlagen zu bilden. Dieser Vorgang kann so lange dauern, als die Mutterwurzel genug Stoffe liefert, so daß, lange nachdem der erste Fruchtkörper seine Sporen ausgestreut hat, doch noch eine vegetative Weitervermehrung stattfindet (Fig. 21).

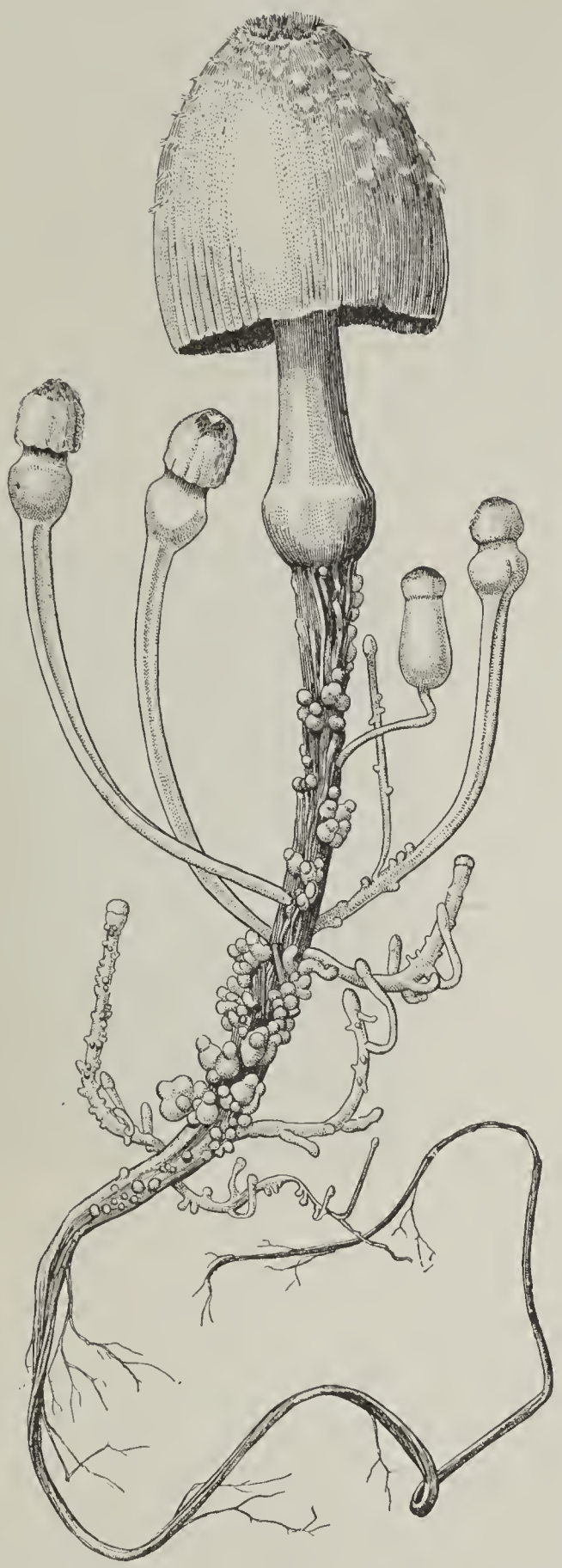


Fig. 21. Coprinus fimetarius var. macrorrhiza. Habitus; Regeneration aus der alten Mutterwurzel und weitere Regeneration aus den Wurzelteilen der seitlichen Fruchtkörper.

Ich führte nun in der Natur noch weitere Versuche aus, indem ich Wurzelstücke 7—20 cm tief in Misthaufen eingrub. Diese Stücke entsandten Hüte an die Oberfläche, oder, wenn sie diese nicht erreichten, bil-

deten sie Hüte im Innern. Während die Wurzel positiv geotropisch ist, scheint die den Fruchtkörper tragende Spitze negativ geotropisch zu sein. Für den Pilz ist diese verschiedene Reaktion von Bedeutung, da bei einer Entwicklung im Miste die Hüte nach außen emporgehoben werden und ihre Sporen frei ausstreuen können.

Dies wird auch immer bei Hutbildung an Wurzelregeneration der Fall sein, da hier nur in einer Richtung eine Streckung möglich ist, so daß das huttragende Ende immer mehr nach der Oberfläche emporgeschoben wird.

Auch Regenerationen am Stiel zeigten deutlich eine Bevorzugung der Dunkelseite, was auffallend ist, da der Stiel die Aufgabe hat, den Hut an die Oberfläche des Mistes zu bringen. Das Bild (Fig. 22) zeigt



Fig. 22. Regeneration aus dem Stiel auf der verdunkelten Seite.

einen Stiel, der auf der einen Seite verdunkelt, auf der anderen beleuchtet war; die verdunkelte Seite ist ganz mit jungen Fruchtanlagen bedeckt.

Wir haben offenbar einen Pilz vor uns, der durchgehends das Licht zu vermeiden sucht.

Zusammenfassung.

1. Enzyme. Die Verflüssigung der Hüte bei Coprinus ist eine Art von Selbstverdauung, die gänzlich unabhängig von der Mitwirkung von Bakterien vor sich geht. Außerdem gelang es noch eine Reihe anderer Enzyme nachzuweisen, deren Vorkommen bei den verschiedenen Arten meist in engem Zusammenhang steht mit der Beschaffenheit des Sub-

strates, auf dem die einzelnen Arten gedeihen. Die Untersuchung bezüglich proteolytischer Enzyme, deren Wirkung am besten beim natürlichen Säuregehalt ist, ergab, daß nicht nur der eigene Proteingehalt, sondern auch Wittepepton und Fibrin verdaut werden und zwar durch Enzyme, welche durch verschiedene Löslichkeitsverhältnisse sich leicht isolieren lassen.

2. Chitingehalt. Die Sporenwand besteht fast ausschließlich aus Chitin, mit Ausnahme des Farbstoffes, der ihre schwarze Farbe bedingt. Im Stiel findet sich Chitin mehr in den äußeren Teilen als im Zentrum. Im Hut kommt Chitin gleichfalls, besonders in der Außenschicht vor, während die Lamellen offenbar zur Hauptsache aus anderen Stoffen bestehen; wahrscheinlich hängt damit auch die Tatsache zusammen, daß die Lamellen leichter zerfließen als der periphere Teil.

3. Regeneration. Im allgemeinen kann jeder Teil von Hut und Stiel einen neuen Fruchtkörper bilden, doch ist die Regenerationsfähigkeit der einzelnen Teile verschieden groß; sie hängt besonders ab vom Alterszustand, dem chemischen Inhalt und der morphologischen Beschaffenheit.

4. In anatomischer Hinsicht ließ sich neben der Differenzierung in zentrales Leitungsgewebe und mechanisches Gewebe noch ein System verzweigter Hyphen, das sogenannte Milchgefäßsystem, auffinden.

5. Bei allen Arten fand ich eine mehr oder weniger stark ausgesprochene Polarität, welche bei Regenerationsversuchen, besonders in einer höheren Regenerationsfähigkeit der dem Substrat abgekehrten Seite zum Ausdruck kam, sowohl bei gestielten als auch ungestielten Formen; es wurden außer Coprinus auch noch Polyporeen untersucht, welche dieselbe Eigentümlickeit besitzen.

6. Pfropfungsversuche ergaben fast stets ein günstiges Resultat; in gewissen Fällen scheint auch eine gegenseitige Beeinflussung beider Pfropfstücke, wenigstens in habitueller Beziehung, möglich zu sein. Bei holzbewohnenden Arten wie Fomes, Trametes, Polyporus, Stereum usw. scheint eine Art von gegenseitigem Parasitismus vorzukommen.

7. Eigentümliche biologische Verhältnisse besitzt Coprinus fimetarius var. macrorrhiza, der ein positiv-geotropisches, wurzelähnliches Sklerotium besitzt von außerordentlicher Regenerationsfähigkeit und auch durch seine Indifferenz dem Lichte gegenüber eine Ausnahme in der Gattung Coprinus bildet.

Außer diesen Untersuchungen habe ich noch eine Reihe anderer angestellt über den Einfluß von äußeren Bedingungen, wie Licht, Feuchtigkeit, Schwerkraft usw. auf das Wachstum und die Formbildung höherer Basidiomyceten, welche in weiteren Mitteilungen folgen sollen.

Die Arbeit wurde ausgeführt im pflanzenphysiologischen Institut zu München, dessen Leiter, Herrn Geheimrat Prof. Dr. von Goebel ich an dieser Stelle für seine liebenswürdige Unterstützung und reichliche Anregung meinen ergebensten Dank sagen möchte; ebenso möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Oskar Loew für seine vielen Bemühungen und seinen freundlichen Rat in chemischen Fragen meinen besten Dank aussprechen.

Literaturverzeichnis.

Brefeld, Untersuchung über Schimmelpilze, Heft 3, 1877.
Buller, Researches on Fungi.
Ders., The Enzymes and Polyporus squamosus. Annals of Botany 1906, Vol. II.
Elfving, Studien über die Einwirkung des Lichtes auf die Pilze.
Green-Windisch, Die Enzyme.
Massee, A Revision and the Genus Coprinus. Annals of Botany, Vol. X.
Vines, Tryptophane in Proteolysis. Ibid. 1902, Vol. XVI.
Ders., The Proteases and Plants. Ibid. 1904, Vol. XVIII.
Zellner, Chemie der höheren Pilze.
