

39. ROBERTS, I. W., and LESLIE PIERCE: Apple scab. U. S. Farmers' Bull. 1478 (1926).
40. SALMON, F. S.: Apple scab, its incidence and control. Ann. Appl. Biology 17 (1930).
41. SORAUER, P.: Handbuch der Pflanzenkrankheiten, Bd. II. Die pflanzlichen Parasiten, I. Teil. 5. Aufl. Berlin 1928.
42. SCHNEIDERHAN, F. J.: Rainfall in relation to ascospore discharge and infection in *Venturia inaequalis*. Phytopathology 15 (1925).
43. VOGES, E.: Über die Schorfkrankheit der Obstbäume. Dtsch. landw. Presse 34 (1907).
44. VOGES, E.: Die Bekämpfung des Fusicladium. Z. Pflanzenkrkh. 20 (1910).
45. VOGES, E.: Zum Parasitismus von Nectria und Fusicladium. Bakt. Zentralbl. II. Abt. 32 (1912).
46. WALLACE, E.: Apple scab infection as correlated with maturity of ascospores, weather conditions and development of fruit buds. Phytopathology 2 (1912).
47. WETTSTEIN, R. v.: Handbuch der systematischen Botanik. 3. Aufl. Wien 1924.
48. WIESMANN, R.: Untersuchungen über Apfel- und Birnschorfpilz *Fusicladium dendriticum* FCKL. (WALLR.) und *Fusicladium pirinum* LIB., sowie die Schorfanfälligkeit einzelner Apfel- und Birnsorten. Landw. Jb. Schweiz 35 (1931).
49. WIESMANN, R.: Untersuchungen über die Überwinterung des Apfelschorfpilzes *Fusicladium dendriticum* (WALLR.) FCKL. im toten Blatt sowie die Ausbreitung der Sommersporen (Conidien) des Apfelschorfpilzes. Landw. Jb. Schweiz 1932.
50. WILSON, E. E.: Studies of the development of the ascigerous stage of *Venturia inaequalis* (CKE.) WINT. in relation to certain factors of the environment. Phytopathology 18 (1928).
51. WILTSHIRE, S. P.: Infection and immunity studies on apple and pear scab fungi (*Venturia inaequalis* and *V. pirina*). Ann. appl. Biol. 1 (1915).

(Aus dem Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität Halle a. S.)

Haploide Linien von *Ustilago tritici*.¹

Von **Clyde Christensen**.

Die Schaffung neuer, „künstlicher“ Rassen eines parasitischen Pilzes durch die Kombination haploider Linien, wie sie von STAKMAN und CHRISTENSEN (9) mit *Ustilago zaeae* zuerst durchgeführt worden ist, hat sich als gelegentlich wertvoll gezeigt bei der Züchtung von krankheitsimmunen und -widerstandsfähigen Kulturpflanzen, worauf schon ROEMER (8) und NICOLAISEN (5) hingewiesen haben. Die Auswertung der theoretischen Erkenntnisse für die praktische Züchtungsarbeit ist auch von NICOLAISEN in seiner letzten Veröffentlichung über *Ustilago avenae* eingehend auseinandergesetzt worden.

Um wenigstens einen Anfang in dieser Richtung bei *U. tritici* zu machen, versuchte der Verfasser, haploide Linien zu isolieren und Blüteninfektion mit Mycel auszuführen. Zu diesem Zwecke wurden die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche durchgeführt.

Daß sich die vier Promycelzellen der keimenden Spore bei *U. tritici* in wenigstens zwei Geschlechtsgruppen teilen lassen, ist schon vor Jahren von RAWITSCHER (7) und KNIEP (4) ziemlich deutlich bewiesen worden, doch wurde es von RAWITSCHER damals als Geschlechtserscheinung nicht gleich erkannt. Die vorliegende Arbeit setzt sich das Ziel, diese Geschlechtsgruppen voneinander zu trennen und wieder nach Belieben zu kombinieren, um in dieser Weise neue Kombinationen innerhalb

der verschiedenen Rassen und zwischen diesen schaffen zu können.

Wie von BREFELD (1) bereits im letzten Jahrhundert sowohl bei *U. nuda* var. *hordei* wie bei *U. nuda* var. *tritici* gezeigt worden ist, wachsen von den vier Promycelzellen Keimschläuche aus, im Gegensatz zu *U. avenae*, wo von den Promycelzellen sukzessive Sporidien abgeschnürt werden. Nach HÜTTIG (3) sollen die keimenden Sporen von *U. tritici* unter besonderen Verhältnissen Sporidien anstatt Keimschläuche auf dem Promycel bilden. Da es dem Verfasser in wiederholten Versuchen durch Variation von Temperatur, p_H des Nährbodens und Konzentration von Agar und Nährstoffen nicht gelang, diese erwünschte Sporidienbildung herbeizuführen, blieb zunächst nichts anderes übrig als der Versuch, die Keimschläuche abzuschneiden, um haploide Linien zu erhalten.

Einzelne Sporen wurden auf hängenden Agartropfen auf Deckgläschen zur Keimung gebracht. Nachdem Keimschläuche gebildet worden waren, wurde das Promycel zwischen den Keimschläuchen durchgeschnitten. Um das Promycel gut abzuschneiden zu können, mußte der Agartropfen erst etwas (nicht ganz) austrocknen, damit der Nährboden etwas fester wurde. Dann wurde das Promycel mit einem Mikromesser durchgeschnitten. Die abgeschnittenen Keimschläuche wurden sofort auf dem Agartropfen voneinander getrennt, nachdem ein Wassertröpfchen dem Agar hinzugefügt worden war, um diese Trennung zu erleichtern. Sobald

¹ Verfasser führte diese Arbeit im Jahre 1932/33 an diesem Institut während seines Aufenthaltes als Austauschassistent durch.

sie weiterwuchsen, wurden sie in Reagensgläser übertragen. Das Isolieren der Sporen und Abschneiden der Keimschläuche wurde mit einem von dem Verfasser selbst aus einem alten Mikroskop und mehreren Glasnadeln gebauten Apparat durchgeführt.

Es war von vornherein nicht anzunehmen, daß man die vier Keimschläuche immer einfach der Reihe nach abschneiden und sie in wachstumfähigem Zustand erhalten konnte. Ob es an dem Apparat oder an dem Pilze lag, ist nicht ohne weiteres zu sagen, aber die abgeschnittenen

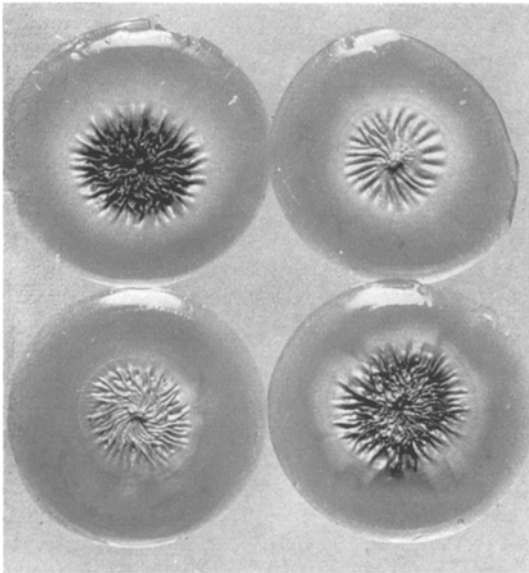


Abb. 1. Vier haploide Kulturen einer einzelnen Spore der *U. tritici*. Auf 1,5% Biomalzagar. Etwa acht Wochen alt.

Keimschläuche gingen sehr häufig sogleich zugrunde. Wahrscheinlich sind sie in diesem jugendlichen Stadium jeder mechanischen Störung gegenüber sehr empfindlich.

Keimschläuche, die abgeschnitten worden waren, wenn sie nur zwei bis drei Zellen ausgebildet hatten, gingen beinahe ohne Ausnahme sofort zugrunde. Und gewöhnlich war es so, daß schon, ehe die Keimschläuche drei bis vier Zellen gebildet hatten, sie bereits etwas durcheinander gewachsen und mitunter wahrscheinlich miteinander verschmolzen waren, daß es unmöglich war, die einzelnen Schläuche mit Sicherheit abzuschneiden.

Mit Rücksicht auf diese Tatsache wurde wie folgt verfahren: die zweiten und dritten Keimschläuche wurden durch mehrmaliges Durchschneiden mittels des Mikromessers vernichtet, das Promycel zwischen den beiden vernichteten

Keimschläuchen durchgeschnitten und die zwei Teile getrennt. Also zwei Keimschläuche, der erste und der vierte, blieben bestehen, oder drei Keimschläuche wurden vernichtet und der vierte blieb erhalten. Das Promycel wurde nicht von der Spore abgeschnitten; obwohl bekannt ist, daß eine Spore zwei Promycelien austreiben kann, wurde dieses unter den hier bearbeiteten Sporen nie beobachtet.

Es ist damit nicht gesagt, daß alle auf diese Weise erzielten Kulturen haploid waren. Es wurde nun nämlich der folgende Versuch gemacht: Die Kulturen wurden von Reagensgläsern in Erlenmeyerkolben oder Petrischalen übertragen, in denen sich eine dünne Wasserschicht auf dem Nährboden befand. Nach der Übertragung wurden die Kolben heftig geschüttelt, daß die eben eingepflichten Mycelstückchen im Wasser auf der Oberfläche des Nährbodens hin und her getrieben wurden. Dann blieben die Kolben bzw. Petrischalen stehen. Bei günstiger Temperatur waren binnen 10 Tagen eine Menge kleiner Kulturen zerstreut in jedem Kolben zu sehen, und zwar selten solche des Elterntyps, sondern zwei bis sechs neue Typen.

Diese neuen Typen wurden isoliert und das Verfahren wiederholt, mit dem Ergebnis, daß diesmal weniger solche Abspaltungen auftraten. Nach nochmaliger Wiederholung waren noch weniger neue Typen zu finden, und nach der dritten Wiederholung blieben eine Menge der Typen konstant. Dann wurden alle die von einer Spore abstammenden Kulturen miteinander verglichen, eine von jedem Typ beibehalten und die anderen weggeworfen.

In den oben beschriebenen Fällen, wo zwei Keimschläuche abgeschnitten worden waren, konnte man schließlich manchmal zwei bis vier Typen von jeder Spore unterscheiden. In den Fällen, wo drei Keimschläuche vernichtet worden waren, kamen fast ebenso viele Typen zum Vorschein. Dieses findet darin seine Erklärung, daß die Zellkerne in den Promycelzellen blieben, so daß die Kulturen eigentlich den Einzelsporkulturen gleich waren.

Nun wurden Einzelsporkulturen in Petrischalen hineingegeben und in der oben beschriebenen Weise behandelt, um zu sehen, ob man auf diese Weise zur Trennung der Typen innerhalb der Spore kommen konnte, ohne die Keimschläuche abzuschneiden zu müssen. Es ist dem Verfasser schon gelungen, auf diese Weise in Einzelsporkulturen verschiedene Typen zu trennen.

Auf einem etwas flüssigen Nährboden bilden manche dieser Kulturen reichlich Sporidien. Es

ist auch anzunehmen, daß die Einzelsporkulturen auch wenigstens etliche Sporidien oder sporidienähnliche Zellen am Mycel (aber nicht am Promycel) bilden, sonst trennten sich solche Typen nicht.

Herr C. C. ALLISON, Dept. Plant Pathology, University Farm, St. Paul, Minnesota, USA., hat freundlicherweise Sporidien von acht dieser Kulturen mit denen von zwei verschiedenen Geschlechtsgruppen von *Ustilago hordei* gepaart. Es kopulieren Sporidien von allen acht Kulturen von *U. tritici* mit denen von *U. hordei*, was als Beweis dafür angenommen werden darf, daß die acht Kulturen haploid sind. Vier dieser Kulturen stammen von einer Spore, bei der drei Keimschläuche abgeschnitten worden waren, alle drei wuchsen weiter; eine Kultur ließ sich nachher in zwei Typen trennen. Diese vier haploiden Kulturen sind auf Abb. 1 zu sehen. Die anderen vier Kulturen stammen von einer anderen Spore. Bei der keimenden Spore wurden drei Keimschläuche vernichtet, der vierte wuchs weiter, und später ließ sich diese Kultur in vier Typen trennen.

Es spalten noch eine Menge der Kulturen ab, doch immer wieder in dieselben Typen, als wenn man nur ein Typengemisch hatte, das sich nicht leicht trennen ließ. Aber man kommt ja doch ohne Zweifel mit dieser Methode zu konstanten Typen. Daß diese Typen Mutationen oder irgendwelche Modifikationen darstellen, scheint dem Verfasser höchst unwahrscheinlich, da dieselben Typen sehr häufig mehrmals unter den Abspaltungen ein und derselben Spore gefunden werden, und eine Spore ergibt endlich eine kleine Anzahl konstanter Typen, von denen einige, wie bereits nachgewiesen, haploid sind.

Natürlich müssen wir sichere Infektionsergebnisse abwarten, ehe wir diese Erscheinungen genau deuten können. Sie sind weniger als Beweis für eine Theorie angeführt, als einen Weg zu zeigen, auf dem vielleicht andere Forscher weitere Fortschritte erzielen können. Wenn haploide Kulturen immer wirklich so leicht zu erhalten sind, sind die Züchtungsprobleme bei Weizenflugbrand wenigstens ein wenig erleichtert. Vielleicht gilt das oben besprochene Verfahren doch nur für einige Rassen innerhalb der Art, aber das kann nur durch weitere Versuche festgestellt werden.

Infektionsversuche.

Die ersten Infektionsversuche mit Kombinationen haploider Linien wurden im Gewächs-

haus an der Sorte Peragis ausgeführt. Die Weizenpflanzen wurden im Gewächshaus unter Zuhilfenahme künstlicher Beleuchtung bis zur Blüte herangezogen. Während bis kurz nach der Blüte (Mitte April) wurden die Mycelinfektionen in die Blüte ausgeführt, und zwar in der von GENAU beschriebenen Art mit der von ihm benutzten Infektionsspritze (siehe GREVEL 2). Als Infektionsmaterial dienten haploide Linien und Kombinationen zwischen diesen. Die Kombination wurde auf die Weise hergestellt, daß die betreffenden Kulturen zerrieben, mit Wasser aufgeschwemmt und dann paarweise vermischt wurden. Die Zerreibung hat so fein zu erfolgen, daß ein Verstopfen der Kanüle der Infektionsspritze vermieden wird. Die Körner aus den infizierten Blüten wurden geerntet (Anfang Juni), wieder ausgelegt und im Gewächshause wieder bis zum Schossen bei künstlicher Beleuchtung herangezogen. Die Zeit von der Aussaat bis zum Schossen betrug etwas weniger als 8 Wochen. Sechs von dreißig Kombinationen zeigten Befall, und zwar von 10 bis 90% bei einer Durchschnittszahl von 50 zur Blüte gelangten Pflanzen. Auch eine Kombination einer Linie der Rasse 1 mit einer anderen der Rasse 2 rief auf Peragis Befall hervor. In keinem Falle wurde eine Infektion durch einzelne Linien — also durch haploides Mycel — festgestellt.

Hiermit wurde zum ersten Male gezeigt, daß es möglich ist, mit Kombinationen haploider Mycelien von *U. tritici* Befall hervorzurufen. Es können und sollen aus diesen Ergebnissen noch keine festen Schlüsse hinsichtlich der geschlechtlichen Verhältnisse beim Weizenflugbrand gezogen werden. Immerhin geht aus ihnen hervor, daß es möglich ist, zur Klärung dieser Verhältnisse auch das Infektionsexperiment zu benutzen.

Literaturverzeichnis.

1. BREFELD, O.: Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie. Heft 12. Hemi-basidii (1895).
2. GREVEL, F. K.: Pathol. Z. 2, 209—234 (1930).
3. HÜTTIG, W.: Z. Bot. 24, 529—577 (1932).
4. KNIPEP, H.: Sexualität der niederen Pflanzen. Jena: G. Fischer 1928.
5. NICOLAISEN, W.: Z. Pflanzenzücht. 19 (1933).
6. PIEKENBROCK, P.: Kühn-Arch. 15 (1927).
7. RAWITSCHER, F.: Z. Bot. 1912, 673—706.
8. ROEMER, TH.: Flora 128 (1933).
9. STAKMAN, E. C., J. CHRISTENSEN, C. J. EIDE and BJORN PETERSON: Minn. Agr. Exp. Sta. Techn. Bull. 65 (1929).