

III.

(Aus der I. medizinischen Universitäts-Klinik zu Berlin [Abteilung für Krebsforschung]. Direktor: Geh. Medizinal-Rat Prof. Dr. v. Leyden.)

Tierversuche mit Plasmodiophora brassicae und Sынchytrium taraxaci nebst Beiträgen zur Kenntnis des letzteren¹⁾.

Von

Dr. Waldemar Loewenthal.

(Hierzu Tafel II.)

Der Zusammenhang von Chytridiaceen und Plasmodiophora brassicae mit der Krebsforschung ist durchaus nicht neu, man hat im Gegenteil immer wieder gerade auf diese beiden zurückgegriffen, um, wenn man sie auch nicht direkt als Krebserreger proklamierte, so doch Analogieschlüsse aus ihnen zu ziehen. In Bezug auf die Plasmodiophora tat dies schon ihr Entdecker Woronin²⁾ im Jahre 1878; die erste mir bekannt gewordene Nennung der Chytridiaceen in diesem Zusammenhang ist von L. Pfeiffer³⁾, nach dessen Ansicht „die Lebensgeschichte von Sынchytrium taraxaci und mercurialis ein Analogon abgibt“ zum Bösartigwerden der Zellen beim Carcinom. Am weitesten geht Behla⁴⁾, der

1) Anmerkung bei der Korrektur: Infolge Verzögerung der Drucklegung der Arbeit ist eine Fortführung dieser Untersuchungen (Weitere Untersuchungen an Chytridiaceen, I.—III., Archiv f. Protistenkunde, Bd. V, H. 2, 1904) schon vor diesem ersten Teil erschienen.

2) Pringsheim's Jahrb. f. wissensch. Botanik. Bd. XI. 1878.

3) Unsere heutige Kenntnis von den pathogenen Protozoen. Centralbl. f. Bakter. Bd. VIII. 1890. S. 802.

4) Die pflanzenparasitäre Ursache des Krebses und die Krebsprophylaxe. Berlin 1903.

auf Grund seiner Tierversuche den Satz ausspricht: „Ich halte demnach beim Krebs experimentell den Beweis für erbracht, dass es ein Parasit ist, und was es für ein Parasit ist. Der Krebserreger ist in seinem Entwicklungsgang eine Chytridiacee, — ein Pflanzenparasit.“ Auch mit *Plasmodiophora* hat Behla Tierversuche gemacht, ebenso wie Podwyssotzki¹⁾ und Gaylord²⁾. Wie Podwyssotzki und Behla angeben, hat auch Gorini Impfungen mit *Plasmodiophora* in die Kaninchenhornhaut veröffentlicht; beide citieren in vollster Uebereinstimmung „*Academia dei Lincei*. 1900. Vol. IX. Fasc. 7.“ In der in den „*Atti della reale Accademia etc.*“ vom Jahre 1900, 1. Semester, Fasc. 7, veröffentlichten Mitteilung von Gorini, deren Titel „*Sulle inclusioni cellulari nell' innesto vaccinico della cornea e sui loro rapporti colle inclusioni cellulari nei tumori maligni*“ mit dem von Podwyssotzki und Behla citierten übereinstimmt, finde ich aber über *Plasmodiophora* nichts erwähnt. Dagegen hat Gorini, wie ich später gefunden habe, seine *Plasmodiophora*untersuchungen unter dem Titel „*Sulla infezione micetozoica della cornea comparata coll' infezione vaccinica della stessa*“ in den *Atti etc.* Vol. IX, 2^o Sem., Fasc. 10, 1900, und Vol. X, 1^o Sem., Fasc. 1, 1901, sowie deutsch im *Centralbl. f. Bakter.* Bd. 29, 1901, mitgeteilt. Er analogisiert die *Plasmodiophora* mit dem *Cytoryctes* der Vaccine. — Am weitesten in der Analogisierung der *Plasmodiophora* mit den in Krebszellen gefundenen Einschlüssen geht wohl Gaylord, doch hatte auch vorher schon u. a. v. Leyden³⁾ auf gewisse Ähnlichkeiten hingewiesen.

Bevor ich mich nun der Besprechung meiner eigenen Tierversuche und der Kritik der Analogisierungen zuwende, erscheint es notwendig, einiges über mein Untersuchungsmaterial und über die Beschaffenheit der in Rede stehenden Organismen vor auszuschicken.

Mein Material an Kohlhernien erhielt ich von den Berliner städtischen Rieselfeldern in Blankenburg, wofür ich dem Herrn Stadtrat Marggraff sowie dem Herrn Obergärtner Mende zu Dank verpflichtet bin. Die Morphologie und die Lebensgeschichte der *Plasmodiophora brassicae* ist, wenn auch bei weitem noch nicht vollständig aufgeklärt, so doch immerhin auch in medizinischen Kreisen wohl soweit bekannt, dass ich mich mit kurzen Hinweisen begnügen kann. Die erste Beschreibung stammt, wie

1) Ueber *Myxomyceten* resp. *Plasmodiophora brassicae* als Erzeuger von Geschwülsten. *Centralbl. f. Bakt.* Bd. XXVII. 1900. — Ueber die experimentelle Erzeugung von parasitären *Myxomyceten*-Geschwülsten mittelst Impfung von *Plasmodiophora brassica* (!). *Zeitschr. f. klin. Med.* Bd. XLVII. 1902.

2) *Zeitschr. f. Krebsforschung.* Bd. I. H. 2. 1903.

3) Zur Aetiologie des Carcinoms. *Zeitschr. f. klin. Med.* Bd. XLIII. 1901. — Ueber die Parasiten des Krebses. *Klin. Jahrbuch.* II. Ergänzungsbd. 1902.

schon erwähnt, von Woronin, danach hat Nawaschin¹⁾ detaillierte Angaben über den Bau und die Kernverhältnisse gemacht, denen noch die Veröffentlichungen von Feinberg²⁾ und von Prowazek³⁾ anzureihen sind. Der Entwicklungsgang ist in Kürze der, dass in einer Zelle der Kohlwurzel die eingedrungenen Myxamöben sich unter Kernvermehrung vergrössern, weiterhin zu grösseren Plasmodien zusammenfliessen; in den Plasmodien findet dann durch eine andersartige Kernteilung eine weitere Vermehrung der Kerne statt, und indem jeder der Kerne mit einer zugehörigen Protoplasmaportion von einer festen Membran umgeben wird, entstehen Dauer-sporen, die beim Faulen der Wurzel in die Erde gelangen und nun neue Pflanzen infizieren. Geschlechtliche Vorgänge sind zu vermuten, aber noch nicht bekannt; an dieser Stelle ist Behla's Angabe zu erwähnen, dass keines der Amöbenstadien mit weniger als zwei Kernen zu finden sei.

In dem Kohlhernienmaterial, das ich in Blankenburg erhielt, fand ich die *Plasmodiophora* nur als fertige Sporen. Solche Sporen sind in Fig. 11 in frischem Zustand dargestellt; sie sind etwa $4\ \mu$ gross, haben eine derbe Membran, die besonders deutlich wird, wenn der Inhalt sie nicht ganz ausfüllt (Fig. 11 b); sie sind, wie schon Woronin hervorhebt, nicht immer kugelig, sondern häufig auch länglich oder biscuitförmig. Die Peripherie des Zellinhalts wird von dichtgedrängt liegenden, kleinen Fetttröpfchen eingenommen, den Kern habe ich im frischen Zustande nicht sehen können. Bei Fixierung mit Flemming'scher Lösung bleiben die Fetttröpfchen als schwarze Kügelchen erhalten, bei Fixierung mit heissem Sublimatalkohol oder Formol mit nachfolgender Alkoholhärtung werden sie aufgelöst, und die Zellperipherie erscheint dann leer (Fig. 12). Wenn dann noch oben-drein der Zellinhalt schrumpft, was bei der geringen Durchlässigkeit der Membran sehr leicht vorkommt, dann kann man an gefärbten Präparaten manchmal in Versuchung kommen, den ganzen Zellinhalt für den Kern zu halten. Der Kern ist ein ganz winziges Gebilde, bläschenförmig, erscheint also auf dem optischen Schnitt als feiner Ring (Fig. 12). Einen Binnenkörper habe ich im Sporenkern nicht wahrnehmen können. Das Protoplasma der Sporen ist alveolär gebaut.

Nach Woronin's Angabe schlüpfen bei genügender Feuchtigkeit aus den Sporen Schwärmer aus, was ja sehr wahrscheinlich ist und auch von

1) Ueber die feinere Struktur von *Plasmodiophora brassicae*. Flora. Bd. LXXXVI. 1899.

2) Ueber den Erreger der krankhaften Auswüchse des Kohls (*Plasmodiophora brassicae*). Deutsche med. Wochenschr. 1902. Dasselbe fast wörtlich wiederholt in: Das Gewebe und die Ursache der Krebsgeschwülste. Berlin 1903.

3) Oesterreich. botan. Zeitschr. Jahrg. 52. 1902. — Ausserdem Original-Abbildungen im Abschnitt Protozoen von Kolle und Wassermann's Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. Jena 1903.

Gaylord (l. c. p. 100) bestätigt wird. Anderweitig aber scheint es nicht wieder beobachtet worden zu sein, und auch mir ist es, selbst nach Ueberwinterung der Sporen, nicht gelungen; in die sporenhaltige Erde eingesäte Kohlpflanzen erkrankten jedoch.

Was nun meine Untersuchungen an Chytridiaceen anbetrifft, so wäre zur Nachprüfung von Behla's Angaben natürlich die von ihm benutzte Art die zweckmässigste; doch spricht Behla einfach von „Chytridiaceensporen-Material“, ohne zu berücksichtigen, dass es einige Hundert Arten gibt mit recht weiten Unterschieden in der Höhe ihrer Organisation. Ich habe also, da Behla diese Art etwas ausführlicher erwähnt, und mir gerade von ihr einiges Material zur Verfügung stand, zu meinen Untersuchungen *Synchytrium taraxaci* benutzt. Das Material erhielt ich durch die Freundlichkeit der Herren P. Sydow in Berlin und W. Krieger in Königstein a. E., und ich danke den beiden Herren auch hier nochmals aufs beste für ihre grosse Liebenswürdigkeit.

Die erste und ausführlichste Beschreibung der Gattung *Synchytrium* wie auch der Spezies *S. taraxaci* stammt von ihren Entdeckern de Bary und Woronin¹⁾. Diese haben den Entwicklungsgang des Parasiten in vollem Umfange dargelegt, doch die Erkennung der Kernverhältnisse war mit den damaligen technischen Hilfsmitteln nicht möglich, und Angaben hierüber aus neuerer Zeit sind mir nur von Dangeard²⁾ bekannt; doch entspricht auch dessen damals angewandte Methode (Fixierung in absolutem Alkohol mit nachfolgender Uebertragung ohne allen Uebergang direkt in Wasser) kaum mehr den heutigen Anforderungen. Auch machten ihm gerade die von mir genauer untersuchten Schwärmsporangien besondere Schwierigkeit³⁾.

Es sei mir zum besseren Verständnis gestattet, den Entwicklungsgang von *Synchytrium taraxaci* nach de Bary's und Woronin's Darstellung kurz zu wiederholen: der in eine junge Epidermiszelle des Blattes, Blatt- oder Blütenstieles von *Taraxacum officinale* eingedrungene Parasit wächst unter Vergrösserung der Wirtszelle heran, umgibt sich entweder mit einer festen Membran und wird so zur Dauerspore, oder zerfällt innerhalb der Wirtszelle in mehrere Teile (Sporangien), die eine grosse Zahl von

1) Beitrag zur Kenntnis der Chytridiaceen. Verhandlungen der naturf. Gesellsch. zu Freiburg i. B. Bd. III. H. 2. 1864.

2) Recherches histologiques sur les champignons. Le Botaniste. 2. Serie. Fasc. 2 u. 3. 1890.

3) Erst später fand ich, dass auch in der Veröffentlichung von Rosen: Beiträge zur Kenntnis der Pflanzenzellen. II. Studien über die Kerne und die Membranbildung bei Myxomyceten und Pilzen. Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen. Bd. VI. 1893. Untersuchungen über die Kernverhältnisse von *S. Taraxaci* enthalten sind.

Schwärmsporen hervorbringen, die, ebenso wie die aus den Dauersporen hervorgehenden Schwärmsporen neue Epidermiszellen infizieren. In allen Entwicklungsstadien zeichnet sich *S. taraxaci* durch seine Orangefärbung aus.

Ich bekam mit *Synchytrium* behaftete *Taraxacum*blätter von den genannten beiden Herren mit der Post zugeschickt und war auf die Entwicklungsstadien angewiesen, die sich mir zufällig darboten; denn Neuinfektionen gelangen mir nicht, teils weil ich mir bei den beschränkten Laboratoriumsverhältnissen die notwendigen jungen *Taraxacum*pflanzen nicht vorrätig halten konnte, teils wohl auch, weil ich die Originalarbeit von de Bary und Woronin damals noch nicht gelesen hatte.

An den frisch aus den Blättern herausgelösten Sporangien habe ich in Folge der starken Pigmentierung keinerlei Details erkennen können, und auch die Bildung von Schwärmsporen unterblieb bei den isolierten Sporangien; es kann dies nicht an mangelnder Lebensfähigkeit der Parasiten in den natürlich schon etwas welken Blättern gelegen haben, denn in Wasser mit kranken Blattstückchen entwickelten sich sehr wohl Schwärmsporen.

Blattstückchen in dem Zustande, wie ich sie bekam, sowie nach verschieden langem Liegenlassen in Wasser habe ich mit heissem Sublimatalkohol 2:1 nach Schaudinn, in 10procentiger wässriger Formollösung oder im Flemming'schen Gemisch fixiert, nach gewöhnlicher Methode in Paraffin eingebettet und an Querschnitten untersucht. Ein Unterschied in der Güte der Präparate bei Fixierung mit Sublimatalkohol oder Formol ist mir nicht aufgefallen, bei der Flemming-Fixierung stört die Schwärzung der Parasiten; die Orangefärbung geht bei diesen Behandlungsarten verloren und zwar, soviel ich es makroskopisch habe verfolgen können, durch den Alkohol. Die Färbungen mit Eisenhämatoxylin, Alaunhämatoxylin und Boraxkarmin gaben prinzipiell gleiche Resultate; zur Untersuchung der feineren Einzelheiten erwies sich die Färbung mit Eisenhämatoxylin als die geeignetste, weil sie die bei den starken Vergrößerungen notwendige künstliche Beleuchtung (Nernst-Lampe) am besten vertrug. Mit der Methylenblau-Eosin-Färbung nach Ziemann und nach Giemsa, dem Biondi-Heidenhain'schen Dreifarbengemisch und dergl. hatte ich bei diesem Objekt keinen Erfolg.

In meinem Material waren die Parasiten meist als Sporangiensori (Fig. 6) zu finden. Ein solcher Sorus liegt in einer stark erweiterten Epidermiszelle, die er nur ausnahmsweise annähernd ausfüllt, während meistens die Wirtszelle zu gross ist; es ist dies nicht eine Folge der Konservierungsmethode, denn de Bary und Woronin geben dasselbe auch bei lebend untersuchtem Material an. Die vergrösserte Wirtszelle ragt manchmal zusammen mit den emporgezerzten Nachbarzellen über die Oberfläche des Blattes hervor, meist jedoch sah ich, insbesondere bei dickeren Blättern,

dass die Entwicklung nach der Tiefe erfolgt war, wie es auch Lüdi¹⁾ an schematischen Zeichnungen darstellt. Eine Wucherung und Vergrösserung der umgebenden Zellen findet nicht statt, sondern diese sind im Gegenteil meistens plattgedrückt und verzerrt. Der Sporangiensorus ist aus einer verschieden grossen Anzahl von Sporangien zusammengesetzt, deren Form durch ihre gegenseitige Lagerung bestimmt wird. Der ganze Sorus wird von einer mässig dicken Membran umgeben, die sich insbesondere bei Anwendung von Eisenhämatoxylin meistens stark färbt; sie zeigt auf ihrer Innenseite eine ziemlich starke Relieferung (Fig. 6 links), bestehend aus Leisten, die rundliche Vertiefungen zwischen sich fassen. Im Innern des Sorus verlaufen zarte, die Sporangien trennende Membranen, und auch jedes Sporangium selbst ist noch von einer eigenen Membran umgeben (Fig. 7 oben).

Jedes Sporangium enthält eine grosse, nicht bestimmbare Menge kleiner Kerne und fällt daher bei schwacher Vergrösserung durch seine Färbung mit Kernfarbstoffen deutlich in die Augen; doch nimmt auch das Protoplasma selbst bei Färbung mit Alaunhämatoxylin oder Boraxkarmin die Farbe nicht unerheblich an. Eine alveoläre Struktur des Protoplasmas in Bütschli's Sinne habe ich nicht erkennen können; ich sah nur eine gewisse Ungleichmässigkeit und kleine hellere Stellen, wie ich es in Fig. 7 darzustellen versucht habe; diese helleren Stellen bezeichnen wohl den früheren Platz des ausgezogenen Farbstoffs, der dann also in sehr feiner Verteilung vorhanden gewesen sein müsste. Die Kerne (Fig. 7) sind regellos verteilt, meist kugelig und stellen sich als kleine Bläschen von etwa 1—2 μ Grösse dar, gebildet von einer ganz zarten Membran, die nur einzelne stärker gefärbte Verdickungen aufweist; diese Verdickungen bilden meistens zwei an entgegengesetzten Polen liegende Calotten, können aber auch in der Ein- bis Vierzahl vorhanden sein. Eine Struktur konnte ich an den Verdickungen nicht erkennen, und einen besonderen Inhalt in diesen sehr charakteristischen Kernen nicht nachweisen, insbesondere keinen Binnenkörper. Ueber den Teilungsmodus zur Entstehung der zahlreichen Kerne kann ich keine Beobachtung beibringen. Ich glaubte freilich in einem Sporangium Spindeln und Aequatorialplatten zu sehen, doch konnte ich es nicht mit genügender Sicherheit erkennen.

Auch Dangeard glaubt eine Karyokinese gesehen zu haben, gewöhnlich aber geschehe die Vermehrung durch direkte Kernteilung. In Bezug auf die Beschaffenheit der Sporangienkerne lässt seine im übrigen so ergebnisreiche Untersuchung im Stich: es ist ihm unter mehreren Hundert Untersuchungen nur zwei oder drei Mal gelungen, die Kerne in einer Weise zu unterscheiden, die er nicht weiter beschreibt, und über die auch aus

1) Beiträge zur Kenntnis der Chytridiaceen. Hedwigia. Bd. XL. 1901.

den beigegebenen, anscheinend bei sehr schwacher Vergrösserung gezeichneten Abbildungen nichts zu entnehmen ist. In einem Fall gibt Dangeard an, mit Deutlichkeit Nucleolen gesehen zu haben.

Meistens fand ich die Sporangienkerne meiner gegebenen Beschreibung entsprechend. Doch begegnet man nicht so ganz selten Sporangien, in denen die Kerne intensiver gefärbt und strich- oder kommaförmig und alle nach einer Richtung orientiert sind. Ich glaube daher, dass in diesen Sporangien im Moment der Fixierung eine Strömung bestand, durch die die Kerne verzerrt wurden, und ich werde in dieser Ansicht dadurch bestärkt, dass solcher kommaförmiger Kern manchmal noch eine hellere Stelle im Innern zeigt. Sehr selten habe ich Sporangien mit soliden, kugelförmigen Kernen gesehen (Fig. 8a), und doch sind anscheinend gerade diese soliden Kerne eine Vorstufe zu den charakteristischen bläschenförmigen. Man kann nämlich in demselben Sporangium neben den soliden Kernen auch solche finden, bei denen die solide Masse durch einen feinen Spalt in zwei Teile getrennt ist (Fig. 8b), die dann auseinanderücken (Fig. 8c); sind dann diese beiden Teile durch eine Membran verbunden (Fig. 8d), so brauchen sie sich nur noch etwas zu biegen, um die oben erwähnten Calotten darzustellen. Ich muss gestehen, dass ich eine Deutung für diesen eigentümlichen Vorgang nicht zu geben weiss, und dass mir ein Analogon nicht bekannt ist. Auffällig ähnliche Kerne mit Randverdickungen hat Dangeard¹⁾ im Sporangium von *Polyphagus euglenae* beobachtet. Er beschreibt auch die bipolare Anordnung und deutet an, dass es sich dabei um einen Modus der Kernteilung handeln könne, wenngleich er als gewöhnliche Teilung der Sporangienkerne eine regelrechte Karyokinese angibt. Die Bildung der Randverdickung führt Dangeard auf das Auftreten einer centralen Vakuole zurück. Um eine solche Vakuole handelt es sich in meinem Falle nicht, denn in Stadien wie Fig. 8c habe ich keinerlei Verbindung zwischen den beiden Kernteilen wahrnehmen können.

Die Schwärmsporen von *Synchytrium taraxaci* kann man, wie schon erwähnt, beobachten, wenn man kranke Blätter einige Stunden in Wasser legt. Die Stellen des Wassers, an denen Schwärmsporen in grösserer Menge zusammen sind, zeichnen sich schon makroskopisch durch ihre orange-rötliche Färbung aus. Die Schwärmsporen sind etwa $3\ \mu$ gross, meist kugelig, häufig auch etwas länglich, gewöhnlich nach hinten zu etwas spitzig ausgezogen. Sie bewegen sich recht lebhaft in engen Zickzacklinien, etwas sprunghaft, nach kurzer Zeit der Bewegung kommt eine kleine Ruhepause. Als Bewegungsorgan dient eine hinten angebrachte, an der Basis anscheinend etwas starrere Geissel von 2—3facher Körperlänge;

1) Recherches sur la structure du *Polyphagus euglenae* etc. Le Botaniste. 7. Serie. Fasc. 5. 1900.

sieschwimmt peitschenartig als Ganzes; solche kleine Schlängelungen der Geissel, wie sie Behla auf Taf. III, Fig. 7 abbildet (es ist freilich nicht angegeben, auf welche Chytridiaceenart sich die Figur bezieht), habe ich nicht beobachtet. Nicht so ganz selten habe ich Schwärmsporen mit 2, ja selbst ausnahmsweise mit 3 und 4 gemeinsam inserierenden Geisseln gesehen. Der Kern ist am lebenden Objekt meist ziemlich deutlich als heller Fleck im vorderen Teil des Sporenkörpers zu erkennen; am gefärbten Präparat (Fig. 9) entspricht er vollkommen den beim Schwärmsporangium beschriebenen charakteristischen bläschenförmigen Kernen. Mit noch grösserer Regelmässigkeit als bei den Sporangiumkernen sind zwei polare Verdickungen vorhanden; in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle liegt dann der Kern so, dass die beiden Verdickungen in der Bewegungsrichtung der Schwärmspore verlaufen. — Fernerhin enthalten die Schwärmsporen ihren Anteil an Farbstoff, manchmal als mehrfache Partikelchen, meist jedoch als einheitlichen grossen Tropfen im hinteren Teil des Körpers und zwar immer ausserhalb der Mittellinie. Im gefärbten Präparat bezeichnet eine Vakuole die Stelle des Pigmenttropfens (Fig. 9). Sobald die Schwärmspore einen Moment ruht, dreht sie sich dem spezifischen Gewicht entsprechend mit dem undurchsichtigen Tropfen nach oben, was die Untersuchung des lebenden Objektes sehr erschwert. — Eine Zellmembran scheinen die Schwärmsporen nicht zu besitzen.

Eine Kopulation der Schwärmsporen ist bisher nicht bekannt, doch habe ich zwei Beobachtungen gemacht, aus denen man sie vermuten kann, Einmal nämlich sah ich ein umherschwimmendes Sporenpar Seite an Seite dicht aneinander gedrängt, jede Spore mit einer Geissel und einem Oeltropfen, den Kern konnte ich nicht erkennen. Ich beobachtete dann, wie im Verlauf von etwa 20 Minuten die Begrenzung zwischen beiden schwand und sie zu einem einheitlichen Körper mit zwei Geisseln verschmolzen; die beiden Oeltropfen flossen während der Zeit nicht zusammen, und danach verlor ich das Objekt aus den Augen. Die zweite Beobachtung bezieht sich auf ein von frei schwimmenden Sporen angefertigtes gefärbtes Fixationspräparat. Hier habe ich eine Schwärmspore (Fig. 10) gefunden mit zwei Kernen und einer einzigen dem Oeltropfen entsprechenden Vakuole; die Geisseln konnte ich an dem Exemplar nicht erkennen. Diese Beobachtungen nun sind noch nicht beweisend, denn ich habe keine Sicherheit dafür, dass die verschmelzenden Zellen vorher vollkommen getrennt waren; und dass Scheinkopulation, vorgetäuscht durch unvollständige Trennung der Sporen im Sporangium, vorkommt, darauf hat Wille¹⁾ bei Schwärmsporen von Algen hingewiesen.

1) Algologische Mitteilungen. I. Ueber die Schwärmzellen und deren Kopulation bei *Trentepohlia* Mart. Pringsheim's Jahrb. f. wissenschaftl. Botanik. Bd. XVIII.

Untersucht man Blätter, die einige Stunden im Wasser gelegen haben, an Schnittpräparaten, so kann man Sporangien finden, in denen um die einzelnen Kerne eben eine Sonderung des Protoplasmas beginnt, bis zu solchen, in denen der Zerfall zu Sporen schon vollendet ist. An den noch nicht ausgetretenen Sporen konnte ich eine Geissel nicht finden; öfter sah ich aber ausser dem Sporenkern nach 2—3 mit Eisenhämatoxylin sich schwärzende Körnchen, die möglicherweise etwas mit der Geisselbildung zu tun haben könnten, über deren Bedeutung ich aber nicht ins Klare kommen konnte.

Das Eindringen der Schwärmsporen in neue Epidermiszellen, sowie jüngere ein- oder mehrkernige Parasiten vor der Ausbildung zu Sporangien-sori habe ich nicht beobachtet. Dangeard gibt an, die einkernigen Zellen besäßen einen Kern von der Grösse bis zu $14\ \mu$; er bestände aus einer Membran, ungefärbtem Hyaloplasma und einem grossen chromatischen Nucleolus. Die Kernvermehrung geschehe durch direkte Teilung. Die nun zu beschreibenden ein- und mehrkernigen Zellen, die ich gesehen habe, sind Dauersporen. Diese einkernigen Zellen (Fig. 3) liegen einzeln oder zu zweien in einer vergrösserten Epidermiszelle, sind kugelig oder etwas länglich, gegen $40\text{--}50\ \mu$ gross. Sie haben eine ziemlich derb aussehende, etwa $1\text{--}2\ \mu$ dicke, auf dem Schnitt manchmal etwas lappig ausgerissene Membran, die bei den angewandten Färbungen häufig ungefärbt blieb und dann blassgelb ist; sie ist oft radiär gestreift durch ziemlich weite, sie durchsetzende Kanäle. Der Zellkern liegt central, ist ungefähr $10\ \mu$ gross und ist alveolär gebaut; die Wandungen der Alveolen sind ebenso wie die Kernmembran aus feinsten chromatischen Körnchen zusammengesetzt. Im Innern des Kerns liegt excentrisch ein kugelig, manchmal vakuolisierter Binnenkörper. Das Protoplasma ist feinkörnig, ohne erkennbare alveoläre Struktur, durchweg durchsetzt von grossen, runden Vakuolen; nur die Umgebung des Kerns wird von einer verdichteten, vakuolenfreien Plasmazone gebildet. Die zahlreichen Vakuolen lassen auf eine intensive Orangefärbung im Leben schliessen.

Die vielkernigen Zellen (Figur 4) habe ich nur einzeln in einer Epidermiszelle liegend gefunden, doch müssen, wenn sie aus den einkernigen hervorgehen, auch hier und da einmal zwei in einer Epidermiszelle anzutreffen sein. Die Epidermiszelle ist so stark erweitert, dass der Parasit sie nicht ausfüllt, wie schon de Bary und Woronin es angeben. Die vielkernigen Zellen sind oval und entsprechen in ihrer Grösse etwa den Sporangien-sori; die Dauerspore Figur 4 und der Sorus Figur 6 sind aus demselben Blattquerschnitt bei gleicher Vergrösserung gezeichnet. Bis auf die zahlreichen Kerne entsprechen diese vielkernigen den einkernigen durchaus, nur ist die Membran (in Figur 4 links abgehoben) vielleicht etwas dünner und ohne Radiärstreifung. Auch die Vakuolisierung des

Protoplasmas und die Verdichtung um den Kern (Figg. 4 und 5) ist die gleiche. Die Angaben über die Kerne kann ich bei der grösseren zur Untersuchung sich anbietenden Anzahl etwas erweitern. Es enthält nämlich nicht jeder Kern einen Binnenkörper, und der Binnenkörper färbt sich mit Boraxkarmin und Alaun-Hämatoxylin nur ganz schwach, und auch mit Eisen-Hämatoxylin wird er nicht immer stark gefärbt, und zwar kann man diesen Differenzen der Eisenhämatoxylin-Färbung in demselben Schnitt begegnen. Zweimal habe ich im Innern eines mit Eisenhämatoxylin schwach gefärbten Binnenkörpers noch ein kleines Körperchen gesehen, konnte aber nicht unterscheiden, ob es intensiv gefärbt oder nur sehr stark lichtbrechend war. Ich muss also im Gegensatz zu Dangeard diesen oben drein nicht regelmässig vorhandenen Binnenkörper als nicht aus Chromatin bestehend ansehen; er ist möglicherweise ein echter Nucleolus.

Leider habe ich auch hier wieder keine Kernteilung gesehen und kann auch über die Beschaffenheit des Kernes der Schwärmsporen, die nach de Bary's und Woronin's Angabe aus diesen Zellen hervorgehen, nichts aussagen.

Nach dieser Orientierung über die in Verwendung gelangten Organismen wende ich mich nun der Besprechung der Tierversuche zu. Die *Plasmodiophora*-Versuche machte ich durch Einpflanzung kleiner Stückchen Kohlhernie, wobei ich mich bemühte, möglichst wenig Bakterien mit zu übertragen. Ich säuberte also ein grösseres Geschwulststück äusserlich sorgfältig mit Wasser, stellte dann mit sterilem Messer ebene Flächen her, die ich abglühte, und aus dem Innern dieses äusserlich sterilen Blockes entnahm ich die zu überpflanzenden Stückchen. Diese wurden Kaninchen in die freie Bauchhöhle, in die Leber oder in eine Niere gebracht¹⁾, oder weissen Ratten mit Troikart unter die Rückenhaut geschoben. In dieser Art wurden zehn Versuche gemacht; die implantierten Stücke nebst ihrer Umgebung wurden nach Verlauf von 1—54 Tagen untersucht. Ferner habe ich zwei Kaninchen 8 bzw. 4 Tage lang mit kranken Kohlwurzeln gefüttert, davon das erste im Anschluss an eine Fütterung mit gestossenem Glas; diese Tiere blieben über fünf Monate am Leben, ein weiteres Kaninchen starb schon am ersten Tage nach der Glasfütterung.

Die Resultate aller dieser Versuche waren vollkommen negativ, es war nirgends etwas von Tumorbildung oder spezifischer Reaktion nachzuweisen, und auch Eiterung oder Verkäsung trat nicht ein. In den ersten Tagen trat um die eingepflanzten Stückchen eine Anhäufung grösserer und kleinerer, meist einkerniger Zellen auf, unter denen bei den Ratten besonders die Zellen mit Lochkern auffielen, weiterhin bildete sich eine feste

1) Für die Ausführung dieser Operationen an den Kaninchen bin ich Herrn Dr. Fritz Meyer zu Dank verpflichtet.

Abkapselung durch straffes Bindegewebe aus. Als Beispiel hierfür mögen die Figg. 1 und 2 dienen, die die Bindegewebskapsel um ein mit Plasmodiophorasporen durchsetztes Kohlhernienstück in der Kaninchenleber und -Niere 28 bzw. 20 Tage nach der Implantierung darstellen. Dass am Rand liegende und daher leichter zugängliche Plasmodiophorasporen von Wanderzellen aufgenommen und eine Strecke weit transportiert werden können, wie wir das von Kohlenpartikelchen und anderen Fremdkörpern kennen, ist a priori vorauszusetzen und daher weiter nicht auffällig. Die von den Zellen aufgenommenen Sporen (Figur 13) werden, wie schon Podwyssotzki angibt, verdaut, und am längsten bleibt die Sporenmembran erhalten; auffällig ist die starke Verkleinerung, die bei den von Zellen aufgenommenen Sporen auftritt. Die Fresszellen gehen nach Aufnahme der Sporen manchmal zu Grunde, und man kann dann kleine Häufchen leerer Sporenmembranen finden. Die übrigen Plasmodiophorasporen liessen auch nach 54tägigem Verweilen im Tierkörper keinerlei Veränderung erkennen.

In Bezug auf die Chytridiaceen-Tierversuche hätte ich mich gern an Behla angeschlossen, der von positiven Erfolgen berichtet; doch lautet seine Angabe „ich skarifizierte Haut oder Schleimhaut von krebsempfänglichen Tieren und rieb darin Chytridiaceensporen-Material ein“ so unbestimmt, dass es auf Zufall beruht, wenn man die von ihm benutzte Chytridiaceenart an denselben „krebsempfänglichen“ Tieren untersucht, und dass daher ein bewusstes Nachprüfen nicht möglich ist. Ich machte also meine Versuche mit *Synchytrium taraxaci* an weissen Mäusen in der Weise, dass ich in die skarifizierte Rückenhaut der Tiere von den Blättern abgeschabtes orangefarbenes Material, also Schwärmsporangien und vielleicht auch einige Dauersporen, einrieb, sowie auch mit kranken Blättern direkt auf der skarifizierten Haut kräftig rieb, einer Maus brachte ich ein krankes Blattstück unter die Haut, und anderen injizierte ich mit einer Pravazspritze schwärmsporenhaltiges Wasser subkutan und intrakutan. Nach einem Zeitraum von 1—16 Tagen wurden Hautstücke in Formol oder heissem Sublimatalkohol fixiert und nach entsprechender Weiterbehandlung und Paraffineinbettung eine grosse Zahl von Schnitten untersucht.

Auch das Resultat dieser Versuche war vollkommen negativ. Wohl war manchmal mikroskopisch ein ziemlich starkes Hautödem zu erkennen, und auch einzelne Stücke von Sporangien konnte ich in der Haut wiederfinden, aber eine Weiterentwicklung konnte ich an ihnen nicht wahrnehmen, und von „Wachsen, Zellvergrösserung, Zellproliferation, asymmetrischen Mitosen etc.“, wie es Behla als Ergebnis seiner Versuche anführt, konnte ich in meinen Versuchen nichts finden. Irgend welche Zelleinschlüsse, speziell die Leyden'schen „Vogelaugen“ konnte ich nicht nachweisen. Die injizierten Schwärmsporen habe ich nicht wiedergefunden; doch muss ich eingestehen, dass ich keine Gewähr dafür würde übernehmen wollen,

vereinzelte Schwärmsporen von *S. taraxaci* unter den zahlreichen Körnchen in der verhornenden Epidermis mit Sicherheit herauszufinden. Dagegen sah ich häufig auf und in der Epidermis, sowie in tieferen Hautschichten, namentlich stark angehäuft in der Umgebung von Blattpartikelchen, kugelige Gebilde von etwa 5μ und darunter, die grösseren mit einer verhältnismässig dicken, braungelben Membran, durch die hindurch der hämatoxylingefärbte Inhalt grünlich erschien; einen Kern habe ich nicht mit Sicherheit erkennen können; manchmal lagen sie zu zweien oder dreien hintereinander wie reihenweise gebildete Conidien, und ich glaubte auch einmal etwas wie eine Hyphe an solchem Gebilde zu erkennen. Diese Gebilde scheinen sich in der Haut zu vermehren, denn an den Schnitten der Taraxacumblätter habe ich nur etwa 2–3mal eines gesehen. Ich erwähne diese Dinge hier, weil sie möglicherweise einmal zu Täuschungen Veranlassung geben könnten; sie haben, was es auch sein möge, jedenfalls weder mit *S. taraxaci* noch mit den Leyden'schen „Vogelaugen“ etwas zu tun, ich habe sie übrigens auch niemals intracellulär gefunden.

Meine Versuche sind also negativ ausgefallen und, unbeschadet aller notwendigen Unbefangenheit, es war auch kaum anders zu erwarten. Man kann doch nicht ohne weiteres voraussetzen, dass ein mehr oder minder willkürlich herausgegriffenes Lebewesen sich unter von Grund aus veränderten Bedingungen weiter entwickle oder pathogen werde; sind ja doch die obligat parasitären Organismen in ihrer Lebensweise streng spezialisiert. Diese Spezialisierung geht nach Lüdi's Untersuchungen z. B. bei *Synchytrium taraxaci* so weit, dass es nicht einmal auf allen Taraxacumarten, geschweige denn auf anderen Pflanzen entwicklungsfähig ist. Nun ist freilich die *Plasmodiophora brassicae* als Untersuchungsobjekt nicht so ganz willkürlich herausgegriffen, sondern man hat, neben der durch sie verursachten Tumorbildung bei den befallenen Pflanzen, wiederholt, und so auch neuerdings Gaylord, Gewicht gelegt auf eine Aehnlichkeit der vogelartigen Krebs einschüsse mit den Kernen der *Plasmodiophora* im Amöbenstadium. Diese Aehnlichkeit als bestehend angenommen (bei genauerer Untersuchung und bei Berücksichtigung von Prowazek's Befunden wird sie sehr verringert), so ist damit auch noch nichts gewonnen; denn sollen die Vogelaugen dem Plasmodiophorakern entsprechen, dann müssten sie wie dieser von einem eigenen Protoplasma umgeben sein, und das habe ich noch nie beobachtet. Die Plasmodiophoraspore aber, die ja ausserhalb der Membran kein Protoplasma besitzt, lässt sich zum Vergleich nicht herbeiziehen, denn zwischen ihr und den Vogelaugen besteht ausser in der gewöhnlich kugeligen Form keinerlei Aehnlichkeit. Natürlich muss man zu solcher Vergleichung wohl erhaltene und eventuell gut gefärbte Sporen wählen; denn dass eine von einer Zelle aufgenommene Plasmodiophoraspore mit desorganisiertem Inhalt einmal einem Leyden'schen Vogel-

auge ähneln kann, das will ich nicht in Abrede stellen, damit ist aber auch für einen Analogieschluss nicht das Mindeste gewonnen. Und dass die von Zellen aufgenommenen Sporen zu Grunde gehen, hat schon Podwyssotzki gefunden. Freilich hält Podwyssotzki auch eine Weiterentwicklung der eingeführten Plasmodiophorasporen im Tierkörper für möglich und bildet in Figur 9 einen Befund ab, den er als Kernteilung innerhalb der Spore deuten zu sollen glaubt; Podwyssotzky drückt sich mit Recht sehr vorsichtig aus, denn es fehlt der Nachweis, dass überhaupt innerhalb der Plasmodiophoraspore bei der Weiterentwicklung eine Kernteilung stattfindet, was nach unseren bisherigen Kenntnissen nicht der Fall ist. Dass Behla in einer früheren Veröffentlichung¹⁾ angibt, es könnte einiges darauf hindeuten, dass die *Leydenia gemmipara* mit *Pl. brassicae* etwas zu tun habe, kommt jetzt nicht mehr in Betracht, nachdem Schaudinn²⁾ die *Leydenia* als abnormes Entwicklungsstadium der *Chlamydomyces stercoraria* erkannt hat.

Was nun die Chytridiaceen betrifft, so erscheint eine morphologische Analogisierung von vornherein ausgeschlossen; bei *Synchytrium taraxaci* wenigstens habe ich kein einziges Entwicklungsstadium gesehen, das irgend einem Krebseinschluss irgendwie vergleichbar wäre. Man müsste denn etwa als Aehnlichkeit anführen wollen, dass *S. taraxaci* sich bei der Schwärmsporenbildung in kleine Teile auflöst und dass vielleicht auch die Vielheit der Vogelaugen aus einem grösseren Körper durch Zerfall entstehen könnte. Dies *Tertium comparationis* ist nicht ganz so aus der Luft gegriffen, wie es den Anschein hat, es ist gerade bei den Chytridiaceen in dieser Weise vor kurzem tatsächlich angewendet worden³⁾.

Eine biologische Analogisierung andererseits scheint mir unmöglich, so lange über die Biologie eines supponierten Krebserregers nichts bekannt ist. Nicht einmal Zellwucherung habe ich durch *S. taraxaci* verursacht gefunden, doch mag bei anderen Chytridiaceen solches vorkommen; so gibt Magnus⁴⁾ von *Urophlyctis leproides*, die auf *Beta vulgaris* Tumoren erzeugt, an, dass sie die befallenen Zellen zu schrankenloser

1) Ueber vermehrtes und endemisches Vorkommen des Krebses. Centralbl. f. Bakter. Bd. 24. 1898. S. 837.

2) Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte. Bd. XIX. H. 3. 1903.

3) In einer Besprechung von Rohde's Untersuchungen nämlich, der die zahlreichen von ihm in den Ganglienzellen des Frosches gefundenen Sphären mit Centrosomen für Parasiten erklärt, sagt der Botaniker R. Francé (Umschau, Jahrg. 1904. No. 3) in Bezug darauf, ihre Organisation „erinnert sehr stark an . . . die Chytridien . . ., welche sich ganz ebenso aus kleinen Keimen entwickeln und in solche zerfallen wie die Sphären.“

4) On some species of the Genus *Urophlyctis*. Annals of Botany. Bd. XI. 1897.

Wucherung veranlasse, im Gegensatz zu *Urophlyctis Kriegeriana*, die nur beschränkte Wucherungen erzeuge. Nun wird man wohl kaum versuchen wollen, zu Analogisierungen die *Urophlyctis*-arten heranzuziehen, denn diese sind hochentwickelte Chytridiaceen mit Mycelbildung und Befruchtung.

Die vorliegenden Untersuchungen habe ich auf Wunsch des Herrn Geheimrat v. Leyden unternommen. Es sei mir gestattet, an dieser Stelle meinem hochverehrten Chef für die Anregung und für das freundliche Interesse an dieser Arbeit meinen ergebensten Dank zum Ausdruck zu bringen.

Erklärung der Figuren auf Tafel II.

Mit Ausnahme der von Herrn Maler Landsberg ausgeführten Figuren 1 und 2 sind sämtliche Figuren bei den angegebenen Vergrößerungen mit dem Abbéschen Zeichenapparat gezeichnet. Figur 1: Leitz Obj. 2, Ocul. 0, Vergr. ca. 25:1; Figg. 2, 4, 6: Obj. 4, Ocul. 0, Vergr. ca. 75:1; Figur 3: Zeiss: Apochrom. Immers. 2,0 mm, Apert. 1,30, Komp.-Ocul. 4, Vergr. ca. 500:1; die übrigen Figg.: Zeiss Apochr. Immers. 2,0 mm, Komp.-Ocul. 18, Vergr. ca. 2250:1:

- Figur 1. Kohlhernienstück in Kaninchenleber eingepflanzt, 28 Tage nach der Operation. Man sieht um den Fremdkörper einen schmalen Saum von Wanderzellen, ringsherum rot gefärbt eine derbe Bindegewebskapsel. Fixation: heisser Sublimat-Alkohol; Färbung: Hämatoxylin van Gieson.
- Figur 2. Kohlhernienstück in Kaninchenniere, 20 Tage nach der Operation. Fixation und Färbung wie bei Figur 1.
- Figur 3. Einkernige Dauerzelle von *Synchytrium taraxaci*. Lappig zerrissene Membran, vakuolisiertes Protoplasma, bildet um den Kern eine verdichtete Zone. Fixation: heisser Sublimat-Alkohol; Färbung: Eisen-hämatoxylin.
- Figur 4. Vielkernige Dauerzelle von *S. taraxaci*, in einer erweiterten Epidermiszelle eines *Taraxacum*-blattes liegend; die umgebenden Zellen sind abgeplattet und verzerrt. Links ist die Membran der Dauerzelle etwas abgehoben. Die Kerne sehen wegen der sie umgebenden verdichteten Protoplasmazone nicht scharf begrenzt aus, in einigen ist ein Binnenkörper sichtbar. Fixation und Färbung ebenso.
- Figur 5. Ein einzelner Kern daraus mit seiner Umgebung bei stärkerer Vergrößerung. Ebenso.
- Figur 6. Schwärmsporangiensorus von *S. taraxaci* in einer erweiterten Epidermiszelle wie Figur 4. Der ganze Sorus von einer gemeinsamen Membran umgeben, die unten zerrissen ist und links die Innenseite mit der Reliefierung zeigt. Zarte Membranen im Innern zwischen den Sporangien. Ebenso.
- Figur 7. Stück eines Schwärmsporangiums. Rechts oben von der Membran retrahiert. Man sieht die charakteristischen bläschenförmigen Kerne, meist mit zwei polaren Verdickungen. Ebenso.

- Figur 8. Solider und bläschenförmiger Kern nebst Zwischenstufen in der Reihenfolge der Buchstaben aus einem Schwärmsporangium. Fixation: Formol; Färbung: Eisenhämatoxylin.
- Figur 9. Schwärmspore von *S. taraxaci*; vorn der bläschenförmige Kern, in der hinteren Zelhälfte der an Stelle des ausgezogenen Farbstoffs sichtbare helle Fleck. Nach Eiweisszusatz auf dem Deckglas mit heissem Sublimat-Alkohol fixiert; Färbung: Hämatoxylin-Eosin.
- Figur 10. Schwärmspore mit zwei Kernen, dahinter einem hellen Fleck. Kopulation? Ebenso.
- Figur 11. Zwei Plasmodiophorasporen, die eine länglich und von der Membran retrahiert. In der Zellperipherie Fetttröpfchen. Lebend.
- Figur 12. Plasmodiophoraspore. Zellperipherie nach Auflösung des Fettes leer; alveoläres Protoplasma und kleiner ringförmiger Kern. Fixation: heisser Sublimat-Alkohol; Färbung: Hämatoxylin-Eosin.
- Figur 13. Zelle mit 5 aufgenommenen Plasmodiophorasporen, 2 davon leer, in den anderen geschwärzte Fetttröpfchen. Fixation: Flemming'sche Lösung; Färbung: Safranin.
-