

Aus dem Botanischen Institut der Universität zu Köln

GENETISCHE UNTERSUCHUNGEN  
AN *SORDARIA MACROSPORA* AUERSW., KOMPENSATION  
UND INDUKTION BEI GENBEDINGTEN ENTWICKLUNGSDEFEKTEN\*

Von

K. ESSER und J. STRAUB

Mit 6 Textabbildungen, davon 1 farbige

(Eingegangen am 11. August 1958)

A. Einleitung

Um cytogenetische Probleme der Meiose bearbeiten zu können, suchten wir nach einem Objekt, an dem nicht nur die Aufspaltung von Genen sicher und leicht zu erkennen, sondern auch das chromosomale Verhalten in der Meiose zu verfolgen ist. In vorbereitenden Untersuchungen erwies sich der monözische selbst-compatible Ascomycet *Sordaria macrospora* als geeignet.

Dieser Pilz läßt sich leicht auf Agarmedien und in flüssigen, synthetischen Medien kultivieren. Aus einer Ascospore entsteht ein Myzelium, das nach 7 Tagen reife Perithezien trägt. Die 8 Sporen liegen linear angeordnet in den Asci. Eine asexuelle Fortpflanzung durch Konidiosporen oder andere Körper, die bei der genetischen Analyse störend wirken könnten, fehlt.

Zunächst allerdings könnte ein starkes Hindernis für genetische Analysen darin erblickt werden, daß die Unterscheidung zwischen Selbstungs- und Kreuzungspithezien infolge der Selbstfertilität dieses Pilzes mit Schwierigkeiten verbunden ist. Darin liegt wohl der Grund, weshalb selbst-compatible Pilze bisher selten zu genetischen Versuchen herangezogen wurden. Die Kreuzungspithezien können nämlich erst nach Sporenaussaat und Test der Myzelien als solche erkannt werden. Diese Schwierigkeiten umgingen WHEELER u. Mitarb. (s. die zusammenfassende Darstellung von WHEELER 1954) und MARKERT (1949), indem sie von der ebenfalls selbst-compatiblen *Glomerella cingulata* mehr oder weniger sterile Mutanten benutzten, die in ihrer Kontaktzone vielfach eine Anhäufung von Kreuzungspithezien zeigten. Eine einfachere Methode zur Identifizierung der Kreuzungspithezien besteht in der Verwendung von Farbspormutanten (HESLOT 1953 bei *Sordaria macrospora* und OLIVE 1956 bei *Sordaria fimicola*).

Wenn die beiden Kreuzungspartner verschiedene Gene für die Sporenfarbe besitzen, lassen sich Kreuzungspithezien schon bei schwacher Vergrößerung an der Spaltung der Farbfaktoren in den Asci erkennen.

Unter den Nachkommen von röntgenbestrahlten Sporen der *Sordaria macrospora* fanden wir *Genmutanten der Sporenfarbe*, die als Markierer geeignet waren. Der größere Teil der isolierten Mutanten wies jedoch *Veränderungen im Fortpflanzungsverhalten* auf. Bei ihnen war die Bildung der Perithezien auf bestimmten Stufen blockiert. Das Stadium, in dem die Entwicklung in einer für jede Mutante charakteristischen Weise unterbunden war, konnte mikroskopisch

\* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Ministeriums für Wirtschaft und Verkehr NRW.

erkannt werden. Während die Mutanten in Einzelkulturen steril waren, ließen sie sich gegenseitig kreuzen. Die genetische Analyse dieses Phänomens führte zu einer Vorstellung über den Mechanismus der Kreuzbarkeit und die Sexualität monözischer, selbst-compatibler Ascomyceten, mit deren Hilfe die hierüber bereits vorliegenden Auffassungen (HÜTTIG 1935, GREIS 1941) korrigiert werden konnten. Die Interpretation unserer genetischen Versuche setzt eine genaue Kenntnis der Entwicklungsgeschichte von *Sordaria macrospora* voraus, zumal darüber in der bisherigen Literatur keine einheitliche Auffassung vorliegt.

### B. Material und Methoden

Zu den vorliegenden Untersuchungen benutzten wir einen Stamm von *Sordaria macrospora* AUERSW., den wir vom CBS in Baarn, Holland, bezogen. Um die Homogenität des Wildstammes zu prüfen, isolierten wir von diesem Stamm 27 Asci und säten die Sporen (216) einzeln aus. 181 Sporen keimten. Alle Myzelien waren selbstfertil. Sie unterschieden sich morphologisch nicht vom Ausgangsstamm. Wir wählten eines der Einzelspormyzelien als Ausgangskultur für unsere Experimente. Die Präparation und Aussaat der Sporen erfolgte nach den von RIZER und ENGELMANN (1949) angegebenen Methoden. Bei der Keimung der Sporen auf Pferdemistdekokt-Agar und der folgenden Kultur der Myzelien auf Maismehldekokt-Agar betrug die Temperatur 26—27° C.

Zur Auslösung von Genmutanten wurden mehrere tausend Sporen mit Dosen zwischen 20000 und 30000 r (100 kV) röntgenbestrahlt und davon insgesamt 3152 ausgesät. Die LD-50 lag bei etwa 24000 r. Da die Sporen von *Sordaria macrospora* infolge einer kurz nach der Membranbildung abgelaufenen Mitose zwei genetisch gleiche Kerne enthalten, waren die nach den Bestrahlungen erhaltenen Myzelien meist heteroxaryotisch. Sie wiesen vielfach Wachstumsanomalien oder Sterilitätserscheinungen auf. Um homogene Mutanten zu erhalten, wurden geeignet erscheinende Varianten mit dem Wildstamm rückgekreuzt. Durch Aussaat von Einzelsporen konnten wir auf diese Weise aus dem bestrahlten Material bisher 23 Mutanten isolieren (s. Tabelle 1).

Zu den entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen zogen wir die Pilzstämme in kleinen sterilen Feuchtkammern an. Diese wurden auf folgende Weise angefertigt: Auf einen Objektträger klebten wir mit Vaseline einen plangeschliffenen Glasring ( $\varnothing$  23 mm, Höhe 5 mm). Auf den Boden dieser Kammer gaben wir 2—3 Tropfen steriles Wasser. Dann wurde ein Tropfen 2%igen Nähragars auf ein Deckglas (24×24 mm) aufgetragen. Der Agar enthielt 4 Teile Maismehldekokt und 1 Teil Nährsalzlösung [modifiziertes Westergaardmedium: 0,1% KNO<sub>3</sub>; 0,1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,05% MgSO<sub>4</sub>; 0,01% CaCl<sub>2</sub>; 0,01% NaCl (ESSER 1956)]. Nach Erkalten des Agartropfens auf dem Deckglas beimpften wir mit einem Mycelstück von etwa 0,5 mm<sup>3</sup> und legten das Deckglas mit dem Agartropfen nach unten auf den Glasring, dessen Oberkante vorher mit Vaseline leicht eingefettet wurde. Diese Mikrokammern gaben wir in eine feuchtgehaltene Petrischale ( $\varnothing$  10 cm) und bebrüteten die Kulturen bei 26° C.

Die bei den Versuchen zur Aufklärung des Induktionsmechanismus verwendeten flüssigen Nährmedien waren: 2%ige Biomalzlösung, Maisdekokt und modifiziertes Westergaard-Medium mit 2% Saccharose.

### C. Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen

Die weiblichen Geschlechtsorgane (Ascogone) von *Sordaria macrospora* entstehen als schraubige Ausstülpungen der Hyphen (DANGEARD 1907). An ein Ascogon legen sich im Verlauf der weiteren Entwicklung benachbarte Hyphen an, die sich reich verzweigen und auf diese Weise die Hülle der Geschlechtsorgane bilden. Da keine Fusionsbrücken zwischen Ascogon und Hüllhyphen zu beobachten waren, nahm DANGEARD an, daß die Ascogone sich apandrisch zu den Perithezien entwickeln und die Befruchtung autogam erfolgt. DENGLER (1937) kam nach der Untersuchung von gefärbten Präparaten und Mikrotomschnitten zu der

Auffassung, daß die Fruchtkörperbildung bei diesem Pilz durch eine Gametangiogamie eingeleitet wird. Sie beschreibt, daß die jungen Ascogone von fadenförmigen Hyphen, den Antheridien, befruchtet werden. Allerdings konnte sie kein Einwandern des männlichen Kerns in das weibliche Geschlechtsorgan beobachten. Da DENGLER bei *S. uvicola* und *S. Brefeldii* (wie DANGEARD bei *S. macrospora*) eine apandrische Entwicklung der Fruchtkörper nachweisen konnte, wäre es möglich, daß es sich bei den *S. macrospora*-Stämmen von DENGLER und DANGEARD um verschiedene Arten oder um verschiedene geographische Rassen gehandelt hat, deren Sexualverhalten unterschiedlich war.

### I. Der Wildstamm

Alle Untersuchungen wurden als mikroskopische Dauerbeobachtungen am lebenden Material durchgeführt.

17—22 Std nach Beimpfen der Feuchtkammern mit Myzelstückchen beginnen die farblosen Myzelien mit der Ausbildung von Ascogonen. Die zunächst einzelligen, spiralig eingerollten Ascogone (Abb. 1, a) septieren sich im Verlauf von 1—1,5 Std in 3—5 Zellen (Abb. 1, b). Als nächster Entwicklungsschritt erfolgt die Bildung der primären und sekundären Hüllhyphen. Die primären können einen verschiedenen Ursprung haben. Sie wachsen entweder aus dem Ascogon (Abb. 2, a; 4 Beobachtungen) oder aus der Hyphenzelle, die das Ascogon abschnürte (Abb. 2, b; 28 Beobachtungen), oder einer ihr benachbarten Zelle heraus (Abb. 2, c; 14 Beobachtungen). Sie legen sich um das Ascogon, ohne einen geschlossenen Mantel zu bilden. Das vollständige Einhüllen des Ascogons geschieht durch die sekundären Hüllhyphen, deren Bildung etwa 30—60 min nach der Entstehung der primären einsetzt. Sie können entweder von der Traghyphye selbst oder von einer ihrer Verzweigungen ihren Ausgang nehmen. Nach 3 Std ist das Ascogon fast eingehüllt (Abb. 1, d). Im Verlauf der nächsten Stunden verdichtet sich die Hülle durch weiteres Hyphenwachstum. Das zum Protoperithezium gewordene Ascogon nimmt erheblich an Größe zu, und aus der äußersten

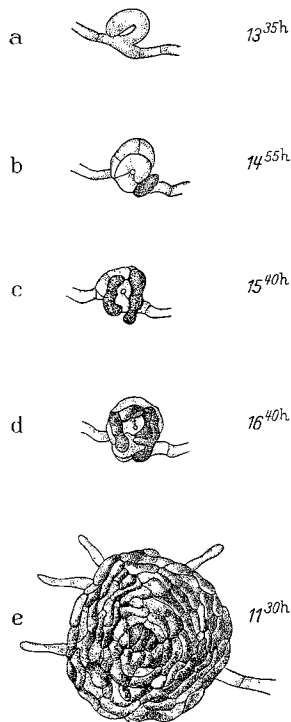


Abb. 1. Aufeinanderfolgende Entwicklungsstadien eines Ascogons bis zum Protoperithezium beim Wildstamm von *Sordaria macrospora*. Zur Unterscheidung zwischen Ascogon und Hüllhyphen sind die letzteren dunkler gezeichnet. Nähere Erläuterungen s. Text (Vergr. 400 ×)

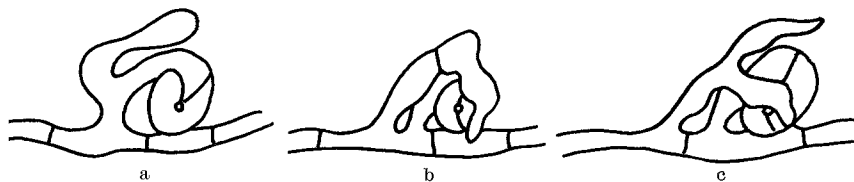


Abb. 2. Übersicht über den Ursprung der primären Hüllhyphen bei der Ascogonentwicklung. Erläuterungen s. Text

Hüllenschicht wachsen strahlenförmig Hyphenspitzen heraus (Abb. 1, e). Die weitere Entwicklung bis zum reifen Perithezium, die in Einzelheiten nicht mehr am lebenden Material beobachtet werden kann, ist nach 6—8 Tagen abgeschlossen.

Häufig konnte die Bildung von sog. Scheinascogonen festgestellt werden. Diese entstehen wie die Ascogone als Hyphenausstülpungen. Sie rollen sich sehr locker spiralig ein und verharren auf diesem Entwicklungsstadium. Die Hüllhyphenbildung bleibt bei diesen Organen aus.

Tabelle 1. Beschreibung der Mutanten von *Sordaria macrospora*. Unter Nr. 0 werden zum Vergleich die Merkmale des Wildstammes angegeben (Erläuterungen s. Text)

1	2	3	4	5			6		7	8	9
				Myzeleigenschaften			Wuchsform	Wachstums- geschwin- digkeit			
Nr.	Bezeichnung	Gen	Verhältnisse bei der Perithezienentwicklung	Farbe	Wuchsform	Wachstums- geschwin- digkeit			Sporenfarbe und -anordnung	Perithezien- größe	
0	Wildstamm	+	fertile Perithezien	farblos	langgestreckte Hyphen	normal	schwarz; linear in Kreuzungs- perithezien grau	normal			
1	<i>cana 1</i>	$c_1$	nur Mycel, keine Ascogone	rosa; Färbung tritt erst nach 14 Tagen ein	kurzellig; reich verzweigt	geringer					
2	<i>cana 2</i>	$c_2$									
3	<i>rosea</i>	$r$		gelblich							
4	<i>citra</i>	$cit$	Ascogone, aber keine Protoperithezien	dunkelbraun	langgestreckte, dicke Hyphen, aus denen rhizoidartig lange dünnere Hyphen entspringen	geringer					
5	<i>spadix</i>	$spd$									
6	<i>pallens</i>	$p$	wenige Protoperithezien, keine Perithezien	weißgelb	welliges Wachstum; hefeartig sprossende Hyphen	geringer					
7	<i>plumata</i>	$pl$	viele Protoperithezien, keine Perithezien	bräunlich	fedrig; Hyphen kurzellig und kurzästig, reich verzweigt	geringer					
8	<i>subfusca 1</i>	$f_1$		braun	bräunlich	wollig, fedrig	etwas geringer				
9	<i>subfusca 2</i>	$f_2$									
10	<i>subfusca 3</i>	$f_3$									
11	<i>lanosa 1</i>	$l_1$	viele Protoperithezien, keine Perithezien	braun	wollig, fedrig	etwas geringer					
12	<i>lanosa 2</i>	$l_2$									

13	<i>sterilis 1</i>	$s_1$	nur sterile Perithezien	bräunlich	zoniert	sehr gering	etwas kleiner
14	<i>sterilis 2</i>	$s_2$		leicht braun			kleiner und runder
15	<i>sterilis 3</i>	$s_3$					kleiner; Anzahl geringer
16	<i>sterilis 4</i>	$s_4$					
17	<i>minima</i>	<i>min</i>	fertile Perithezien, Sporen nicht ausgeschleudert				
18	<i>pauca</i>	<i>pa</i>					
19	<i>non ejaculans</i>	<i>n</i>	fertile Perithezien, Sporen ausgeschleudert				
20	<i>irregularis</i>	<i>ire</i>				nicht linear	kleiner
21	<i>minor</i>	<i>m</i>			bräunlich		
22	<i>lutea</i>	<i>lu</i>			bräunlich	schneller	gelb-ocker
23	<i>crassa</i>	<i>(cr)</i> Chromosomen-Mutante	fertile Perithezien, Sporen ausgeschleudert				größer

Nach unseren Beobachtungen am lebenden Material ist es unwahrscheinlich, daß bei dem vorliegenden Stamm von *Sordaria macrospora* Antheridien gebildet werden. Die von den Ascogonzellen oder den Zellen der Traghyphen auswachsenden Hyphen haben das für Hüllhyphen charakteristische Aussehen. Beobachtungen, die mit dem Phasenkontrastmikroskop zur Zeit des Anlegens von primären Hüllhyphen angestellt wurden, konnten keine Anhaltspunkte für eine Einwanderung von Kernen aus diesen Zellen in das Ascogon liefern. Man muß daher annehmen, daß sich die Ascogone bei dem von uns verwendeten Stamm von *S. macrospora* (wie bei dem von DANGEARD verwendeten Material) apandrisch entwickeln und die Befruchtung autogam erfolgt. Eine apandrische Entstehung der Fruchtkörper konnte von CARR und OLIVE (1958) auch für *Sordaria fimicola* nachgewiesen werden.

II. Die Mutanten

Die entwicklungsgeschichtliche Analyse der 23 isolierten Mutanten mit veränderter Sporenfarbe und Entwicklungsanomalien erfolgte ebenfalls an lebendem Material. Die Charakterisierung der Mutanten ist in Tabelle I gegeben. Kreuzungen der Mutanten mit dem Wildstamm zeigten, daß es sich um 22 monogene Mutanten und um 1 Chromosomenmutante handelt. Ihre Namen wurde nach dem auffallendsten Merkmal gewählt, das bei der Mehrzahl der Mutanten schon makroskopisch zu erkennen

ist. Mutanten, die in allen makroskopisch und mikroskopisch erkennbaren Eigenschaften und auch in ihrem Kreuzungsverhalten (s. S. 737) übereinstimmen, wurden mit dem gleichen Namen benannt und durch einen mit dem Gensymbol verbundenen Index unterschieden.

In der vierten Spalte der Tabelle 1 ist verzeichnet, in welchem Stadium der Entwicklungszyklus bei den einzelnen Mutanten endet bzw. wo die Blockierung im Ablauf der Fruchtkörperbildung liegt. Die Mutanten 19—21 mit den Genen *n*, *ire* und *m* sind zwar selbstfertil, tragen aber insofern einen Defekt der Fruchtkörperbildung, als sie die Sporen nicht ausschleudern. In den Spalten 5—7 sind die vom Wildstamm abweichenden Myzeleigenschaften der Mutanten angegeben. Spalte 8 und 9 zeigen entsprechend die Merkmale der Sporenfarbe und der Perithezien. Aus den Spalten 5—9 ist zu ersehen, daß die analysierten Gene vielfach pleiotrop wirken; mit den Defekten der Fruchtkörperbildung sind häufig auch Veränderungen des Myzelcharakters, der Perithezienform und -größe sowie der Sporenfarbe verbunden. Die Mutanten 1—18 sind also nicht nur steril, sondern durch weitere vom Wildstamm abweichende Merkmale charakterisiert. So zeigt *c* graue Sporenfarbe; *spd* (dattelfarbig) bildet braunes Myzel. Es schien uns zweckmäßig, die einzelnen Sterilitätsgene (1—18) an Hand solcher morphologischer Merkmale zu symbolisieren. Nur die Gene, die äußerlich normal erscheinende, allerdings leere Perithezien hervorrufen, wurden als *sterilis* (*s*) bezeichnet.

Die Perithezien der selbstfertilen Mutante *crassa* (Nr. 23) enthalten Asci mit 8 normal ausgereiften, keimfähigen Sporen. Bei allen Kreuzungen mit *crassa* findet man in den Kreuzungsperithezien nur etwa 10% normale Asci; 15—17% der Asci haben 8 weiße, glasig aussehende, keimungsunfähige Sporen. Die restlichen 73—75% der Asci enthalten 4 schwarze und 4 weiße Sporen. Auf Grund dieser Befunde und unter Berücksichtigung ähnlicher Versuchsergebnisse an *Neurospora crassa* (McCLINTOCK 1945) kann man annehmen, daß die Eigenschaft „*crassa*“ (dickere Perithezien) durch Chromosomenmutation (Inversion oder reziproke Translokation) ausgelöst wurde. Infolge der Chromosomenmutation entstehen im Verlauf der Ascusentwicklung durch crossingover zwischen mutierten und normalen Chromosomen weiße, letale Sporen.

Die den Entwicklungszyklus betreffenden Defekte der Genmutanten lassen sich schematisch in übersichtlicher Form darstellen (Abb. 3).

Die in Abb. 3 und auch bei der Charakterisierung der Mutanten (Tabelle 1) angegebenen Verhältnisse der Perithezienentwicklung sind vereinfacht erfaßt. So ist z. B. für die Mutanten *cit*, *spd* und *p*, die sich in Kreuzungen als Nicht-Allele erweisen, angegeben, daß die Ascogone ausgebildet, aber nicht weiterentwickelt werden. Trotzdem ist die Sistierung der Entwicklung bei den 3 Mutanten nicht identisch. In der Entwicklungsgeschichte lassen sich zwar keine Differenzen finden, doch liegen verschiedene Genwirkungen vor. Die im folgenden Kapitel darzustellenden Kreuzungen bzw. Kompensationswirkungen werden dies veranschaulichen.

Bei der selbstfertilen Mutante *lu* (gelbe Sporen) fehlt die Ausbildung des schwarzen Pigmentes in den Sporenwänden. Durch diesen Defekt wird die Fähigkeit, Sporen auszuschleudern, aber nicht berührt. Die Mutante *ire* vollzieht die Entwicklung der Fruchtkörper normal bis zu dem Zeitpunkt, in dem über die Anordnung der Sporen im Ascus entschieden wird. Die Sporen dieser Genmutante sind ungeordnet und werden nicht ausgeschleudert; in Färbung und Keimungsfähigkeit gleichen sie denen des Wildstammes.

Es war von vornherein zu erwarten, daß bei der Untersuchung der genetischen Bedingungen für die Fruchtkörperbildung eine ähnliche Situation wie bei der Synthese der Inhaltsstoffe von *Neurospora crassa* angetroffen würde: Die einzelnen Schritte sind von einzelnen Genen abhängig. Aber die Parallelität führt noch weiter, indem bei Kombination von Stämmen, die steril, aber phänotypisch verschieden sind, eine Kompensation der Defekte möglich ist. (Kompensation

nichtalleler Ernährungsdefekte im Heterokaryon, BEADLE und COONRADT 1944.) Die Analyse der dadurch möglichen Kreuzbarkeit wird im folgenden zunächst beschrieben werden. Bei diesen Kreuzungsanalysen wurde ein Phänomen beobachtet, das über die Befunde bei *Neurospora* hinausgeht: Aus dem Heterokaryon

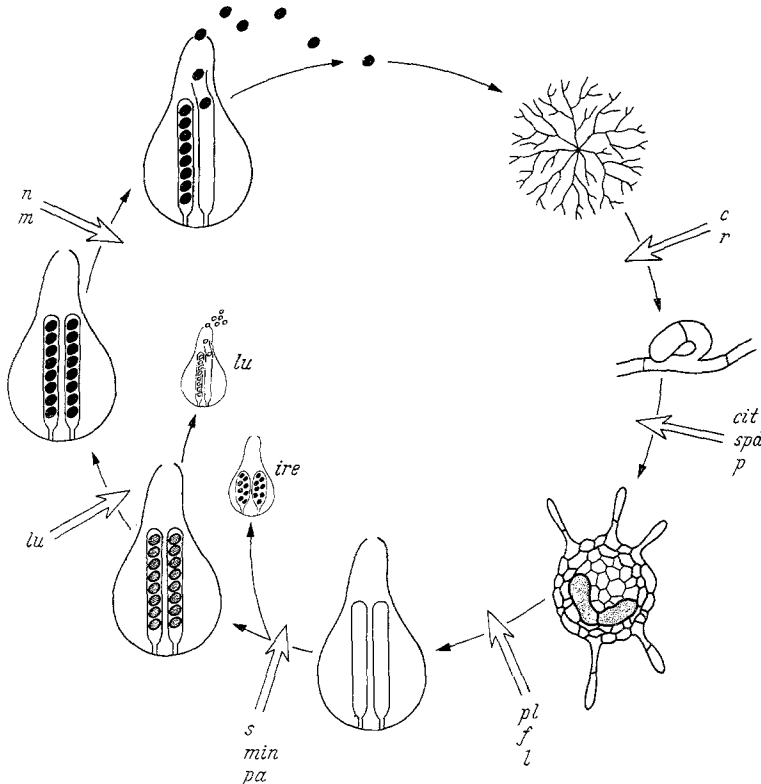


Abb. 3. Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *Sordaria macrospora*. Die von den Gensymbolen ausgehenden Pfeile geben an, nach welcher Entwicklungsstufe die Perithezienbildung bei den einzelnen Mutanten blockiert ist. Weitere Erläuterungen s. Text

entstehen auch Fruchtkörper, deren Asci nur *eine* Kernkomponente enthalten und die deshalb Selbstungsperithezien darstellen.

## D. Genetische Untersuchungen

### I. Die Kompensation genbedingter Defekte der Fruchtkörperentwicklung

Die Genmutanten wurden in den möglichen Kombinationen miteinander gekreuzt, wobei jeweils ein Kreuzungspartner mit einem Sporenfarb-Gen markiert war (*lu* oder *c<sub>1</sub>*). Durch diese Versuchsanordnung war es möglich, Kreuzungsasci (4 schwarze, 4 Sporen mit Mutantenfarbe) und Selbstungsasci (8 schwarze bzw. 8 Mutantensporen) zu unterscheiden. Jede Kreuzung wurde mindestens dreimal wiederholt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 4 schematisch dargestellt.

Auf Grund dieser Versuche lassen sich die folgenden Aussagen machen:

1. *Alle Mutanten*, sowohl die selbstfertilen als auch die sterilen, sind mit Ausnahme der phänotypisch identischen Stämme (z.B. *f<sub>1</sub>*, *f<sub>2</sub>*, *f<sub>3</sub>*) *miteinander*

fertil kreuzbar. Dies gilt auch für Mutanten, die in Einzelsporkultur keine Ascogone bilden (*r*, *c*<sub>1</sub>, *c*<sub>2</sub>). In der Kontaktzone zweier Stämme entsteht entweder eine Linie von Perithezien (Abb. 5a) oder eine mehr oder minder breite Zone von

Stadien der Blockierung in der Fruchtkörperbildung																									
	<i>c</i> <sub>1</sub>	<i>c</i> <sub>2</sub>	<i>r</i>	<i>cit</i>	<i>spd</i>	<i>p</i>	<i>pl</i>	<i>f</i> <sub>1</sub>	<i>f</i> <sub>2</sub>	<i>f</i> <sub>3</sub>	<i>l</i> <sub>1</sub>	<i>l</i> <sub>2</sub>	<i>s</i> <sub>1</sub>	<i>s</i> <sub>2</sub>	<i>s</i> <sub>3</sub>	<i>s</i> <sub>4</sub>	<i>min</i>	<i>pa</i>	<i>n</i>	<i>ire</i>	<i>m</i>	<i>lu</i>	<i>cr</i>	+	
	<i>c</i> <sub>1</sub>	○	○	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉
	<i>c</i> <sub>2</sub>		○	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉
	<i>r</i>			○	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉
	<i>cit</i>			○	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉
	<i>spd</i>				○	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉
	<i>p</i>					○	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉
	<i>pl</i>						○	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉
	<i>f</i> <sub>1</sub>							○	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉
	<i>f</i> <sub>2</sub>								○	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉
	<i>f</i> <sub>3</sub>									○	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉
	<i>l</i> <sub>1</sub>										○	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉
	<i>l</i> <sub>2</sub>											○	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉
	<i>s</i> <sub>1</sub>												○	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉
	<i>s</i> <sub>2</sub>													○	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉
	<i>s</i> <sub>3</sub>														○	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉
	<i>s</i> <sub>4</sub>															○	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉
	<i>min</i>																○	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉
	<i>pa</i>																	○	☉	☉	☉	☉	☉	☉	☉
	<i>n</i>																		○	☉	☉	☉	☉	☉	☉
	<i>ire</i>																				○	☉	☉	☉	☉
	<i>m</i>																					○	☉	☉	☉
	<i>lu</i>																						○	☉	☉
	<i>cr</i>																							○	☉
	+																								○

Abb. 4. Kreuzbarkeits-Test der Mutanten von *Sordaria macrospora*. Die Mutanten sind entsprechend ihrer Unterschiede im Entwicklungszyklus gruppiert. Es bedeutet: ☉ kreuzbar, ○ nicht kreuzbar, ☉ Mutante zu Selbstungsperithezien induzierbar

Fruchtkörpern, die sich über beide (Abb. 5b) oder einen der Kreuzungspartner ausdehnt (Abb. 5c).

Auch bei Verwendung von Mutanten der Perithezienform (*cr*, *m*) gleichen diese Kreuzungsperithezien im Habitus den Fruchtkörpern des Wildstammes. Sie enthalten Asci mit normalen Sporen, die bei der Reife ausgeschleudert werden.

2. Durch Tetradenanalyse konnte festgestellt werden, daß die Gene der miteinander kreuzbaren Mutanten keine Allele sind, denn in allen Kreuzungen



finden wir neben Ascii mit Parentaltypen auch Rekombinationsascii (4 Wildsporen/4 Sporen der Doppelmutante) und Tetratyp-Ascii, die je 2 Sporen der Eltern- und Rekombinationstypen enthielten. Über das gegenseitige Verhältnis der Gene in phänotypisch identischen Stämmen (z. B.  $f_1, f_2, f_3$ ) kann zunächst nichts ausgesagt werden, da sie nicht kreuzbar sind. Aber die Auswertung des Heterokaryontestes (s. S. 738) ließ auf Allelie innerhalb der Mutantengruppen  $c, i, f$  und  $l$  schließen.

3. Die sterilen Mutanten  $r, spd, f_1, f_2, f_3$  sind in der Lage, *in allen fruchtbaren Kreuzungen auch Selbstungsperithezien zu bilden*. Die Mutante *ire* (Sporen im Ascus nicht linear angeordnet) zeigt in allen Kreuzungen neben Kreuzungsperithezien auch Selbstungsperithezien, deren Ascii 8 *ire*-Sporen enthalten; sie sind linear angeordnet! Auf diese Erscheinung der *Induktion* soll im nächsten Kapitel eingegangen werden.

Es erhebt sich die Frage, auf welche Weise die Kreuzungsperithezien steriler Mutanten zustande kommen. Wie im ersten Kapitel nachgewiesen wurde, entwickeln sich die Ascogone apandrisch. In die Ascogone, aus denen Kreuzungsperithezien entstehen, müssen demnach die beiden genetisch verschiedenen Kerne vor der Ascogondifferenzierung eingewandert sein. Es liegt der Gedanke nahe, daß sich bei der Berührung der heterogenen Hyphen ein Heterokaryon bildet. In einem solchen Heterokaryon, das entweder durch Einwandern der einen Kernart in die Hyphen des Kreuzungspartners (die Querwände sind perforiert) oder durch Neubildung von Hyphen aus Anastomosen, die sehr häufig zu erkennen sind, entstehen kann, trägt jede Kernkomponente das Wildgen für den Defekt der anderen Kernart. Diese Annahme, nach der sich die genbedingten Defekte im Heterokaryon gegenseitig kompensieren, wurde durch den „Hyphen-spitzentest“ bestätigt.

Von einer 3 Tage alten Kreuzung zwischen den Mutanten  $f_1$  (bildet Protoperithezien) und  $s_1$  (bildet sterile Perithezien) wurden aus der Kontaktzone 40 etwa 1 mm<sup>3</sup> große Agarblöckchen mit Myzel entnommen und auf einen 7%igen Wasseragar übertragen. Da auf diesem nährstoffarmen Medium nur ein sehr spärliches, wenig verzweigtes Myzel gebildet wird, konnten nach 24 Std von jeder Kultur je 5 1–3zellige Mycelspitzen isoliert werden. Diese übertrugen wir auf den normalerweise verwendeten Maisagar. Alle 200 Kulturen entwickelten sich zu Myzelien, die phänotypisch dem Wildstamm glichen, und bildeten zahlreiche Perithezien aus. Wie zu erwarten, entstanden neben den normalen Perithezien mit reifen Sporen auch sterile  $s_1$ -Fruchtkörper, und zwar im Durchschnitt 20% (je Kultur wurden 10 Perithezien untersucht). Die genetische Analyse der normalen Perithezien zeigte die gleichen Ergebnisse wie die Kreuzung beider Mutanten. Es entstanden Kreuzungsascii und Selbstungsascii. Die 200 ausgesäten Hyphenspitzen waren also alle heterokaryotisch.

Die *Kompensierbarkeit von Mutanteneigenschaften durch das Wildgen gilt allgemein*. So bildet ein Heterokaryon aus 2 Mutanten ( $c_1$  und  $r$ ), die in Einzelkultur keine Ascogone aufweisen, zahlreiche Ascogone, die sich normal entwickeln; das Heterokaryon aus  $r$  und  $cit$ , die bei Einzelkultur verminderte Wachstumsgeschwindigkeit besitzen, wächst normal; alle Heterokaryen aus pigmentbildenden Mutanten ( $spd, l_1, l_2$  usw.) sind wie der Wildstamm grau-weiß gefärbt; in jedem Heterokaryon mit *plum* ist das typische fedrige Wachstum dieser Mutante verschwunden.

*Es ist somit bewiesen, daß sterile Mutanten von Sordaria macrospora infolge einer Heterokaryonbildung fertile Kreuzungsperithezien bilden können. Durch die*

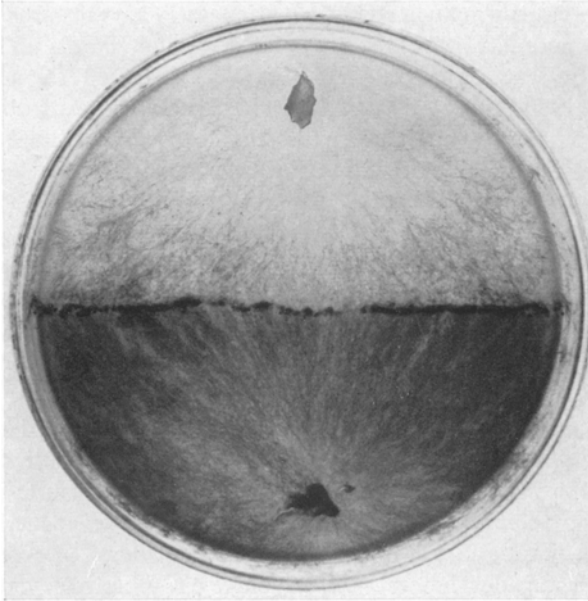


Abb. 5 a. Kreuzungen zwischen sterilen Mutanten von *Sordaria macrospora*. Die Perithezienbildung erfolgt: a nur in der Kontaktzone, Kreuzung  $f_1 s_1 spd^+ \times f_1^+ s_1^+ spd$

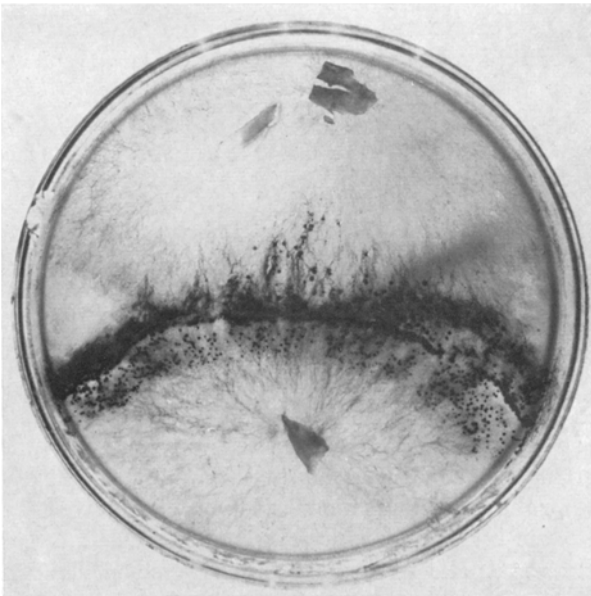


Abb. 5 b auf beiden Mutanten, in der Kreuzung  $f_1 s_1 c^+ \times f_1^+ s_1^+ c$

*Kompensationswirkung der Wildgene ist das Heterokaryon befähigt, die einzelnen Defekte der mutierten Kerne zu überwinden und einen normalen Entwicklungszyklus zu vollziehen.*

Bei Zwei- und Mehrfaktormutanten, die im Verlauf unserer Kreuzungsexperimente erhalten wurden, ist eine Kompensation infolge des Fehlens der entsprechenden Wildgene natürlich nicht möglich. Z. B. die farblose Mutante  $c_1$  bildet keine Ascogone und die dunkelpigmentierte Mutante  $n$  nur normale Perithezien aus, deren Sporen nicht ausgeschleudert werden. Die Doppelmutante  $c_1 n$  vereint die Eigenschaften beider Mutanten: sie ist dunkelpigmentiert und trägt keinerlei Geschlechtsdifferenzierungen.

Bei Kreuzungen von Mehrfaktormutanten können Defekte nur in dem Maße kompensiert werden, wie Wildgene vorhanden sind. So entstehen aus  $s_1 f_1 c_1 \times s_1^+ f_1^+ c_1^+$  nur sterile Perithezien, da keiner der beiden Partner das Wildgen besitzt, das den Defekt von  $s_1$  kompensieren könnte.

Nach Kenntnis der Kompensationswirkung nicht-alleler Wildgene läßt sich auch die Allelie der Gene gleicher Merkmalsausprägung mit Hilfe des Heterokaryontestes nachprüfen. In Analogie zu den bei *Neurospora crassa* bekannten Befunden (GARNJOBST 1953, 1955,

GARNJOBST und WILSON 1956) wäre es denkbar, daß die Nichtkreuzbarkeit dieser Stämme auf ihrer Unfähigkeit beruhen würde, Heterokaryen zu bilden. Diese Möglichkeit konnte jedoch ausgeschlossen werden, da Heterokaryen unter

Anwendung der Hyphenspitzenmethode (s. S. 737) nachzuweisen waren, nachdem ein Kreuzungspartner durch das Farbgem *lu* markiert wurde.

II. Die Induktion normaler Fruchtkörperbildung bei Defektmutanten, besonders bei sterilen

Die Induktion von gesunden Fruchtkörpern aus sterilen Mutanten wurde zuerst bei der genetischen Analyse der Kreuzung  $s_1f_1^+$  (sterile Perithezien)  $\times$   $s_1^+f_1$  (Protoperithezien) beobachtet (ESSER und STRAUB 1956). Die Untersuchung von 164 Perithezien aus dieser Kreuzung ergab neben 29 sterilen  $s_1f_1^+$ -Selbstungsperithezien noch 135 Fruchtkörper mit normalen Asci, die sich nach der Aussaat in die folgenden Typen unterteilen ließen:

1. 47 enthielten ausschließlich Asci, deren Sporen in Eltern- und Rekombinationstypen aufspalteten (Kreuzungsperithezien),

2. 31 besaßen ausschließlich Sporen vom Elterntyp  $s_1^+f_1$  (Selbstungsperithezien),

3. 57 enthielten sowohl Kreuzungs- als auch Selbstungasoci (Mischperithezien). Selbstungasoci oder Selbstungsperithezien des Elterntyps  $s_1f_1^+$  mit normalen Sporen wurden nicht gefunden.

Zur Erklärung dieser Ergebnisse muß man von den beiden Tatsachen ausgehen, daß sich die Ascogone apandrisch zu Perithezien entwickeln, und daß bei Kreuzung von 2 Mutanten zunächst ein Heterokaryon entsteht. Durch die Kompensationswirkung der Gene  $s_1^+$  und  $f_1^+$  besitzt das Heterokaryon  $s_1f_1^+ + s_1^+f_1$  die notwendigen Wildgene. Wenn beide Kernarten in ein Ascogon gelangen, entstehen naturgemäß Kreuzungsperithezien. Entgegen der Erwartung bilden Ascogone mit  $s_1^+f_1$ -Kerne fertile Selbstungsperithezien, wenn sie im Heterokaryon liegen. Man muß daher annehmen, daß die Anwesenheit der  $s_1f_1^+$ -Kerne in den Nachbarhyphen dieser Ascogone genügt, um die Entwicklung von  $s_1^+f_1$ -Ascogonen auch über das Stadium des Protoperitheziiums hinaus bis zum normalen Perithezium zu ermöglichen. In diesem Sinne induzieren  $f_1^+$ -Kerne im Heterokaryon die Perithezienbildung der sonst sterilen  $f_1$ -Ascogone. Der Befund, daß nur die  $f_1$ -Ascogone, nicht auch die  $s_1$ -Ascogone, zur Bildung normaler Fruchtkörper induziert werden können, ist zunächst nicht erklärbar.

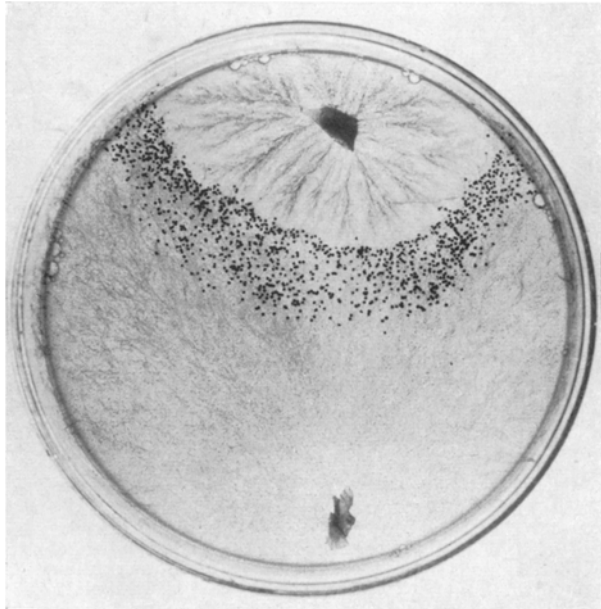


Abb. 5c auf einer Mutante ( $f_1$ ), in der Kreuzung  $f_1pl^+ \times f_1^+pl$  (Verkl. 1,3  $\times$ )

Die Entstehung von Mischperithezien mit Selbstungs- und Kreuzungsasci läßt vermuten, daß die Ascogone mehr als 2 Initialkerne enthalten. Folgende Experimente bestätigten die Vermutung:

Aus dem Wildstamm (schwarze Sporen) und der Mutante *lu* (gelbe Sporenfarbe) stellten wir ein Heterokaryon  $lu^+ + lu$  her. Dieses kreuzten wir mit der Mutante  $c_1$  (keine Ascogonbildung, in Kreuzungen graue Sporenfarbe). Die in der Kontaktlinie zwischen dem Heterokaryon und  $c_1$  entstehenden Kreuzungsperithezien wurden untersucht. Von 1026 Perithezien waren 790 Kreuzungsperithezien. Sie enthielten nur Ascus von je einer der drei möglichen Kernkombinationen. (Selbstungsperithezien wurden nicht mitgezählt.) Die restlichen 236 Frucht-

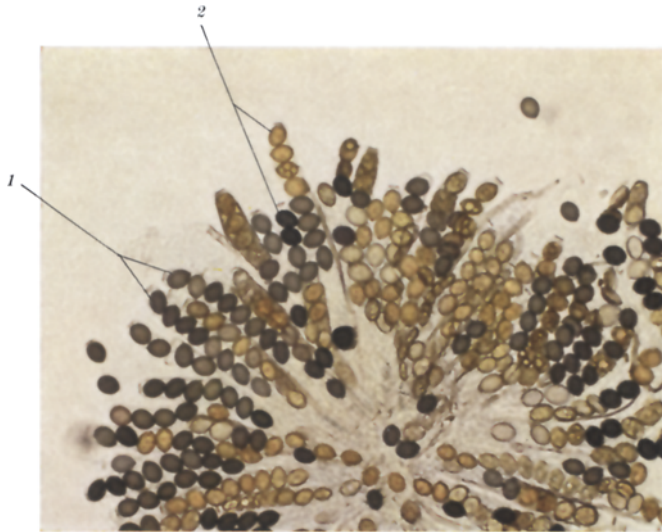


Abb. 6. Ascus eines Mischperitheziiums aus der Kreuzung des Heterokaryons  $lu^+ + lu$  mit der Mutante  $c_1$ . Die Initialkernpaare der Ascus besaßen entweder die genetische Konstitution  $c_1lu^+/c_1^+lu^+$  oder  $c_1lu^+/c_1^+lu$ . Der linke Pfeil (1) weist auf zwei Ascus mit einer  $c_1^+/c_1$  Aufspaltung hin. Der untere Ascus enthält 4 schwarze und 4 graue Sporen ( $c_1^+/c_1$  ist präreduziert); der obere enthält 2 graue, 2 schwarze, 2 graue, 2 schwarze Sporen ( $c_1^+/c_1$  ist postreduziert). Der rechte Pfeil (2) weist auf zwei Ascus mit der bifaktoriellen Aufspaltung  $c_1^+lu^+/c_1lu$  hin. Im oberen Ascus befinden sich 4 gelbe und 4 graue Sporen (Elterntyp; beide Genpaare präreduziert), im unteren Ascus sind 2 schwarze, 2 graue, 2 gelbe und 2 weiße enthalten (Tetratyp;  $c_1^+/c_1$  ist postreduziert,  $lu^+/lu$  ist präreduziert)

körper waren Mischperithezien. Davon enthielten 214 Kreuzungsasci, die in schwarz/gelb aufspalteten, und daneben gelbe bzw. schwarze Selbstungsasci. Graue Selbstungsasci waren nicht zu erwarten, da  $c_1$  niemals zur Bildung von Selbstungsasci induziert werden kann. Die restlichen 22 Perithezien besaßen neben Ascus mit 4 grauen und 4 schwarzen Sporen auch Ascus, deren Initialkerne  $c_1$  und  $lu$  enthalten mußten. Die letzteren enthielten entweder vier graue und vier gelbe Sporen (Elterntyp) oder vier schwarze und vier weiße Sporen (Rekombinationstyp) oder je zwei schwarze, graue, gelbe und weiße Sporen (Tetratyp) (s. Abb. 6).

Damit ist bewiesen, daß die Ascogone von *Sordaria macrospora* mehr als zwei Initialkerne enthalten können. Der Inhalt der Mischperithezien spricht aber dafür (vgl. auch Tabelle 2 und 3), daß die Zahl der Kernpaare, die zu Beginn der Ascogonentwicklung vorliegen, höchstens zwei beträgt.

Das Vorhandensein von mehr als 2 Initialkernen ist für *Sordaria fimicola* und *Neurospora crassa* durch die Untersuchungen von GREIS (1941), OLIVE (1956) bzw. SANSOME (1947) bekannt.

Die Mutante  $f_1$  ist nicht nur in der Kreuzung mit  $s_1$  induzierbar, sondern auch in Kreuzungen mit allen anderen Mutanten. Die gleiche Eigenschaft zeigen

auch die beiden anderen Mutanten der *f*-Serie,  $f_2$  bzw.  $f_3$  (s. Abb. 4). Wie die folgenden Befunde zeigen werden, lassen sich auch Ascogone mit *r*- und *spd*-Kernen von allen anderen Mutanten induzieren. Infolgedessen entstehen bei den möglichen Kreuzungen der *f*-Serie mit *spd*- oder *r*-Stämmen Selbstungsperithezien beider Kerntypen (Abb. 4 und Tabelle 2).

Tabelle 2. Perithezientypen aus der Kreuzung der Mutante  $f_1$  mit den Mutanten *spd* und *r*. In beiden Fällen war  $f_1$  mit dem Gen *lu* (gelbe Sporenfarbe) markiert

Kreuzung	Anzahl	Kreuzungs- perithezien	Selbstungs- perithezien		Mischperithezien Selbstungsasci vom	
			Elter 1	Elter 2	Elter 1	Elter 2
$f_1spd^+ \times f_1^+spd$	263	82	160	5	11	5
$f_1r^+ \times f_1^+r$	219	41	140	12	23	3

Es ist auffallend, daß in beiden Kreuzungen nur 2 Typen von Mischperithezien beobachtet wurden, und zwar solche, die neben Kreuzungsasci nur Selbstungsasci vom einen oder anderen Elter enthielten. Die zu erwartenden Mischperithezien mit Selbstungsasci beider Eltern traten nicht auf. Auch finden sich keine Kreuzungsperithezien mit Selbstungen beider Elterntypen.

Die bisher dargestellten Induktionen normaler Perithezien aus Ascogonen, die nach ihrem Gengehalt steril sein müßten, werden dadurch charakterisiert, daß von den heterokaryotischen benachbarten Hyphen Wirkungen ausgehen, durch welche die zu erwartende Sistierung der Entwicklung überwunden wird. Die Induktion beschränkt sich jedoch nicht auf die Ausschaltung von Entwicklungshemmungen allein. Die selbstfertile Genmutante *ire* bildet Ascii mit nicht linear angeordneten Sporen. Die Entwicklung der *ire*-Perithezien trägt sonst normalen

Tabelle 3. Perithezientypen aus der Kreuzung der Mutanten  $f_1$  und *ire*.  $f_1$  war mit dem Gen für gelbe Sporenfarbe (*lu*) markiert

Anzahl	Kreuzungs- perithezien	Selbstungsperithezien			Mischperithezien Selbstungsasci mit	
		$f_1$	<i>ire</i>		$f_1$	<i>ire</i>
			ungeordnet	linear		
75	33	10	15	10	2	5

Charakter. (Wir sehen hier von der Unfähigkeit Sporen auszuschleudern ab.) Kreuzt man *ire*-Stämme mit irgendeiner der anderen Mutanten oder mit dem Wildstamm, so treten neben Kreuzungsperithezien und Selbstungsperithezien mit *ire*-Charakter auch Selbstungsperithezien auf, die Ascii mit *ire*<sup>+</sup>-Anordnung der Sporen besitzen (=linear angeordnet), obwohl alle Sporen *ire* enthalten. Ferner finden sich wieder 2 Typen von Mischperithezien (Tabelle 3).

Weitere Kreuzungen zwischen *ire*- und anderen Mutanten-Stämmen erbrachten die gleichen Ergebnisse. Sie beweisen, daß nicht nur Entwicklungsdefekte, sondern auch Entwicklungsanomalien durch Induktionswirkung des Heterokaryons aufgehoben werden können. Diese Befunde veranlaßten dazu, die Frage zu prüfen, ob die stoffliche Grundlage der Induktionswirkung faßbar ist.

### III. Versuche zur Aufklärung des Induktionsmechanismus

Zu diesen Versuchen wurden die Mutanten  $f_1$  und  $s_1$  verwendet. Der Protoperithezien bildende Stamm  $f_1$  wird durch den sterile Perithezien bildenden Stamm  $s_1$  zur normalen Fruchtkörperbildung induziert.

Wir führten folgende Experimente unter Verwendung von flüssigen Nährmedien aus:

1. Filtrate verschieden alter Kulturen der Mutante  $s_1$  wurden zu Kulturen von  $f_1$  gegeben.
2. Extrakte von 4, 5 und 6 Tage alten  $s_1$ -Myzelien gaben wir zu 2 und 3 Tage alten Kulturen von  $f_1$ . Die Extrakte wurden durch Zerreiben der zwischen Filtrierpapier getrockneten Myzelien mit Quarzsand hergestellt. Vor der Zugabe wurden die Extrakte zentrifugiert und durch Filtration (SEITZ) sterilisiert.

3. Beide Mutanten wurden in einem gemeinsamen Medium kultiviert, dabei aber durch eine Glasfritte (G 5 Schott & Gen.) oder eine Dialysiermembran (Kalle) oder ein Membranfilter (mit maximaler Porenweite von 400—500  $m\mu$ , Membranfilter AG, Göttingen) getrennt gehalten. Wir verwendeten dazu eine Glasröhre ( $\varnothing$  5 cm, Länge 20 cm), in deren Mitte die Fritte bzw. die Membran eingesetzt werden konnte. Die Enden der Röhre waren nach oben gebogen und während des Versuchs mit einem Wattestopfen verschlossen.

4. Ein Reagenzglas ( $\varnothing$  3,5 cm) wurde mit Nährlösung halb gefüllt und mit  $s_1$ -Mycel beimpft. In dieses Glas tauchte ein mit der gleichen Nährlösung gefüllter Dialysierschlauch ( $\varnothing$  2 cm) bis fast zum Grunde ein; er war mit  $f_1$ -Myzel beimpft. In mehreren Versuchen wurde auch reziprok beimpft.

Die Versuche Nr. 1 und 2 verliefen negativ, d. h., der  $f_1$ -Stamm bildete keine Perithezien mit reifen Sporen. Bei den Experimenten Nr. 3 und 4 fanden wir in Einzelfällen wenige Perithezien mit  $f_1$ -Sporen. Da aber auch in den Kontrollen einige „ $f_1$ -Perithezien“ gebildet wurden, ist der Einfluß der Kultur im synthetischen Medium nicht auszuschließen. Der  $f_1$ -Stamm bildet auch auf Agar einzelne Perithezien, wenn das synthetische Medium statt des üblichen Maismehldekokts verwendet wird.

Es ist immer mißlich, aus negativen Ergebnissen Schlüsse ziehen zu müssen. Zusammenfassend können wir zunächst nicht mehr sagen, als daß eine Induktion durch Extrakte aus an sich zur Induktion fähigem Material nicht gelang, wobei mit den Möglichkeiten gerechnet werden muß, 1. daß das wirksame Agens nicht in den Extrakt gelangte, 2. daß es dort zerstört wurde oder 3. daß es nicht in die zu induzierenden Zellen gelangte. Für die Diffusionsversuche gilt sinngemäß dasselbe, und hier kommt noch hinzu, daß die gesuchten Stoffe, sollten sie aus dem Induktor hinaus und das zu Induzierende hineindiffundieren können, vielleicht die von uns verwendeten Membranen nicht passieren konnten.

### E. Diskussion

Der monözische selbst-compatible Ascomycet *Sordaria macrospora* bildet seine Fruchtkörper apandrisch. Zwei Individuen können daher nur gekreuzt werden, wenn sich ein Heterokaryon aus beiden zu entwickeln vermag. Dies ist bei den hier verwendeten Stämmen offenbar immer der Fall. Pilzhyphe, die Kerne verschiedener Herkunft in sich vereinigen, entstehen durch zufälliges Fusionieren. Danach liegen die heterogenen Kerne in einem gemeinsamen Plasma. Wenn sich die beiden Kernarten dadurch unterscheiden, daß sie nicht-allele Gene tragen, welche bestimmte, voneinander verschiedene Defekte der Fruchtkörperbildung bewirken, so ist es verständlich, daß das Heterokaryon normale Perithezien bildet, denn die Defekte werden durch die Gegenwart der Wildgene aufgehoben. Zum Beispiel kann sich in dem Heterokaryon mit den Kernen  $r\ spd^+$  und  $r^+\ spd$  weder der durch  $r$  bedingte Ausfall noch der von  $spd$  einstellen, da die allelen Wildgene, also  $spd^+$  und  $r^+$ , vorhanden sind. Defekte, die durch verschiedene Genwirkungen zustande kommen,

werden im Heterokaryon kompensiert. Was hier für Blockierungen in der Entwicklung der Fortpflanzungsorgane und für morphologische Merkmale der Myzelien gezeigt wurde, ist bei *Neurospora crassa* an auxotrophen Mutanten bereits 1944 von BEADLE und COONRADT analysiert worden. Das Phänomen dürfte weit verbreitet sein. Sein Wesen kann als Symbiose aufgefaßt werden, wobei sich die Partner nur in Genen unterscheiden.

Auf Grund dieser genetisch fundierten Interpretation der Kreuzbarkeit steriler Stämme lassen sich die Befunde sinnvoll interpretieren, die GREIS (1941) an einer anderen *Sordaria*-Art machte. GREIS hatte bei *Sordaria fimicola* nach Röntgenbestrahlung eine große Zahl Steriler erhalten. Myzelien, die keine Ascogone ausbildeten, nannte er „Männchen“; solche, die Ascogone zeigten, aber keine Fruchtkörper zur Reife brachten, „Weibchen“. „Männchen“ und „Weibchen“ waren miteinander kreuzbar. In einigen Fällen waren auch „Weibchen“ und „Männchen“ unter sich kreuzbar. GREIS erklärte seine Befunde auf der Grundlage relativer Sexualität und schrieb den miteinander kreuzbaren „Männchen“ bzw. „Weibchen“ eine verschieden starke sexuelle Potenz zu. Diese Interpretation läßt sich nach den heutigen Kenntnissen der Tetradenanalyse unter Zuhilfenahme der Angaben von GREIS eindeutig widerlegen. Zwei Beispiele mögen genügen:

1. Bei Kreuzung eines struppigen, weißen Myzels („Männchen“) mit einem glatten, schwarzen („Weibchen“) findet GREIS in einem Tetratyp-Ascus neben den Eltern Nachkommen mit glattem, weißem, selbstfertilem Myzel und struppigem, schwarzem, sterilem ohne Ascogone. Er deutet die letzteren als „sekundären Zwitter“ bzw. „realisatorloses Myzel“. In Wirklichkeit muß es sich dabei um Wildstamm und Doppelmutante gehandelt haben.

2. GREIS fand nach Kreuzung eines Myzeliums, das zahlreiche Ascogone besaß, mit einem ascogonarmen in einem Ascus eine 1:1-Aufspaltung in beide Elterntypen. Das Zustandekommen dieser Kreuzungsperithezien hat mit relativer Sexualität, die GREIS zur Erklärung heranzieht, nichts zu tun. Sie ist vielmehr auf Heterokaryonbildung und die damit verbundene Kompensationswirkung zurückzuführen.

HÜTTIG (1935) glaubte die Kreuzbarkeit steriler Stämme der monözischen selbst-compatiblen *Glomerella lycopersici* mit fertilen Varianten auf relative Sexualität zurückführen zu können. Die Unhaltbarkeit dieser Vorstellung haben bereits WHEELER und seine Mitarbeiter in mehreren Untersuchungen (siehe zusammenfassende Darstellung bei WHEELER 1954) dargelegt. Sie konnten nachweisen, daß bei *Glomerella cingulata*, deren Ascogone von Antheridien befruchtet werden (MCGAHEN und WHEELER, 1951), sterile Myzelien (Weibchen und Männchen) nur dann kreuzbar sind, wenn ihre Sexualdefekte durch nicht-allele Gene bedingt sind.

OLIVE (1956) führte seine Kreuzungsversuche wie GREIS an *Sordaria fimicola* aus, und zwar arbeitete er hauptsächlich mit Mutanten der Sporenfarbe. Daneben konnte er auch schwach fertile und völlig sterile Mutanten isolieren. Die sterilen waren mit allen fertilen Mutanten kreuzbar. OLIVE sieht die Grundlage der Kreuzbarkeit in einer „interaction between the two genotypes in a common cytoplasm“ nach erfolgter Heterokaryonbildung<sup>1</sup>. Diese Interpretation stimmt mit unserer Erklärung, die das Wesen der Kreuzungsfertilität steriler Stämme monözischer selbst-compatibler Ascomyceten in der Kompensationswirkung sieht, völlig überein.

<sup>1</sup> Anmerkung bei der Korrektur: Siehe auch die sich zur Zeit im Druck befindenden Arbeiten von: CARR, A. J. H., and L. S. OLIVE: Genetics of *Sordaria fimicola*. III. Cross-compatibility among self-fertile and self-sterile cultures. Amer. J. Bot. HESLOT, H.: Contribution à l'étude cytogénétique des *Sordariacées*. Rev. Cytol. et Biol. vég. (1958).

Die Kompensierbarkeit heterogener Defekte ist nicht auf kernhaltige Organismen beschränkt. BENZER (1955) sowie ESSER, ERBEN und FÄHRICH (1957) konnten zeigen, daß sie ihre Wirkung auch nach Mischinfektion eines Bakteriums mit heterogenen Bakteriophagen entfaltet.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Bildung von normalen Perithezien aus sterilen Myzelien beschrieben, wobei alle Sporen eines Ascus das gleiche Sterilitätsgen tragen. Es handelt sich also um Selbstungsperithezien, die im Heterokaryon ausgelöst werden. Die Induktion der Selbstungsperithezien steriler Mutanten setzt voraus, daß sich Kerne in der Nähe befinden, die den Defekt der Mutanten kompensieren können. So bildet der Stamm  $r$  (Myzel ohne Ascogone) in Kreuzungen mit allen anderen Mutanten Ascogone, die sich zu Selbstungsperithezien entwickeln, indem der  $r^+$ -Kern des jeweiligen Kreuzungspartners die  $r$ -Wirkung aufhebt, ohne selbst bei der Karyogamie beteiligt zu sein. Die Induktionserscheinung beruht also auf einer Kompensation, deren Wirkung über die Einzelzelle hinausgreift.

Natürgemäß erheben sich die Fragen nach dem Ort, von welchem die Induktion des kompensierenden Gens ausgeht, und dem Weg, den die Wirkung nimmt. Man könnte zunächst daran denken, daß sich die Induktion unmittelbar im Ascogon abspielt. Wenn etwa das Heterokaryon aus der Kreuzung von  $f^+$  mit  $f$  Ascogone bildete, deren Initialkernpaare  $f^+ + f$  und  $f + f$  enthielten — die Existenz von 2 Initialkernpaaren ist nachgewiesen (s. S. 740) — so würde der  $f^+$ -Kern die Weiterentwicklung des  $f^+$ -Paares ermöglichen. Gegen diese Vorstellung spricht aber das häufige Auftreten der Mischperithezien, in denen beide Initialkernpaare zur Entwicklung gelangen. Daher ist es wahrscheinlicher, daß die Induktionswirkung von den Kernen benachbarter Teile des Myzeliums ausgeht. Wenn man eine Vorstellung über die Art des Induktionsweges bilden will, so müssen die cytologischen Verhältnisse der Ascomyceten im Auge behalten werden. Bekanntlich ermöglicht die Perforation der Hyphenquerwände sowohl einen völligen Plasmaverband als auch unbehinderte Kernwanderungen. Damit sind die Voraussetzungen dafür gegeben, daß die Genwirkung auf kürzestem Wege und direkt über das Plasma an das Ascogon herangetragen werden kann. Es läßt sich nachweisen, daß eine Kernwanderung der Induktionswirkung vorangeht. Markiert man nämlich den induzierenden Kreuzungspartner mit dem Sporenfarb-Gen  $lu$  (gelbe Sporen), so befinden sich die Selbstungsperithezien in der Induktionszone (s. Abb. 5 b) immer vermischt mit Kreuzungsperithezien. Dieser Befund macht es wahrscheinlich, daß sich die Induktionswirkung nur über kleine Strecken ausbreitet.

Es ist bemerkenswert, daß die Kerne in bestimmten Kreuzungen von *Sordaria macrospora* nur in einer Richtung wandern (s. Abb. 5 c). OLIVE (1956) hat diese Erscheinung bei *Sordaria fimicola* ausschließlich beobachtet. Hier tritt eine Unverträglichkeit von Plasmen und Kernen zutage.

Bei *Glomerella* sind Induktionserscheinungen durch WHEELER und MCGAHEN (1954) bekannt geworden, und der Nachweis diffundierbarer, induzierender Stoffe scheint dort gelungen zu sein. MARKERT (1949) kultivierte schwach kreuzbare Stämme von *Glomerella cingulata*, die durch eine Cellophanmembran von einem dritten Stamm getrennt waren, und beobachtete, daß sich die Kreuzungsfertilität der schwach kreuzbaren Stämme bei dieser Versuchsanordnung besserte. DRIVER und WHEELER (1955) konnten die Fruchtkörperbildung eines Stammes, der meist



nur sterile Perithezien entwickelte, durch Zugabe von Kulturfiltrat des Wildstammes erhöhen. Unsere Bemühungen, außerhalb der *Sordaria*-Hyphen Stoffe nachzuweisen, die die Fruchtkörperbildung steriler Stämme induzieren, waren erfolglos. Wir variierten die Versuchsanordnung vielfältig. Die in 2 Serien aufgetretenen Selbstungsperithezien bewiesen die Wirksamkeit extracellulärer Induktionsstoffe nicht, da sie auf das veränderte Kulturmedium zurückgeführt werden konnten. Wir möchten es für wahrscheinlich halten, daß die Induktionswirkung einen intracellulären, an das Plasma gebundenen Prozeß darstellt.

Auf Grund der bei *Glomerella* und *Sordaria* beobachteten Induktionswirkungen lassen sich mehrere experimentelle Befunde an monözischen selbst-compatiblen Pilzen erklären, deren Deutung bisher schwierig war. So können die von VÉZINA und RAPER (1957) bei *Aspergillus fonsaceus* gefundenen „präsumptiven Heterokaryen“ zwanglos durch Induktion erklärt werden. MAHONY und WILKIE (1958) fanden in Kreuzungen eines fertilen und eines sterilen Stammes von *Aspergillus nidulans* neben Kreuzungsperithezien auch Selbstungsperithezien der beiden Elterntypen und machten einen plasmatischen Faktor für ihr Auftreten verantwortlich. Nichts steht der Annahme im Wege, daß es sich um eine genbedingte Induktion handelt.

Wie bei der Kompensation im Heterokaryon darf man auch bei den Induktionserscheinungen darauf hinweisen, daß sie nicht auf karyotische Systeme beschränkt sind. STUBBE konnte (1958) bei *Oenothera* zeigen, daß die bleichen *Lamarckiana*-Plastiden ergrünen, wenn sie sich mit mutierten *suaveolens*-Plastiden im gleichen Gewebeverband befinden. Wahrscheinlich sind die plastomisch bedingten Induktionen ebenfalls auf dem Wege über das Plasma wirksam.

### Summary

1. Twenty-two gene mutants and one chromosomal aberration were isolated from X-ray treated material of the monoecious self-compatible ascomycete, *Sordaria macrospora* AUERSW. Of the gene mutants, eighteen are sterile, the development of their fruiting bodies being arrested at definitive stages. The four fertile mutants exhibit anomalous perithecial development. The majority of the genes act pleiotropically in so far as the mutants, in comparison with wild type, show alteration in mycelial morphology or in spore color also.

2. The sterile mutants can be crossed as long as non-allelic genes are responsible for their mutant phenotypes. The evolution of a heterocaryon from the hyphae of the participating strains forms the basis of this crossing ability. The defects of the two strains are compensated in the heterocaryon by the complementary actions of the wild type alleles of the mutant genes.

3. If one of the members of a cross is marked with a spore color mutant, it is possible to distinguish the self-fertilized perithecia which appear in crosses involving the wild type or fertile mutants. In crosses involving particular sterile mutants (for example *r*, *spd*, and *f*), completely fertile selfed perithecia also appear whose asci contain exclusively a single type of spore (either *r*, *spd*, or *f*). The mutant *ire*, whose ascospores are not arranged linearly, produces in crosses with all other mutants self-fertilized perithecia whose asci contain only *ire* spores, but in a linear arrangement. Finally, in that type of cross one finds mixed fruiting bodies which contain asci which derived both from heterocaryotic and from homocaryotic zygote nuclei. The self-fertilized perithecia, as well as the asci of homocaryotic origin, arise through induction. In this manner gene-determined defects are nullified by the extension of the compensatory action through the heterocaryon.

4. Agents which could diffuse into the medium and which might be accountable for the induction of self-fertilized perithecia could not be uncovered. Probably the induction is mediated through the cytoplasm.

5. The crossing ability of sterile mutants has previously been explained in terms of relative sexuality and the occurrence of self-fertilized perithecia has been attributed to plasmagenes. On the basis of the observations presented here, these results would seem naturally to follow as the consequence of compensation and induction in the heterocaryotic state.

Bei der Auslösung von Genmutanten und den entwicklungsgeschichtlichen Untersuchungen halfen die Lehramtskandidaten: Fr. E. ESSER, Fr. A. RADEMACHER und Herr K. M. LAUSBERG. Nacheinander unterstützten uns die technischen Assistentinnen: Fr. O. BURGHARD, Fr. M. KRÄMER, Fr. I. HANSEN und Fr. G. ROSE. Ihnen allen sei für ihre Mitarbeit gedankt.

### Literatur

- BEADLE, G. W., and V. L. COONRADT: Heterocaryosis in *Neurospora crassa*. *Genetics* **29**, 291—308 (1944). — BENZER, S.: Fine structure of a genetic region in bacteriophage. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **41**, 344—354 (1955). — CARR, A. J. H., and L. S. OLIVE: Genetics of *Sordaria fimicola*. II. Cytology. *Amer. J. Bot.* **45**, 142—150 (1958). — DANGEARD, P. A.: Recherches sur le developement du périthèce chez les ascomycetes. *Botaniste* **9—10** (1903/07). — DENGELER, I.: Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an *Sordaria macrospora* Auersw., *S. wiccola* Viala et Mars. und *S. Brefeldii* Zopf. *Jb. wiss. Bot.* **84**, 427—448 (1937). — DRIVER, C. H., and H. E. WHEELER: A sexual hormone in *Glomerella*. *Mycologia (N.Y.)* **47**, 311—316 (1955). — ESSER, K.: Wachstum, Fruchtkörper- und Pigmentbildung von *Podospora anserina* in synthetischen Nährmedien. *C. R. Lab. Carlsberg, Sér. physiol.* **26**, 103—116 (1956). — ESSER, K., K. ERBEN u. P. FÄHNRICH: UV-inaktivierte T4-Wildphagen induzieren die Reifung der Mutante T4 r 168 im Bakterium K 12 S ( $\lambda$ ). *Naturwiss.* **44**, 68 (1957). — ESSER, K., u. J. STRAUB: Fertilität im Heterocaryon aus zwei sterilen Mutanten von *Sordaria macrospora* Auersw. *Z. indukt. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **87**, 625—626 (1956). — GARNJOBST, L.: Genetic control of heterocaryosis in *Neurospora crassa*. *Amer. J. Bot.* **40**, 607—614 (1953). — Further analysis of genetic control of heterocaryosis in *Neurospora crassa*. *Amer. J. Bot.* **42**, 444—448 (1955). — GARNJOBST, L., and J. F. WILSON: Heterocaryosis and protoplasmic incompatibility in *Neurospora crassa*. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **42**, 613—618 (1956). — GREIS, H.: Mutations- und Isolationsversuche zur Beeinflussung des Geschlechts von *Sordaria fimicola* (Rob.). *Z. Bot.* **37**, 1—116 (1941). — HESLOT, H.: Contribution à la génétique de l'ascomycète homothallique *Sordaria macrospora* Auersw. *Caryologia (Pisa)* **6**, Suppl., 1115 bis 1117 (1953). — HÜTTIG, W.: Die Sexualität von *Glomerella lycopersici* Krüger und ihre Vererbung. *Biol. Zbl.* **55**, 74—83 (1935). — MAHONY, M., and D. WILKIE: An instance of cytoplasmic inheritance in *Aspergillus nidulans*. *Proc. roy. Soc. B* **148**, 359—361 (1958). — MARKERT, C. L.: Sexuality in the fungus *Glomerella*. *Amer. Naturalist* **83**, 227 bis 232 (1949). — McCLINTOCK, B.: *Neurospora*. I. Preliminary observations of the chromosomes of *Neurospora crassa*. *Amer. J. Bot.* **32**, 671—678 (1945). — MCGAHEN, J. W., and H. E. WHEELER: Genetics of *Glomerella*. IX. Perithecial development and plasmogamy. *Amer. J. Bot.* **38**, 610—617 (1951). — OLIVE, L. S.: Genetics of *Sordaria fimicola*. I. Ascospore color mutants. *Amer. J. Bot.* **43**, 97—107 (1956). — RIZET, G., et C. ENGELMANN: Contribution à l'étude génétique d'un ascomycète tétrasporé: *Podospora anserina* (Ces.) Rehm. *Rev. Cytol. et Biol. vég.* **11**, 201—304 (1949). — SANSOME, E. R.: The use of heterocaryons to determine the origin of the ascogoneous nuclei in *Neurospora crassa*. *Genetica* **24**, 59—64 (1947). — STUBBE, W.: Dreifarbenpanaschierung bei *Oenothera*. II. Wechselwirkungen zwischen Geweben mit zwei erblich verschiedenen Plastidensorten. *Z. Vererb.-Lehre* **89**, 189—203 (1958). — VÉZINA, C., and K. B. RAPER: Presumptive heterocaryons in *Aspergillus fonsecaeus*. *J. Bact.* **74**, 396—408 (1957). — WHEELER, H. E.: Genetics and evolution of heterothallism in *Glomerella*. *Phytopathology* **44**, 342—345 (1954). — WHEELER, H. E., and J. W. MCGAHEN: Genetics of *Glomerella*. X. Genes affecting sexual reproduction. *Amer. J. Bot.* **39**, 110—119 (1952).