

Vergleichende karyologische Untersuchungen an dimorphen Zygomyceten

T. G. FORST & H. PRILLINGER

Institut für Botanik, Universität Regensburg
Postfach 397, D-8400 Regensburg

Eingegangen am 4.2.1988

Forst, T. G., H. Prillinger (1988): Comparative karyological investigations on dimorphic Zygomycetes. *Z. Mycol.* 54(2): 139–154.

Key Words: Zygomycetous yeasts, *Benjaminiella*, *Cokeromyces*, *Mucor*, *Mycotypha*, vegetative anastomoses, DAPI-fluorescence microphotometry, synchronous and asynchronous nuclear division, primitive and derived homothallism.

Abstract: The occurrence of vegetative anastomoses and yeast-states was investigated in dimorphic Zygomycetes belonging to three different families (*Mucoraceae*: *Mucor racemosus*, *M. rouxii*; *Thamniaceae*: *Cokeromyces recurvatus*; *Mycotyphaceae*: *Mycotypha africana*, *M. microspora*, *M. indica*, *Benjaminiella poitrasii*, *B. multispora*). We found no evidence for vegetative anastomoses in any of the species we studied. None of these species is distinguishable from the others morphologically when they display multipolar budding as spherical yeasts 20–50 µm in diameter. DAPI fluorescent staining revealed 10–100 nuclei per yeast cell, depending on age. Whereas nuclei divide synchronous in the *Mucor*, *Cokeromyces* and *Benjaminiella* strains, an asynchronous nuclear division was common to all *Mycotypha* species. The occurrence of synchronous and asynchronous nuclear division is discussed as a criterion for primitive and derived homothallism in Zygomycetes.

Zusammenfassung: Dimorphe Zygomyceten aus drei verschiedenen Familien (*Mucoraceae*: *Mucor racemosus*, *M. rouxii*; *Thamniaceae*: *Cokeromyces recurvatus*; *Mycotyphaceae*: *Mycotypha africana*, *M. microspora*, *M. indica*, *Benjaminiella poitrasii*, *B. multispora*) wurden vergleichend auf das Vorkommen von vegetativen Anastomosen und Hefe-Stadien untersucht. Große (20–50 µm ø), kugelige und multipolar sprossende Hefen, welche morphologisch nicht weiter unterschieden werden konnten, waren allen Arten gemeinsam. Im Inneren dieser Hefen ließen sich fluoreszenzmikroskopisch (DAPI-Färbung) 10–100 peripher liegende Zellkerne nachweisen. Während für alle *Mucor*, *Cokeromyces* und *Benjaminiella*-Hefen synchrone Kernteilungen charakteristisch waren, ließen sich bei den *Mycotypha*-Arten asynchrone Kernteilungen beobachten. Die Bedeutung von synchroner und asynchroner Kernteilung für eine Unterscheidung von ursprünglicher und abgeleiteter Homothallie bei Zygomyceten wird diskutiert.

Neben den bekannten Hefen innerhalb der Klassen der Asco- und Basidiomyceten kommen auch in der Klasse der Zygomyceten Hefeformen vor. Ihre Existenz ist seit langem bekannt, wenngleich manche Pilztaxonomen ihre Bezeichnung als „Hefen“ kritisieren oder ablehnen.

Berkeley (1938) beschrieb als erster die bei *Mucor* beobachteten Hefeformen in Verbindung mit dem Myzel als „convoroid state of *Mucor clavatus*“. Auch Bail (1857) entdeckte Hefeformen von *Mucor* als Infektion in vergärender Bierwürze. Er machte wenig später die Beobachtung, daß *Mucor*-Sporen in steriler Bierwürze sich außer zu Myzel auch zu kugeligen Sproßformen entwickelten (Abb. 1). Hoffmann (1865, 1869) erkannte

schließlich den groben Zusammenhang zwischen der jeweiligen Lebensform bei *Mucor racemosus* und den Wachstumsbedingungen. In mehreren Versuchsreihen induzierte er bewußt Hefe- oder Myzelwachstum des Pilzes, ausgehend von dessen Sporen. Die Autoren jener Zeit prägten für die seltsamen, kugelrunden und großen Zellen der *Mucor*-Arten, die sich durch multipolare Sprossung vermehrten, den Begriff Kugelhefe. Dieser Ausdruck erregte in der Folge Brefelds und De Barys Kritik, die – obschon sie verschiedene Auffassungen vertraten, was unter Hefe zu verstehen sei (vgl. Prillinger 1987) – sich darin einig waren, daß es sich bei den beobachteten Lebensformen keinesfalls um Hefen handelte. Brefeld (1873, 1876) beschäftigte sich dennoch eingehend mit der bei *Mucor racemosus* auftretenden Gärung. Er stellte ebenso wie Pasteur Vergleiche zur Gärung von *Saccharomyces cerevisiae* und darüber hinaus zu weiteren *Mucor*-Arten an.

Die Autoren der Folgezeit wendeten sich mehr und mehr den Ursachen für den Hefe-Hyph Dimorphismus zu, wobei die Zahl der entdeckten dimorphen Zygomyceten nach und nach größer wurde (vgl. Zycha 1969). Ihren Höhepunkt erreichten die Bemühungen um die Aufklärung dieses Phänomens in den siebziger Jahren. Durch verschiedene Arbeiten konnte bestätigt werden, daß eine Hemmung des Elektronentransports in der Atmungskette ausschlaggebend für die Induktion der Hefephase ist (Terenzi & Storck 1969, Clark-Walker 1973, Price & al. 1973, Schulz & al. 1974, Hall & Kolan-kaya 1974, Friedenthal & al. 1974, Fisher 1977). Dabei waren die physiologischen Unterschiede für die Induktion der Hefephase bei den verschiedenen, daraufhin untersuchten Arten im Prinzip so gering wie die morphologischen Unterschiede der jeweilig gebildeten Hefen. Alle bisher induzierten und untersuchten Hefeformen bei den Mucorales sind einander in mehrfacher Hinsicht so ähnlich, daß die Annahme, diese Pilze hätten sich von einer, dieser heute noch induzierbaren Hefeform (= Kugelhefe) ähnlichen, Lebensform aus entwickelt, mehr als gerechtfertigt erscheint (vgl. dazu Benjamin 1979). Dafür spricht nicht nur der fermentative Stoffwechsel dieser Hefen, sondern auch die Existenz einer CN-resistenten Respiration, die möglicherweise das Relikt eines ursprünglichen Stoffwechselweges primitiver Eukaryonten darstellt (Knowles 1976, Kraepelin & Draeger 1983).

Angesichts der Fülle physiologischer Daten erstaunt es, daß nur wenig über den Zellzyklus und das Kernteilungsverhalten in den „Kugelhefen“ bekannt ist, obwohl letzteres bei der Identifikation z. B. der Hefen von Basidiomyceten eine zunehmend wichtigere Rolle spielt.

Vor diesem Hintergrund soll es das Ziel dieser Arbeit sein, durch vergleichende karyologische Studien an Hefen und Hyphen mehr Informationen über den Zellzyklus und das Kernteilungsverhalten sowie mögliche Konsequenzen daraus für die Sexualität bei einigen dimorphen Vertretern der *Mucorales* (sensu Benjamin 1979) zu erhalten. Besonderes Augenmerk wollen wir dabei auf die Hefephase dieser Pilze legen.

Die von uns untersuchten Pilzstämme werden zur Zeit taxonomisch drei verschiedenen Familien zugerechnet. Alle Pilze bilden unter mehr oder weniger starken induktiven Bedingungen Hefen aus, die wir, ihrem charakteristischen Aussehen nach und entgegen bestehenden Bezeichnungen (Gemmen, Sproßgemmen, Azygosporen, Chlamydosporen etc.), im folgenden auch als Kugelhefen (s. o.) ansprechen werden.

Material und Methoden

Folgende Pilzstämme wurden untersucht:

Mycotyphaceae: (Benny & al. 1985):

Mycotypha africana (Novak & Backus) CBS 122.64, *Mycotypha microspora* (Fenner) CBS 186.68, CBS 230.32, CBS 391.74, *Mycotypha indica* (P. M. Kirk & Benny) IMI 287.391, IMI 211.999, *Benjaminiella multispora* (Benny, Samson & Srinivasan) CBS 421.70, *Benjaminiella poitrasii* (R. K. Benjamin) CBS 158.60.

Thamniaceae:

Cokeromyces recurvatus (Poitras) CBS 158.50.

Mucoraceae:

Mucor racemosus (Fresenius) CBS 260.68, *0603, *Mucor rouxii* (Calmette, Wehmer) *0801.

* Stämme des Instituts für Fermentation und Brauwesen der TU Berlin, für deren Überlassung wir Herrn Prof. Dr. U. Stahl danken. Für die freundliche Überlassung der Stämme *B. multispora* und *M. indica* sei an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. G. L. Benny gedankt.

Die Pilzstämme wurden auf Bierwürze- oder Moser-b-Agarplatten überimpft und bei 27°C, 50 % rel. Luftfeuchte und Dauerlicht in Kultur genommen.

Die Kugelhefen wurden in einem modifizierten GYP-Flüssigmedium (Glucose 50 oder 100 g, Pepton aus Casein 10 g, Hefeextrakt 2,5 g auf 1 Liter Wasser, 40 min bei 121°C autoklavieren, pH 4,8–5,0) aus den Sporen der Pilze gewonnen, das wahlweise mit N₂ begast worden war (dann nur 20 min autoklavieren, 50 g Glucose/l).

Fluoreszenzmikroskopische Präparation

Myzel

Anzucht: Objektträgerkulturen nach van Uden (1951) 3–6 Tage.

Fixierung: Trockenfixierung, 3 Stunden bei 60°C. Carnoy-Fixans (6 Teile 96 %iger Alkohol, 3 Teile Chloroform, 1 Teil Eisessig) oder 70 %iger Alkohol, 10 min bei RT.

Färbung: Fixans auswaschen mit McIlvaine Puffer pH 7,0, 5 min bei RT. Färbelösung 1,0 µg DAPI (SERVA)/ml McIlvaine Puffer pH 7,0, 15 min bei 37°C. Entfärben in McIlvaine Puffer 1–2 min bei RT.

Einbettung: Gemisch 2:1, McIlvaine Puffer: Glycerin.

Kugelhefen

Die Kugelhefen wurden einesteils als Objektträgerausstriche ebenfalls auf einer Wärmebank bei 60°C getrocknet und analog präpariert oder andernteils in Eppendorf Kulturgefäßen sinngemäß fixiert und fluorochromiert.

Einbettung: Fertig präparierte Zellen aus Eppendorf Kulturgefäßen in die Mitte eines Deckglases (22 x 22 mm) pipettieren (5 µl), Deckglas umdrehen und aus geringer Höhe (max. 5 mm) auf agarbeschichtete Objektträger fallen lassen.

Herstellung der agarbeschichteten Objektträger:

Saubere Objektträger werden auf einer Trockenbank ausgelegt und auf 60°C erwärmt. Geschmolzener Wasseragar (4 % SERVA p. A) wird auf einen warmen Objektträger aufgebracht und mit diesem nach Art eines Blutausstriches auf den anderen 60°C warmen Objektträgern zu einem dünnen Film ausgezogen. Man läßt die Agarfilme eintrocknen und kann die beschichteten Objektträger trocken sehr lange aufbewahren.

Der Vorteil dieser Methode besteht darin, daß:

1. die Kugelhefen durch den quellenden Agar mandarinenförmig abgeplattet werden (besser fokussierbar)
2. der Haloefekt im Phasenkontrast erniedrigt wird
3. die Brownsche Molekularbewegung keinen Einfluß mehr auf die Zellbewegung hat
4. einzelne Kerne geplatzer Kugelhefen stabilisiert werden (Abb. 14a, b) und sehr rauscharm gemessen werden können (große Meßgenauigkeit u. Reproduzierbarkeit, siehe Abb. 14c)

Die Giemsa-Kernfärbung (Abb. 9) wurde nach der bei Prillinger (1984) angegebenen Methode durchgeführt.

Für die Untersuchung des Entwicklungsganges ausgehend von den Sporangiosporen hin zu den Kugelhefen wurden eigens dafür konzipierte Objektträgerkulturkammern verwendet. Diese bestanden aus Objektträgern (46 x 27 mm) auf welche Deckgläser (22 x 22 mm) mit einem 80°C heißen Zweikomponentenkleber (UHU Endfest) aufgeklebt wurden. Die Deckgläser besaßen 2–4 mm weite Bohrungen, die zuvor in die Gläser gefräst worden

waren (dünn in Epoxidharz eingebettet fräsen, Harz durch Bad in 96 % Alkohol nach 2–3 Tagen entfernen). Die 150–170 µm tiefen Rohkulturkammern wurden auf eine Endtiefe von 30 µm abgeschliffen.

Diese Kulturkammern waren für alle verwendeten lichtmikroskopischen Verfahren gleichermaßen gut geeignet. Als Kammermedium wurde GYP-Medium benützt; die aufgelegten Deckgläser ließen sich mit flüssiger Vaseline leicht abdichten, welche die sterile Kultur nicht beeinträchtigte.

Photographie: Lichtmikroskopie (LM), Phasenkontrast (Ph), Fluoreszenz-Mikroskopie (FM), Differential-Interferenzkontrast nach Nomarsky (Zeiss Axiomat; DIK).

Fluoreszenzmikroskopie und Photometrie

Zur quantitativen Erfassung der Kernfluoreszenzen wurde das rechnergestützte Meßsystem CYFLAN (= Cytologische Fluoreszenzanalyse) von ZEISS verwendet. Die wichtigsten Bestandteile des verwendeten Rüstsatzes für das Mikroskop Universal (ZEISS) seien kurz aufgeführt:

Lichtquelle: HBO 100/W2 OSRAM (Auflichtanregung = AA) Halogenlampe 100 W (Durchlichtmikroskopie = DM)

Kondensoren: Auflichtkondensator III RS (AA) Phasenkontrast- und Hellfeldkondensator (DM)

Objektive: Neofluar Phasenkontrastobjektive

Filter Bandpaß: 365 nm (AA) – Farbteiler 397 nm (AA) – Langpaß: 400 nm (AA)

Messung Aufsatzphotometer 03 (ZEISS)

Um Schwankungen der Meßwerte durch das Abklingverhalten der DAPI-DNA-Fluoreszenzen zu vermeiden, wurden die Meßwertnahmen mit Belichtungsbeginn zeitgetaktet. Genauere Untersuchungen zum Verhalten fluorochromierter Pilzzellkerne sowie zur exakten und vergleichenden Messung cytologischer Fluoreszenzen gingen den Versuchen voraus (Forst 1986).

Alle Aufnahmen wurden mit der Aufsatzkamera MC 63 mit halbautomatischer oder manueller Belichtungssteuerung gemacht, wobei bevorzugt AGFA Pan 25 Filme (15 DIN) verwendet wurden.

Die Maßstabsangaben in den Aufnahmen beziehen sich auf ein LEITZ Objektmikrometer als Referenz.

Ergebnisse

Myzel

Die Myzelien der daraufhin untersuchten *Mycotyphaceae* wiesen bei allen durchgeführten Präparationen keine vegetativen Anastomosen auf. Es kam zwar häufig zu Berührungen der vegetativen Hyphen untereinander, jedoch konnte nie eine Fusion derselben beobachtet werden (Abb. 9).

Das Myzel auf den Glasobjektträgern unterschied sich morphologisch von dem submers im Agar wachsenden.

Die vegetativen Hyphen im Agar waren dicker, in jedem Abschnitt vielkernig und trugen mehr Verzweigungsanlagen. Wie auch bei den Hyphen von *Mucor*, war in den Hyphenspitzen aller untersuchten Stämme die Zahl der Kerne meist erhöht (Abb. 13a, b). Dabei fiel auf, daß die Zellkerne in den Hyphenspitzen sich häufig in denselben Kernteilungsstadien befanden. Am deutlichsten konnte dies am Ende der Telophase beobachtet werden, wo die Zellkerne die Form einer Hantel besitzen (vgl. Robinow 1957 und Bland & Lunney 1975). Da das Chromatin bereits getrennt vorliegt und nur die Spindel und die durchgehende Kernmembran die zwei künftigen Kerne noch verbinden, wird dieses Kernteilungsstadium im Fluoreszenzmikroskop als „zweikerniges“ sichtbar, da die Spindel keine DNS enthält und nicht fluoresziert. Das Auftauchen von solchen „Kernpaaren“ signalisiert den Eintritt in die Telophase, die in den erwähnten Hyphenspitzen immer von mehreren Kernen gleichzeitig durchlaufen wurde (Abb. 13a, Pfeile).

Die vegetativen Hyphen auf den Objektträgern waren – offensichtlich auf Grund der Ernährungssituation – wesentlich schlanker und besaßen weniger Kerne (Abb. 11a, b). In jüngeren Hyphen fanden sich selten zwei oder mehr Kerne nebeneinander, die Zahl der Zellkerne schien zu den Spitzen hin nicht zuzunehmen (Abb. 12a, b). Es gab auch keine Anzeichen dafür, daß sich die Zellkerne in der Weise synchron teilten wie dies bei den Hyphen im Agar der Fall war.

Kugelhefen

Bereits auf den festen Nährmedien kommen bei den *Mycotyphaceae* immer auch Kugelhefen zur Entwicklung, weswegen sie neben morphologischen Merkmalen in dieser Familie zusammengefaßt wurden (Benny & al. 1985). Aber auch *Cokeromyces recurvatus* ging bei unseren Versuchen auf festen Nährmedien leichter in die Hefephase über als zunächst angenommen (Benny & al. 1985). Auf einer mit Parafilm verschlossenen Moser-b Agarplatte entwickelte sich dieser bis zu einer gewissen Koloniegröße als Myzel. Nach einem kurzen Wachstumsstopp keimten alle abgeworfenen Sporangiosporen mit Kugelhefen, die jenseits der Myzelfront zu Kolonien heranwuchsen (Abb. 10). Durch das Entfernen des Parafilms und einer kurzen Belüftung der Platte keimten die Hefekolonien mit Myzel aus.

In den Flüssigmedien entwickelten sich die Kugelhefen nach einer Lag-Phase von etwa 8 Stunden aus den Sporangiosporen, wobei individuelle Unterschiede sichtbar wurden. Die Kugelhefen von *Cokeromyces recurvatus* und *Mucor racemosus* entwickelten sich langsamer als die der übrigen Stämme und nur unter Stickstoffatmosphäre.

Die ersten Kugelhefen, die aus den Sporen der *Mycotypha* Arten entstanden, trugen noch den Pedicellus des Sporangioliums (Abb. 2a, b). Sie hatten sich mit diesem vom kolbenförmigen Sporangienträger (Abb. 2c) abgelöst, und waren daran gut als Erstlingshefen zu erkennen. Die Sporangioliumwand schien ihnen als äußerste Hülle noch anzuhaften. Die Sporangiolienträger von *Cokeromyces* und *Benjaminiella multisporea* (Abb. 3b) trennten sich bald von den quellenden Sporen, indem die Sporangioliumwand zerriß und die Sporen freigab. Die jungen Kugelhefen dieser Arten waren nicht von ihren Nachkommen zu unterscheiden (Abb. 3a).

Nach etwa 12 Stunden, also in der frühen Log-Phase, ließen sich die multipolar sprossenden Kugelhefezellen der verschiedenen Arten morphologisch kaum mehr voneinander unterscheiden (Abb. 4a–g). Im Inneren der durchschnittlich 20–50 µm großen Zellen fanden sich eine oder mehrere Vakuolen. Die Zellkerne, von denen die älteren Kugelhefen etwa 100 besaßen, maßen ca. 2 µm im ϕ . Sie hatten einen großen Nucleolus (Abb. 6b) und lagen alle randständig (Abb. 6a).

Die quantitative Auswertung der DAPI-DNS Fluoreszenzen zeigte, daß die Kugelhefen der *Mycotypha*- Arten Zellkerne zweier verschiedener DNS-Gehalte besaßen (Abb. 19a–c). Dies waren wohl zum einen Kerne deren DNS sich zwar schon repliziert hatte, wobei die Kernteilung aber noch nicht erfolgt war, und zum anderen waren es Kerne, deren DNS sich noch nicht repliziert hatte. Ein Beispiel dafür zeigt Abb. 7. Die Kerne mit dem doppelten DNS-Gehalt (Pfeile) leuchten durch alle Fokusebenen der dem Betrachter zugewandten Hemisphäre (die Ziffern 1–3 bezeichnen die Fokusebenen in absteigender Folge vom Betrachter). Dieser Sachverhalt ließ sich für die einzelne Zelle jedoch nur bei *Mycotypha*- Arten in dieser Weise beobachten.

Bei den *Benjaminiella*-Arten fanden sich in den Kugelhefen nur Kerne mit demselben DNS-Gehalt (Abb. 14c, 15a, b); alle untersuchten Individuen zeigten ein eingipfeliges

Kernspektrum. Aus den Fluoreszenzaufnahmen der *Benjaminiella*-Arten ging hervor, daß sich alle Kerne – mehr oder weniger gut erkennbar – in derselben Kernteilungsphase befanden. Besonders deutlich wurde dies wiederum in der späten Telophase, wenn die Zellkerne als Kernpaare einander gut zuzuordnen waren (Abb. 18). Während sich relativ viele Beispiele für Kugelhefen finden ließen, deren Zellkerne den einfachen DNS-Gehalt besaßen, waren Entwicklungsphasen, in welchen die DNS repliziert im Kern vorlag, nur sehr selten festzustellen.

Alle Versuche, die Kernteilung fluoreszenzmikroskopisch am lebenden Objekt zu beobachten, scheiterten (Forst & Prillinger, in Vorbereitung). Um dennoch Klarheit über den Kernteilungsmodus der *Benjaminiella*-Arten zu erhalten, wurden die Zellen in den o. a. Objektträgerkulturkammern untersucht.

Gerieten junge Kugelhefen nahe der Kulturkammer zwischen das aufge kittete und das aufgelegte Deckglas, so kamen sie zwar noch zur Entwicklung, konnten sich aber nicht mehr typisch dreidimensional entfalten. Ihr flächiges Wachstum schien diese „Kugelhefen“ aber nicht im mindesten zu beeinflussen und ermöglichte in eleganter Weise die Lebendbeobachtung der Kernteilung im Phasenkontrast (Abb. 8b). Die Anlage der Tochterknospen erfolgte in diesen 5–8 µm dünnen Individuen in derselben Weise wie in den normalen Kugelhefen. Es traten lediglich zwei Unterschiede auf, die auf die veränderte Entwicklungsbedingungen zurückzuführen waren. Zum einen trennten sich die Tochterzellen nicht mehr von den Mutterzellen, und zum anderen waren die Zellkerne gleichmäßiger über die Zellen verteilt. In einzelnen Knospen konnte man deutlich eine synchrone Kernteilung beobachten. Wiederum bildeten sich in der späten Telophase die typischen Kernpaare (Abb. 8b). Mit der Zunahme der Größe der Zellkolonie verschlechterten sich die Wachstumsbedingungen für die innersten Individuen derart, daß sie – meist nach mehreren Tagen – abstarben. Aus denselben Gründen stellten Zellen, welche durch Tochterknospen vom umgebenden Nährmedium abgeschirmt worden waren, die weitere Knospung ein. Dadurch entstand der Eindruck einer apikal wachsenden Zellkultur (Abb. 8a).

Die *Mucor*-Arten zeigten, wie auch *Cokeromyces recurvatus*, dasselbe Kernteilungsverhalten wie die *Benjaminiella*-Arten (Abb. 16). Bei *Mucor racemosus* gelang es, sich entwickelnde, junge Kugelhefen aus Log-Kulturen zu finden, die entweder nur Kerne mit dem einfachen (Abb. 17b) oder aber dem doppelten DNS-Gehalt aufwiesen (Abb. 17a – 17a gleicher Maßstab wie 17b). Damit war erneut deutlich geworden, daß sich tatsächlich alle Zellkerne synchron teilen, zumal auch hier die Zahl der gefundenen Zellen mit replizierter DNS im Vergleich zur Zahl der Zellen mit einfachem DNS-Gehalt in den Kernen sehr klein war. Trotz der offensichtlich sehr kurzen Phase, in welcher die Replikation der DNS bereits beendet war und die Kernteilung noch nicht stattgefunden hatte, waren alle Kerne in der gleichen Phase (mit replizierter DNS) anzutreffen.

Weiterführende Untersuchungen und Kernmessungen bei *Benjaminiella multispora* ergaben schließlich, daß die Kerne in jungen Tochterknospen nicht nur untereinander den gleichen DNS-Gehalt besaßen (Abb. 15b), sondern dieser auch mit dem der Kerne in der Mutterzelle übereinstimmte (Abb. 15a). Da wir nur fixierte Kugelhefen beobachten konnten, gestaltete sich die Beantwortung der Frage, wieviele Kerne in die neu angelegten Tochterknospen einwandern, als schwierig. In jungen Tochterknospen fanden wir häufig ein oder zwei und seltener drei Kerne. Die Beobachtung der Kernwanderung am lebenden Objekt (Abb. 8a) brachte hier keine Klärung, da die Septumbildung zwischen Tochter- und Mutterzellen oft unnatürlich spät erfolgte. Da aber alle in die Tochterzelle „einwandernden“ Zellkerne demselben Raumsektor der Mutterzelle entstammen (Abb. 5), dürften sie alle auf einen Kern zurückzuführen sein, der kurz vor der Anlage der Tochterknospe in

dieser Region lag. Ein definiertes Kernwanderungsverhalten konnten wir jedoch nicht nachweisen.

Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, daß in den Hyphenspitzen der submers im Agar wachsenden Hyphen, sowie in manchen Kugelhefen offensichtlich eine synchrone Kernteilung stattfindet. Dieser Zusammenhang überrascht zunächst. Es ist jedoch bekannt, daß z. B. in den submers wachsenden Hyphenspitzen von *Pilobolus crystallinus* nicht nur semisynchrone Kernteilungen nachweisbar sind (Bland & Lunney 1975), sondern daß sie interessanterweise auch erst bei reduziertem O₂-Partialdruck ihr maximales Wachstum zeigen (Bourret 1985). Zopf (1888) hat sogar davon berichtet, daß die Sporen dieses Mucorales in „... dünnen Schichten von Wasser oder Zuckerlösungen ...“ Kugelhefen ausbildeten. Ob ein direkter Zusammenhang zwischen der synchronen Kernteilung und einem mehr oder weniger anaeroben Stoffwechsel besteht, vermögen wir derzeit nicht zu sagen. Fest steht jedoch, daß das Phänomen der synchronen Kernteilung innerhalb der Mucorales weiter verbreitet ist, als zunächst vermutet.

Für die Erklärung des Phänomens gibt es zwei grundsätzliche Denkansätze. Da alle Zellkerne einer Kugelhefe auf einen einzigen Sporenkern zurückgehen, ist es z. B. vorstellbar, daß sich von diesem Kern ausgehend eine zwanglose Synchronität der Teilungen herleitet, die z. B. auch eine kleine Bakterienkolonie besitzt, wenn sie auf eine einzige Zelle zurückgeht. Eine – wie auch immer geartete – stoffliche „Kommunikation“ der Kerne untereinander wäre in diesem Fall nicht erforderlich. Nachbareffekte kämen durch die identische Raumlage der Kerne in der Kugelhefe nicht zum Tragen, böten aber eine Erklärung dafür, warum sich in der polar wachsenden Hyphe die Synchronität der Kernteilungen nur in der Spitzenregion erhält. Eine andere Überlegung geht dahin, daß eine aktive Regelung der Kernteilung stattfindet, und in der Tat sprechen dafür zur Zeit zwei Befunde. Eine aktive Regelung der Kernteilung setzt eine Kommunikation der Zellkerne und ein Regulatorprinzip voraus. Durch Gefrierbrucharbeiten entdeckten Jeffries & Young (1983) eine ungewöhnlich große Zahl („abundant number“) von Kernporen in den Zellkernen von *Cokeromyces recurvatus* Kugelhefen. Ein, auch für die Kugelhefen in Frage kommendes Regulatorprinzip, welches eine synchrone Kernteilung bewirkt, ist bei *Physarum polycephalum* bekannt (Fischer 1987). In einem neuen Organisationsstufenkonzept (Prillinger 1987), welches auf die Phylogenie der Pilze abzielt, stünde *Physarum* auf der „Rhizopodialen Organisationsstufe“ direkt unter den ursprünglichsten Vertretern der „Kokkalen Organisationsstufe“, als welche wir bei dem derzeitigen Kenntnisstand die Kugelhefen der Zygomyceten betrachten müssen. Die laufenden biochemischen Untersuchungen werden zeigen, ob die Art der Regelung der Kernteilung von *Physarum* auch bei den Kugelhefen vorliegt und ob das Organisationsstufenkonzept dadurch weiter erhärtet werden kann.

Die Tatsache, daß alle Zygomyceten, die Kugelhefen ausbilden, keine vegetativen Anastomosen im Myzel aufweisen und darüber hinaus überwiegend homothallisch sind, gibt Anlaß, über die Sexualität derselben nachzudenken. Eine besondere Note erlangen diese Überlegungen dann, wenn wir die beobachtete synchrone Kernteilung in sie mit einfließen lassen. Bislang sind wir von einer synchronen Kernteilung in den Kugelhefen ausgegangen, die wir bei den *Mycothypha*-Arten nicht hatten beobachten können (Abb. 19). Bei einem Vergleich der Arten mit beobachteter synchroner und denen mit offensichtlich nicht-synchroner Kernteilung, nämlich den *Mycothypha*-Arten, fällt auf, daß sich beide Pilzgruppen außer in ihrem Kernteilungsverhalten auch wesentlich in der Zusammensetzung der DNS in ihren Kernen unterscheiden (Storck & Alexopoulos 1970):

	Mol % G + C
<i>Mucor rouxii</i> :	etwa 38 %
<i>Mucor racemosus</i> :	38 %
<i>Benjaminiella poitrasii</i> :	36–38 %
<i>Cokeromyces recurvatus</i> :	etwa 32 %
<i>Mycotypha africana</i> :	43 %
<i>Mycotypha microspora</i> :	42–47 %

Die Gattung *Mycotypha* scheint im Vergleich mit den anderen Gattungen aber nicht allein auf Grund der höheren GC-Werte die phylogenetisch jüngeren Vertreter zu vereinen. Auch die Morphologie der vegetativen Sporangienträger und der Sporangien selbst unterstützen diese Auffassung (vgl. Brain & Young 1979 und Benjamin 1979).

Unter Berücksichtigung aller Gegebenheiten liegt der Schluß nahe, die synchrone Kernteilung sei im Vergleich zur nicht-synchronen aus phylogenetischer Sicht die ältere. Wenn aber der „alten“ synchronen Kernteilung ein ebenso „altes“ Regulationsprinzip zu Grunde liegt, könnte dieses bei der „jüngeren“ nicht-synchronen Kernteilung degeneriert und (oder) durch „jüngere“ Regulationsprinzipien ersetzt oder überdeckt sein.

So gesehen ließen sich die Unterschiede im DNS-Gehalt der Kerne einer Zelle nach einiger Kernteilung bei den *Mycotypha*-Arten auch dadurch erklären, daß einige Kerne durch die Wirkung z. B. sexueller Faktoren sich in ihrem Teilungsverhalten ändern und so zu der beobachteten Heterokaryose beitragen. Eine derart begründete Heterokaryose ist im allgemeinen für heterothallische Systeme kennzeichnend. Alle *Mycotypha*-Arten sind nun aber homothallisch oder wegen fehlender Zygoten in ihrem Sexualverhalten nicht näher bestimmbar.

Weil aber der überwiegende Teil der untersuchten Zygomyceten, die eine synchrone Kernteilung in ihren Kugelhefen besitzen, homothallisch ist, scheint es legitim, eine primäre (= ursprüngliche) Homothallie dieser Pilze anzunehmen. *Mucor racemosus* wäre demgemäß einer jener Pilze, die zwar noch eine synchrone Kernteilung in der Hefephase besitzen, in der Hyphephase jedoch bereits die Heterothallie verwirklicht haben.

Es stellt sich somit also die Frage, ob wir mit den *Mycotypha*-Arten nicht eine sekundär homothallische Gruppe betrachten, die sich in ihrem abweichenden Kernteilungsverhalten in der Hefephase dadurch verrät.

Interessant und bisher unbeantwortet bleibt die Beobachtung, daß bisher nur bei den *Mycotypha*-Kugelhefen ein signifikanter Prozentsatz von Kernen mit dem dreifachen DNS-Gehalt gefunden wurde (Abb. 19 a, c).

Danksagung: Für die freundliche Bereitstellung des Fluoreszenzmikrophotometers sind wir Herrn Prof. Dr. A. Bresinsky (DFG-Mittel Br 217/10-1-190) zu Dank verpflichtet. Besonderer Dank gebührt auch Herrn Dipl.-Ing. Horst Lindner für seine fachliche und tatkräftige Unterstützung bei der Anfertigung der Objektträgerkulturkammern. Herrn Dr. Richard Loftus danken wir für die Korrektur des englischen Textes.

Literatur

- BAIL, T. (1857) – Ueber Hefe. *Flora* 40, 417–444.
- BENJAMIN, R. K. (1979) – Zygomycetes and their spores. Aus: *The whole fungus* (2), Ed.: B. Kendrick, 573–621.
- BENNY, G. L., P. M. KIRK & R. A. SAMSON (1985) – Observations on *Thamnidaceae* (*Mucorales*) III, *Mycotaxon* 12, 119–148.
- BERKELEY, M. J. (1838) – On a convervoid state of *Mucor clavatus*, LK. *Magaz. of Zool. and Bot.* 2, 340–343.
- BLAND, C. E. & C. Z. LUNNEY (1975) – Mitotic apparatus of *Pilobolus crystallinus*. *Cytobiologie* 11 (3), 382–391.
- BOURRET, J. A. (1985) – Influence of oxygen on tip growth of *Pilobolus crystallinus* hyphae. *Mycologia* 77 (2), 238–242.
- BRAIN, A. P. R. & T. W. K. YOUNG (1979) – Ultrastructure of the asexual apparatus in *Mycotypha* (*Mucorales*). *Microbios.* 25, 93–106.
- BREFELD, O. (1873) – *Mucor racemosus* und Hefe. *Flora* 56, 385–400.
- (1876) – Ueber Gährung. *Landwirtschaftliche Jahrbücher* 5, 283–339.
- CLARK-WALKER, G. D. (1973) – Relationship between dimorphology and respiration in *Mucor genevensis* studied with chloramphenicol. *J. Bacteriol.* 116 (2), 972–980.
- FORST, T. G. (1986) – Vergleichende Untersuchungen zur Karyologie und Ultrastruktur dimorpher Chitinpilze. Diplomarbeit an der Universität Regensburg.
- FISCHER, H. (1987) – Aktivität von DNA-Polymerasen im Zellzyklus von *Physarum polycephalum*. Isolierung und Charakterisierung eines DNA-Polymerase α spezifischen Inhibitors. Dissertation an der Universität Regensburg.
- FISHER, D. J. (1977) – Induction of yeast-like growth in *Mucorales* by systemic fungicides and other compounds. *Trans. Brit. mycol. Soc.* 68, 397–402.
- FRIEDENTHAL, M., A. EPSTEIN & S. PASSERON (1974) – Effect of potassium cyanide, glucose and anaerobiosis on morphogenesis of *Mucor rouxii*. *J. Gen. Microb.* 82, 15–24.
- HALL, M. J. & N. KOLANKAYA (1974) – The physiology of mould-yeast dimorphism in the genus *Mycotypha* (*Mucorales*). *J. Gen. Microb.* 82, 25–34.
- HOFFMANN, H. (1865) – *Icones analyticae fungorum* (Abbildung und Beschreibung von Pilzen mit besonderer Berücksichtigung der Anatomie und Entwicklungsgeschichte). J. Ricker'sche Buchhandlung Gießen Heft 4, 79–85.
- (1869) – Ueber Bacterien. *Botanische Zeitung* 27, 234–330.
- JEFFRIES, P. & T. W. K. YOUNG (1983) – Light and electron microscopy of vegetative hyphae, septum formation and yeast-mould dimorphism in *Cokeromyces recurvatus*. *Protoplasma* 117, 206–213.
- KNOWLES, J. C. (1976) – Microorganisms and cyanide. *Bacteriol. Rev.* 40 (3), 652–680.
- KRAEPELIN, G. & S. DRAEGER (1983) – Bypass respiration: biological significance and evolutionary implications. *Endocytobiology II*, Walter de Gruyter Berlin, New York, 292–302.
- PRICE, J. S., R. STORCK & F. H. GLEASON (1973) – Dimorphism of *Cokeromyces poitrasii* and *Mycotypha microspora*. *Mycologia* 65, 1274–1283.
- PRILLINGER, H. (1984) – Zur Evolution von Mitose, Meiose und Kernphasenwechsel bei Chitinpilzen. *Z. Mycol.* 50(2), 267–352.
- (1987) – Yeasts and anastomoses: their occurrence and implications for the phylogeny of Eumycota. In: *Evolutionary Biology of the Fungi*. *Brit. mycol. Soc. Symp.*, Cambridge University Press, 355–377.
- ROBINOW, C. F. (1957) – The structure and behavior of the nuclei in spores and growing hyphae of *Mucorales*. *Can. J. Microbiol.* 3, 771–798.
- SCHULZ, E. B., G. KRAEPELIN & W. HINKELMANN (1974) – Factors affecting dimorphism in *Mycotypha* (*Mucorales*): a correlation with the fermentation/respiration equilibrium. *J. Gen. Microbiol.* 82, 1–13.
- STORCK, R. & C. J. ALEXOPOULOS (1970) – Deoxyribonucleic Acid of Fungi. *Bacteriol. Rev.* 34 (2), 126–154.
- TERENZI, H. F. & R. STORCK (1969) – Stimulation of fermentation and yeast-like morphogenesis in *M. rouxii* by Phenetyl alcohol. *J. Bacteriol.* 97 (2), 1248–1261.
- UDEN VAN, N. (1951) – Eine einfache Methode zum Studium der Pilzmorphologie im allgemeinen und der vegetativen Anastomosen im besonderen. *Arch. Derm. Syph.* 193, 468–484.
- ZOPF, W. (1888) – Zur Kenntniss der Infektionskrankheiten niederer Thiere und Pflanzen. *Nova Acta* 52, 352–358.
- ZYCHA, H., R. SIEPMANN & G. LINNEMANN (1969) – *Mucorales*. Eine Beschreibung aller Gattungen und Arten dieser Pilzgruppe. 3301 *Lehre Verlag* von J. Cramer.

Abb. 1: Großzellige Kugelhefen von *Mucor* in steriler Bierwürze (Bail, 1857).

Fig. 1: Large yeast cells of *Mucor* in sterile beerwort medium (Bail, 1857).

Abb. 2: *Mycotypha indica*:

a, b) Erstlingshefen a) Ph, b) DIK. Pfeile zeigen auf die Pedicelli. c) Kolbenförmiger Sporangienträger mit Dentikeln (DIK).

Fig. 2: a, b) Primary yeasts a) ph, b) dic. arrows show pedicelli. c) club-like sporangiophore with denticles (dic).

Abb. 3: *Benjaminiella multispora*:

a) Junge Kugelhefen mit Resten der Sporangiolen (Ph).

b) Vielsporige Sporangiolen (DIK).

Fig. 3: a) Juvenile yeasts with remains of sporangiola (ph).

b) multisporic sporangiola (dic).

Abb. 4: Kugelhefen in Flüssigmedien (DIK):

yeasts in liquid media (dic):

Fig. 4: a) *Mycotypha africana*, b) *M. indica*, c) *M. microspora*, d) *Benjaminiella multispora*, e) *B. poitrasii*, f) *C. recurvatus*, g) *Mucor racemosus*.

Abb. 5: Bau der Kugelhefe:

ZV: Zentralvakuole, TK: Tochterknospe, schwarz dargestellte Kerne „wandern“ in Tochterknospe ein (siehe Text).

Fig. 5: Typical shape of a „Kugelhefe“:

ZV: central vacuole, TK: bud, nuclei (black dots) „migrating“ from mother cell into a bud (cf. text).

Abb. 6: *Benjaminiella multispora*:

a) Kernlage in Kugelhefe (randständig), b) einzelner fluoreszierender Zellkern mit nicht fluoreszierendem Nucleolus (FM).

Fig. 6: a) centrifugal location of nuclei in yeast cell, b) fluorescent nucleus with dark nucleolus (fm).

Abb. 7: *Mycotypha africana*:

a, b, c) Kerne einer Kugelhefe in verschiedenen Fokusebenen, Ziffern markieren Ebenen in absteigender Folge. Pfeile kennzeichnen Kerne mit höherem DNS-Gehalt, sie sind in allen Fokusebenen wegen ihrer stärkeren Fluoreszenz zu erkennen (FM).

d) Projektion der Lage der Kerne in der erfaßten Hemisphäre in eine Ebene. Schwarz gezeichnete Kerne besitzen höheren DNS-Gehalt, Pfeile kennzeichnen die beiden auffälligsten Kerne aus den vorhergehenden Abb. a, b, c.

Fig. 7: a, b, c) nuclei of yeast cell at 3 different levels of focus. Arrows indicate nuclei with higher DNA content. They stand out at all three levels because of their strong fluorescence (fm).

d) Projektion of all nuclei in one hemisphere onto central plane. Nuclei with high DNA content shown in black. Arrows indicate prominent nuclei in a, b, c.

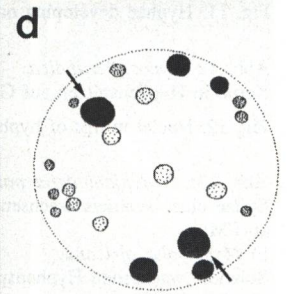
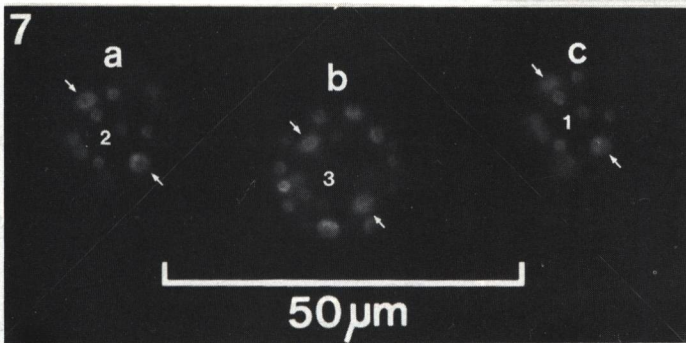
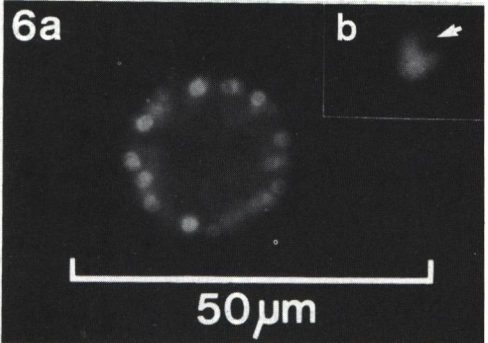
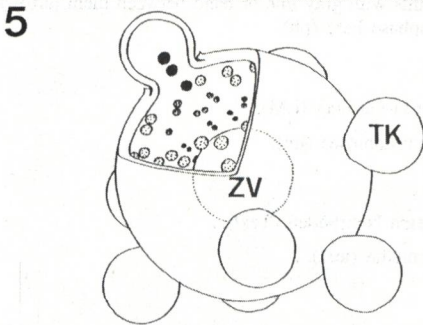
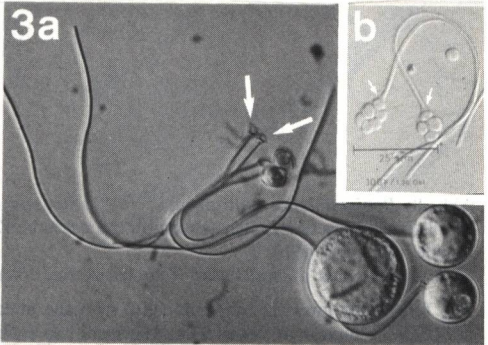
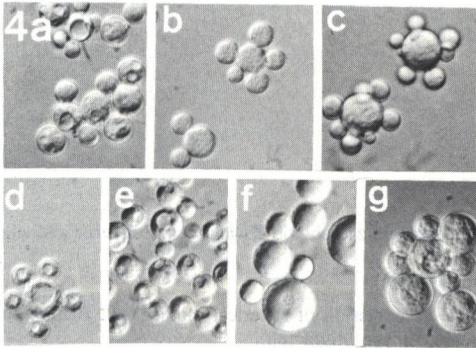
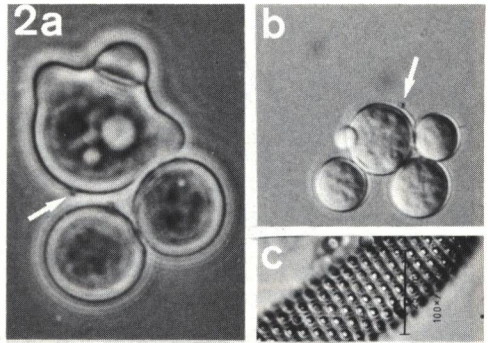
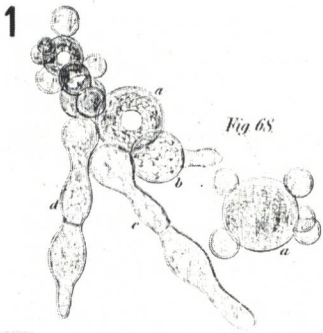


Abb. 8: *Benjamiella multispora*:

a) Flächig wachsende Zellen (anaerob), die dasselbe Knospungsbild zeigen wie Kugelhefen. Zellkerne als helle Punkte erkennbar (Ph).

b) Ausschnitt aus a), synchrone Telophasekerne erkennbar (Pfeile).

Fig. 8: a) cells growing (anaerobically) in plane after slow compression of spherical mother cell. Budding at periphery is typical of yeast cells. The nuclei in each yeast cell are bright (ph).

b) Portion of a) in greater detail. Nuclei are paired bright points with gray line or band between them (arrows); division of nuclei generally appears to be synchronous, telophase here (ph).

Abb. 9: *Mycotypha africana*:

Keine Ausbildung vegetativer Anastomosen im Myzel. Giemsa-Färbung (LM).

Fig. 9: Giemsa staining of hyphae. Absence of vegetative anastomoses (lm).

Abb. 10: *Cokeromyces recurvatus*:

Hefekulturen entwickeln sich aus den Sporen bereits auf festen Nährböden (Text).

Fig. 10: Yeast colonies develop from spores even on solid media (text).

Abb. 11: *Mycotypha indica*:

Myzel auf Glasobjektträgern, wenige Kerne (vegetative Anastomosen fehlen); a) FM, b) Ph.

Fig. 11: Hyphae developing on slides, nuclei few (vegetative anastomoses are missing); a) fm, b) ph.

Abb. 12 *Mycotypha indica*:

Kerne in Hyphenspitzen auf Glasobjektträger, wenig Kerne, keine synchrone Kernteilung; a) Ph, b) FM.

Fig. 12: Nuclei in tips of hyphae developing on glasslides, few nuclei, division not synchronous; a) fm, b) ph.

Abb. 13: a) *Benjamiella poitrasii*:

Spitze einer submers wachsenden Hyphe, Pfeile kennzeichnen synchrone Telophasekerne. Negativdarstellung kh(FM).

b) *Mycotypha africana*:

Submers wachsende Hyphenspitze; asynchrone-Kernteilung (FM).

Fig. 13a: Tip region of a submers growing hypha, arrows show synchronous dividing nuclei in telophase. Negative image (fm).

b) Hyphal tip growing submers; asynchronous dividing nuclei (fm).

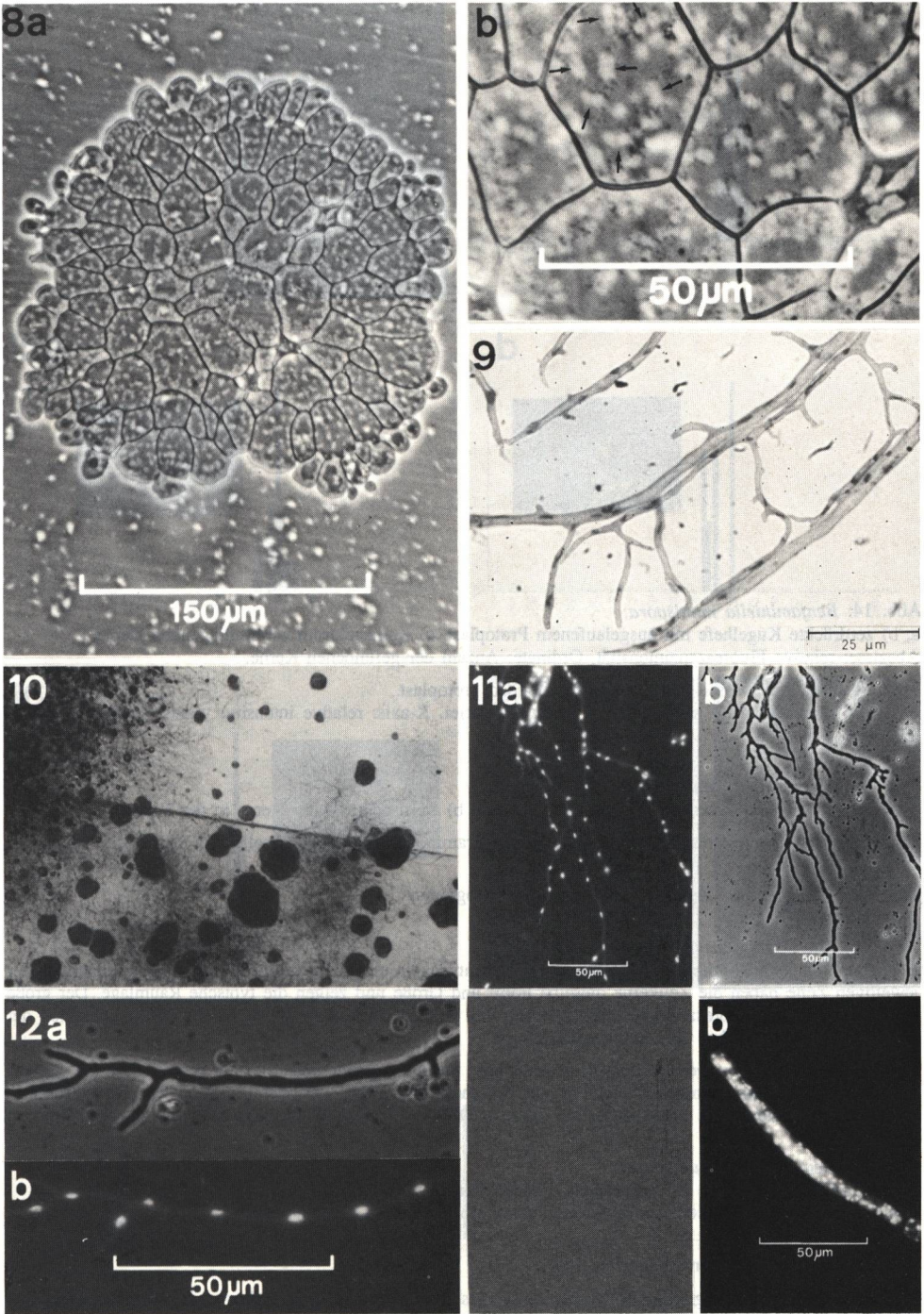


Abb. 14: *Benjaminiella multispora*:

a, b) zerdrückte Kugelhefe mit ausgelaufenem Protoplast. c) Kernspektrum der freiliegenden Kerne. Abszisse: relative Fluoreszenzintensität, Ordinate: Anzahl der gefundenen Kerne.

Fig. 14: a, b) Compressed yeast cell with extruded protoplast.

c) Fluorescence intensity histogram of extruded nuclei. X-axis: relative intensity; y-axis: number of nuclei measured.

Abb. 15: *Benjaminiella multispora*:

a) Kernspektrum der Zellkerne in der Mutterzelle und b) Kernspektrum der Kerne in der Tochterknospe.

Fig. 15: a) Mother cell with nuclei and intensity histogram. b) Bud (daughter cell) with its intensity histogram.

Abb. 16: *Mucor rouxii*: Kernspektrum, Intensity histogramm

Abb. 17: *Mucor racemosus*:

a, b) Junge Kugelhefen, die sich anaerob aus Sporen entwickeln und noch wenige Kerne besitzen. Innerhalb der jeweiligen Zelle haben die Zellkerne dieselbe Form und Größe und zeigen die typische Raumlage. Der große Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen den Kernen der beiden Zellen ist der DNS-Replikation der Kerne in a) zuzuschreiben (gleiche Vergrößerung).

Fig. 17: a, b) Two young yeast cells, still of small size, developing anaerobically from spores. Note the uniform appearance of the small number of nuclei in each cell and their typically peripheral location. The great difference in fluorescence intensity is construed as the result of DNA replication of nuclei in a) (same magnification).

Abb. 18: *Benjaminiella multispora*:

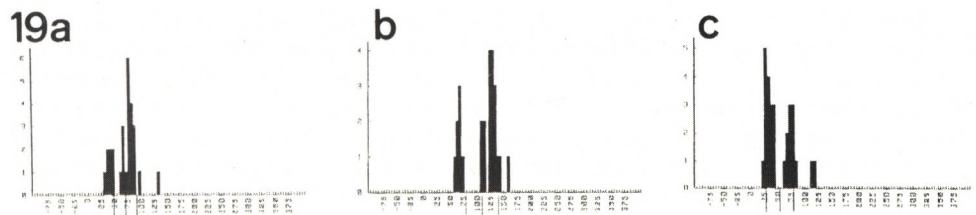
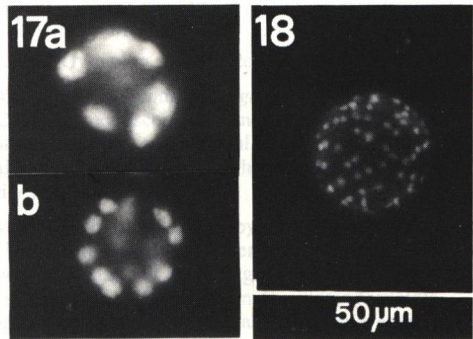
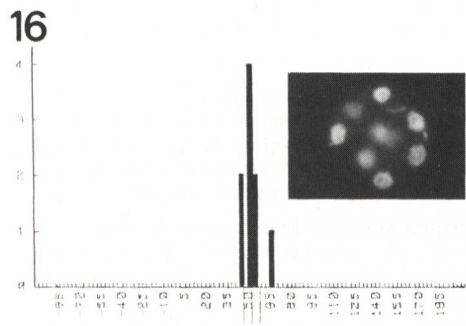
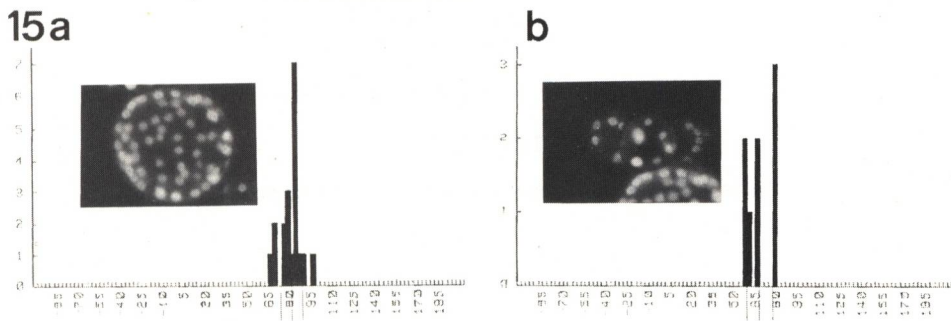
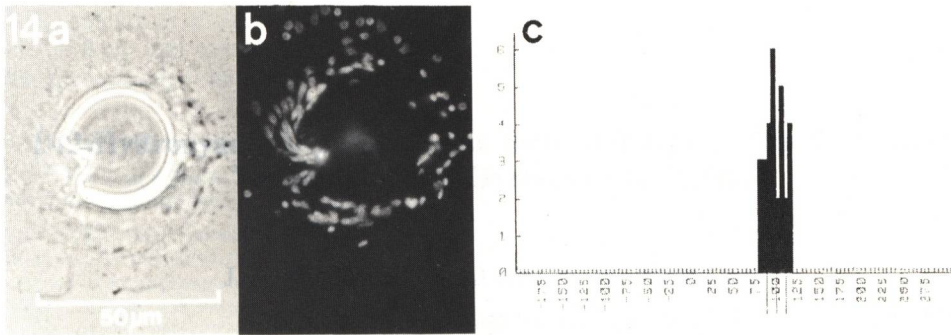
Synchrone Telophasekerne in der gesamten Hemisphäre.

Synchronous dividing nuclei passing through telophase throughout a hemisphere.

Abb. 19: Kernspektren der *Mycotypha*-Arten:

Fig. 19: Double peak histograms of *Mycotypha* species: a) *M. africana*, b) *M. indica*, c) *M. microspora* (beachte signifikanten Prozentsatz von Kernen mit dem dreifachen DNS-Gehalt).

(A significant percentage of nuclei displays a triple content of DNA).





Deutsche Gesellschaft für Mykologie e.V.
German Mycological Society

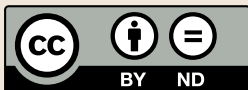
Dieses Werk stammt aus einer Publikation der DGfM.

www.dgfm-ev.de

Über [Zobodat](#) werden Artikel aus den Heften der pilzkundlichen Fachgesellschaft kostenfrei als PDF-Dateien zugänglich gemacht:

- **Zeitschrift für Mykologie**
Mykologische Fachartikel (2× jährlich)
- **Zeitschrift für Pilzkunde**
(Name der Hefreihe bis 1977)
- **DGfM-Mitteilungen**
Neues aus dem Vereinsleben (2× jährlich)
- **Beihefte der Zeitschrift für Mykologie**
Artikel zu Themenschwerpunkten (unregelmäßig)

Dieses Werk steht unter der [Creative Commons Namensnennung - Keine Bearbeitungen 4.0 International Lizenz](#) (CC BY-ND 4.0).



- **Teilen:** Sie dürfen das Werk bzw. den Inhalt vervielfältigen, verbreiten und öffentlich zugänglich machen, sogar kommerziell.
- **Namensnennung:** Sie müssen die Namen der Autor/innen bzw. Rechteinhaber/innen in der von ihnen festgelegten Weise nennen.
- **Keine Bearbeitungen:** Das Werk bzw. dieser Inhalt darf nicht bearbeitet, abgewandelt oder in anderer Weise verändert werden.

Es gelten die [vollständigen Lizenzbedingungen](#), wovon eine [offizielle deutsche Übersetzung](#) existiert. Freigebiger lizenzierte Teile eines Werks (z.B. CC BY-SA) bleiben hiervon unberührt.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Zeitschrift für Mykologie - Journal of the German Mycological Society](#)

Jahr/Year: 1988

Band/Volume: [54_1988](#)

Autor(en)/Author(s): Forst T.G., Prillinger H.

Artikel/Article: [Vergleichende karyologische Untersuchungen an dimorphen Zygomyceten 139-153](#)