

of their germination, the basidiospores at different stages of development were fixed in Carnoy's fixative and stained with Hematoxylin and counter stained with light green.

Normally the teliospores of this rust produced a four-celled basidium and equal number of basidiospores borne on long acicular sterigmata (Figure A). The basidiospores so produced normally germinate by a long spindle-shaped germ tube, either while still attached to the sterigmata, or in detached condition (Figure C). Occasionally, however, instead of producing germ tubes, some basidiospores were found to multiply and produce secondary, tertiary and even quaternary crops of basidiospores either through mechanism of proliferation (NAIR²) or binary fission type of cell multiplication. The occurrence of the phenomenon of 'binary fission' in the process of multiplication of basidiospores had not been reported previously in the rust fungi and stimulated further interest and lead to detailed observations of this unique behaviour, the results of which are presented in this brief note.

Prior to the process of 'cell division' or binary fission, the basidiospores were observed to swell in size. Such basidiospores then elongate, attain a binucleate, or quadri-nucleate status (Figure D) depending upon their initial nuclear status and start multiplication through simple cell division laying down cross septa in the process, thus resulting in the development of a secondary basidiospore, very similar in nuclear status to the parent spore (Figure E). The cell division occurs at right angles to the main axis of the spore separating the newly formed secondary spore by a septum of its own very similar to the mechanism involved in 'binary fission'. The secondary basidiospores were eventually found to break away from the mother spore along the line of the newly formed septum (Figure G). This process was repeated several times to give the appearance of a chain of four or more basidiospores (Figure F), and took less than 18 h to complete. The secondary basidiospores so produced were doliform in shape (Figure G) as compared to the napiform nature of the primary basidiospores (Figure B).

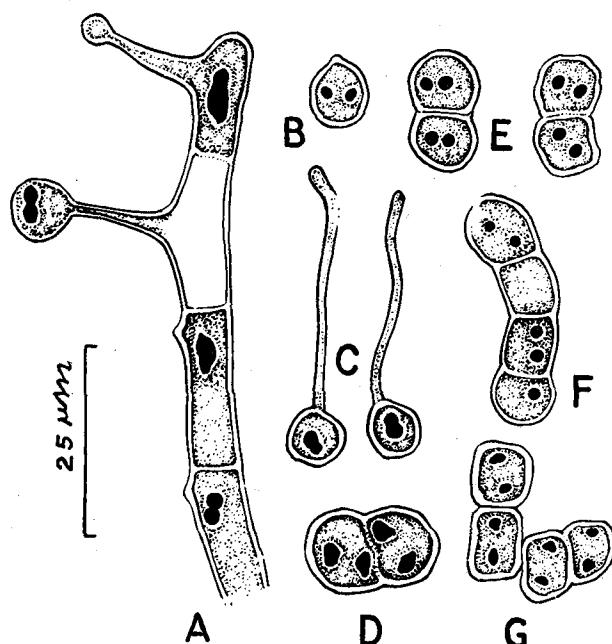
Preliminary cytological studies show that the primary basidiospores in this fungus may be either uninucleate or binucleate, the first two phases of the meiotic division taking place in the basidium proper and the third mitotic division in the basidium or the resulting basidiospores. It was of interest to note that the process of binary fission or cell division described above was common to both uninucleate and binucleate basidiospores and was thus independent of the nuclear status of the parent basidiospores.

This mode of multiplication by simple cell division or binary fission is a common feature with members of Schizomycetes, Schizosacharomycetes and other unicellular organisms and is being reported for the first time in the rust fungi.

Zusammenfassung. Erster Bericht über die Vervielfältigung von Sporidien durch binäre Spaltung bei *Ravenelia hobsoni*.

K. R. GOPINATHAN NAIR³

Maharashtra Association for the Cultivation of Science,
Law College Road, Poona 4 (India), 15 May 1971.



Sporidia of *Ravenelia hobsoni*. A) 4-celled basidium with basidiospores. B) Binucleated basidiospore. C) Germinating basidiospores. D) Quadri-nucleate status of basidiospore during the process of multiplication. E) Formation of secondary basidiospores through fission. F) Basidiospores in chain after two consecutive divisions. G) Separation of basidiospores after cell division.

² K. R. GOPINATHAN NAIR, Bull. Torrey bot. Club 98, 48 (1971).

³ Author is grateful to Prof. M. N. KAMAT, Head of Mycology Division, M.A.C.S. Laboratory, Poona 4, for his deep interest and guidance, Dr. S. R. SARVOTHAM, Quality Control Laboratory, Hindustan Antibiotics Ltd., Pimpri, for the laboratory facilities and encouragement given. Thanks are also due to Dr. A. V. SATHE for several suggestions and to Mr. D. N. NAGPURE for drawings.

Zum Schlüpfprozess bei Fischen: I. Der Aufbau der Eihülle und ihre Veränderungen während der Keimesentwicklung bei der Forelle (*Salmo trutta fario* L.)

Die Entwicklung vieler Fische vollzieht sich unter dem Schutz einer Eihülle, die durch Sekretion eines oder mehrerer Stoffe (Enzyme) aus häutigen Drüsen des Embryos aufgelöst werden soll¹. Da sich diese Drüsen schon relativ früh in der Entwicklung (Augenpunktstadium) nachweisen lassen, könnte durch sukzessive Sekretabgabe eine allmähliche, strukturelle Veränderung der Eihülle erfolgen, die der fertig ausgebildete Fisch zum Schlüpfzeitpunkt nur noch zerreißen müsste.

Die in den Experimenten verwendeten Forelleneier wurden in der früher beschriebenen Weise aufgezogen² und mit Glutaraldehyd (6% in 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7,2) im Alter von 0,2, 4,8, 15, 19 und 23 Tagen fixiert. Die Ein-

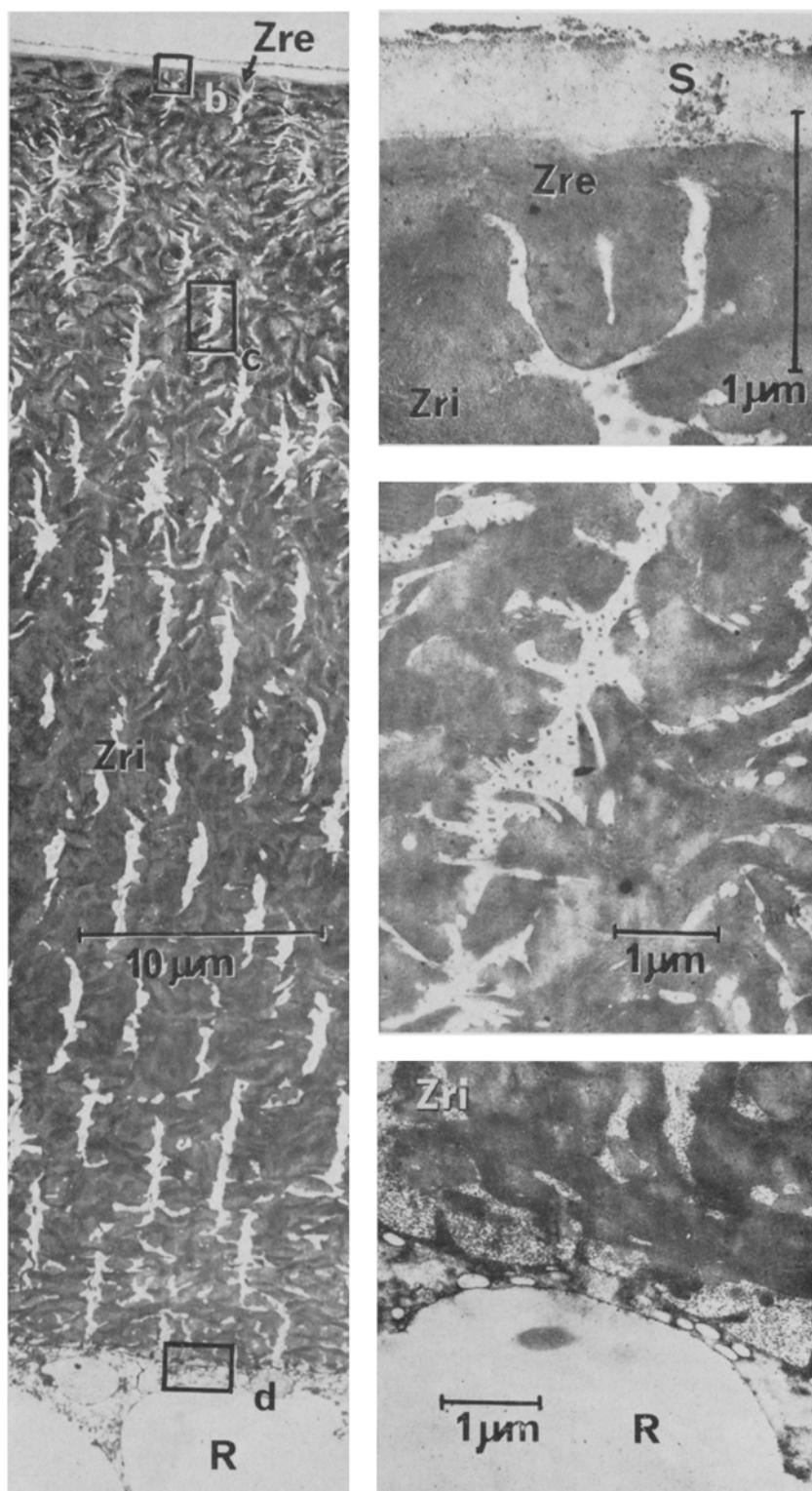
¹ I. ISHIDA, Annot. zool. jap. 22, 134 (1944).

² H. E. HAGENMAIER, Wilhelm Roux' Arch. EntwMech. 162, 19 (1969).

bettung erfolgte mit einer Nachfixierung über Osmium-tetraoxid (1%) und nach Entwässerung über Alkohol, Aceton in Araldit, wo sie zur besseren Durchdringung 2–3 Tage verblieben. Die Schnitte (etwa 600 Å) wurden mit Bleicitrat und Uranylazetat nachkontrastiert und kamen im EM 9 A (Zeiss) zur Auswertung.

In der Ultrastruktur der Eischale von reifen Eiern zeigten sich von aussen nach innen mehrere Schichten (Figur):

Eine dünne homogene Schleimschicht; eine stark osmophile, gleichfalls nahezu homogene Schicht; eine inhomogene Lage mit Streifung in radiärer Richtung, und innen angelagert das kortikale Ooplasma mit den typischen Rindenvakuolen. Bei der elektronendichten Schicht handelt es sich um die Zona radiata externa (ZRE), der sich die von Kanälen durchsetzte viel stärkere Zona radiata interna (ZRI) anschliesst, die in lichtmikroskopischen Un-



Übersichtsbild (a) mit Ausschnittvergrösserungen der markierten Regionen (b, c, d). Radiärschnitt durch Schleimschicht (S), Zona radiata externa (ZRE), Zona radiata interna (ZRI) und das kortikale Ooplasma mit Rindenvakuolen (R).

tersuchungen auch als Kortikalschicht bezeichnet wird³. Während die ZRE elektronenmikroskopisch eine geschlossene Schicht darstellt, die die Eihülle nach aussen hin abschliesst, ist die ZRI inhomogen und aus Säulen in der Form eines Fischgrätenmusters aufgebaut. Die zwischen diesen Säulen verlaufenden Porenkanäle durchdringen die ZRI völlig in annähernd geradlinigem Verlauf. Während der Eireifung dienen sie mit Hilfe von Mikrovilli, in die Protoplasma-Ausläufer der Follikelzellen einwachsen, der Ernährung der Oocyte. Ob die in den Kanälen deutlich sichtbaren kugeligen Gebilde (Figur c) als Follikelmaterial oder als Reststücke solcher Mikrovilli gedeutet werden können, muss hier offen bleiben. Wir konnten sie zwar nur in den Frühstadien feststellen, doch sprechen alle Anzeichen dafür, dass sich sowohl die Mikrovilli als auch die Follikelzellen zur Ovulation völlig aus den Kanälen zurückziehen⁴.

Die Dickenverhältnisse der drei untersuchten Schichten gehen aus der Abbildung deutlich hervor und weisen die ZRI mit etwa 50 µm als besonders mächtig aus, während die ZRE mit 0,2 µm etwa 2–3 mal dünner ist als die aufgelagerte Schleimschicht.

Die beiden äusseren Schichten (Schleimschicht und ZRE) sind beide annähernd homogen, aber dennoch deutlich voneinander abgegrenzt, da die ZRE viel dichter ist (Figur b). Während die Schleimschicht das Ei gleichmässig einhüllt, bildet die ZRE zum Zeitpunkt der Ovulation sog. Verschlusspropfen aus, die die Kanäle der ZRI wie mit einem Korken verschliessen. Die Aufgabe der Schleimschicht scheint eine reine Schutzfunktion zu sein, indem sie sich im lebenden Zustand überaus resistent gegenüber Bakterien und Pilzen erweist und erst wenige Tage vor dem Schlüpfen Auflöseerscheinungen zeigt. Da sie mechanisch die am wenigsten widerstandsfähige Schicht der Eihülle darstellt, ist ihre Resistenz besonders auffallend. Für die Möglichkeit einer dauernden Regeneration aus dem Ei heraus konnten wir keine Hinweise finden; dagegen spräche aber auch die Herkunft der Schleimhaut, bei der es sich um eine tertiäre Eihülle handelt⁴. Bei dem Material der Zona radiata handelt es sich wahrscheinlich um keratinartige Proteine⁵. Versuche, die Schwefelbrücken durch «sulfhydryl compounds» zu sprengen, führten bei Schalen von unbefruchteten Eiern zu einer Quellung um 35–65%, entsprechend der Anwendung von Thioglycolsäure (0,1 M) bzw. Cystein (0,1 M).

Innerhalb der ersten 2 bis 3 Tage nach der Eiablage lassen sich in der Festigkeit der Hülle mehrere Phasen unterscheiden, die durch eine verschieden hohe Belastbarkeit

hervortreten⁶. In der Hülle zeigen sich zu dieser Zeit aber keine sichtbaren strukturellen Veränderungen, die einen Hinweis geben könnten, weshalb die Erklärung wahrscheinlich eher aus der chemischen Zusammensetzung der einzelnen am Bau beteiligten Stoffe ersichtlich sein wird. Betrachten wir die Eihülle von der Zeit des Augenpunktstadiums an, so zeigen sich erst kurz vor dem Schlüpfen (2–3 Tage) Veränderungen, die aber nur die Schleimschicht betreffen, die jetzt allmählich zerfällt, während strukturelle Auflöseerscheinungen in der eigentlichen Eihülle (Zona radiata) über den gesamten Zeitraum nicht zu beobachten sind. Eine Auflösung der Eihülle erfolgt erst unmittelbar vor dem sich anschliessenden Schlüpfen von der ZRI her und lässt sich im Bereich des Kopfes zuerst feststellen. Die Ausschüttung des Sekretes ist also ein kurzfristiger Vorgang, dessen Mechanismus – nervöse oder humorale Steuerung – noch nicht geklärt ist⁷. Die sich anschliessende Verdauung der Hülle erfolgt über ein Eindringen des Sekretes in die Kanäle der ZRI und bewirkt ein völliges Kollabieren der gesamten Schicht, die entweder völlig gleichmässig aufgelöst wird oder teilweise zurückbleibt, wenn der Fisch durch bereits gebildete Löcher die Resthülle verlässt.

Summary. The investigation of the egg shell of *Salmo trutta fario* L. reveals several layers, which are chemically and physically different. During development of the egg, the chorion does not show notable changes in structure. Immediately at hatching the dissolution of the egg takes place as a result of the glands being on the head of the embryo.

H. E. HAGENMAIER und R. WILHELM^{8,9}

Zoologisches Institut der Universität Münster,
Hindenburghplatz 55, D-44 Münster (Deutschland),
8. November 1971.

³ E. A. ARNDT, Z. Zellforsch. 52, 315 (1960).

⁴ H. FLÜGEL, Z. Zellforsch. 83, 82 (1967).

⁵ E. G. YOUNG and W. R. INMAN, J. biol. Chem. 124, 189 (1938).

⁶ A. I. ZOTIN, J. Embryol. exp. Morph. 6, 546 (1958).

⁷ G. M. IGNATEVA, Dokl. Biol. Sci. Sect. (engl. Transl.) 128, 774 (1959).

⁸ Fräulein BARBARA BLUM danken wir für ihre technische Hilfe.

⁹ Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für finanzielle Unterstützung gedankt.

Antiviral Properties of Humic Acids

SCHULTZ¹ successfully used peat mull to prevent transmission of foot and mouth disease in pigs and it was assumed that the antiviral activity was due to the humic acids which probably caused denaturation of viral protein. The chemical structure of the humic acids is unknown, although in several laboratories many degradation products such as phenolic acids, carbohydrates and amino acids have been isolated². In order to study the antiviral properties of humic acids we prepared ammonium humate from peat water by a method previously described³ and tested this against Coxsackie virus A9 (Griggs-Baylor, obtained from Dr. SYRČEK, Prague, ČSSR) in cell culture. The cells, Fogh and Lund (FL) cells, were maintained with Eagle's minimum essential medium (MEM) mixed to equal parts with Hanks salt solution containing 0.5% Lac-

talbumin hydrolysate Difco (Difco Laboratories Detroit, Michigan, USA) and 0.01% Bacto yeast extract Difco. To this medium was added 10% heat inactivated calf serum, 100 µg/ml Streptomycin (VEB Jenapharm, Jena, DDR) and 100 IU/ml Penicillin G, Jenapharm. The cultures were incubated at 35°C and reached a cell density of 10⁶ cells/ml by day 3. At this stage the medium was replaced by maintenance medium containing 3% calf serum and the cultures treated with ammonium humate

¹ H. SCHULTZ, Dt. tierärztl. Wschr. 69, 613 (1962).

² W. WILDENHAIN, Freiberger Forschungsh. A 447, 7 (1969).

³ R. KLÖCKING and D. MÜCKE, Z. Chem. 9, 453 (1969).