Wpływ drożdży *Saccharomyces cerevisiae* na rozwój niektórych śluzowców

*Influence de la levure Saccharomyces cerevisiae sur le développement
de certains myxomycètes*

FRANCISZEK KSAWERY SKUPIEŃSKI

Z Zakładu Anatomii i Cytologii Roślin U. Ł.

(Wpłynęło dn. 3.X.53 r.)

Badania nad wpływem drożdży na rozwój niektórych śluzowców prowadzone były na trzech gatunkach tych organizmów, a mianowicie na *Didymium nigripes* F r., *Didymium difforme* D u b y i *Physarum polycephalum* S c h w e i n., otrzymanych z gnijącego siana w kryształizatorze w Zakładzie Anatomii i Cytologii roślin Uniwersytetu Łódzkiego. Z materiału tego wyhodowałem czyste kultury doświadczalne na agarze z rozcieńczoną brzeczką słodową lub z wywarem z marchwi i kartofla. Na tych pożywkach wszystkie trzy śluzowce rosną bardzo dobrze, w szczególności *Physarum polycephalum*.

Istnieje bardzo bogata literatura dotycząca wpływu składu podłoża na rozwój śluzowców. W ostatnich latach zostały poświęcone tej sprawie, a w szczególności wpływowi drożdży żywych lub zabitych na ontogenezę licznych śluzowców, prace ogłoszone przez A. L. C o h e n a (1, 2) i przez J. C. S o b e l s (8). Cohen karmił plazmodia różnych śluzowców drożdżami żywymi i zabitymi *Saccharomyces ellipsoideus*, i w obu wypadkach plazmodia owocowały. J. C. Sobels używała do swych hodowli drożdży piekarnianych *Saccharomyces cerevisiae*, zabitych i żywych, również z pełnym powodzeniem.

Użyte przeze mnie do badań drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, hodowane w czystych kulturach, wyprowadziłem ze zwykłych drożdży prasowanych. Stosowałem drożdże żywe i martwe (zabijane w sterylizatorze Kocha).

Bardzo ważnym zagadnieniem w rozwoju śluzowców jest sprawa współżycia tych organizmów z bakteriami. Nie ma śluzowca, który by mógł żyć samodzielnie bez bakterii. W pracy mojej nad rozwojem *Didy-*

mium difforme (6) wykazałem, że pomiędzy śluzowcem i bakterią istnieje wyraźna symbioza. Jeżeli się osłabi w jakikolwiek sposób rozwój bakterii, śluzowiec ulega również osłabieniu i kończy zupełną degenerację. Dopiero kiedy do osłabionych i anemicznych kultur wprowadzi się dodatkowo jakąś inną żywą bakterię, plazmodia nabierają w szybkim tempie dużej żywotności, łączą się ze sobą w jedno silnie rozbudowane plazmodium, które po kilku dniach owocuje.

W trakcie moich badań stwierdziłem (patrz wyżej wymieniona praca), że plazmodia nie gardzą, poza bakteriami, i innym pożywieniem w postaci różnych pleśni, fragmentów grzybni grzybów wyższych, jak to również stwierdził G. M a n g e n o t na plazmodiach *Fuligo* (4), glonów i wreszcie drożdży.

Jest rzeczą naturalną, że, aby określić ściśle rolę jakiegoś obcego organizmu w rozwoju śluzowca, czy to nim będzie pleśniak, czy glon, czy jakaś obca bakteria, czy wreszcie drożdże, należy przede wszystkim usunąć ze współżycia ze śluzowcem bakterię z nim związaną. Jest jednakże niemożliwe, w obecnym stanie techniki, rozdzielić oba organizmy tak, aby otrzymać zupełnie czyste plazmodia. Wszelkie zabiegi, mające na celu zabicie bakterii (temperatura, środki chemiczne) prowadzą przede wszystkim do zabicia samego śluzowca. Sprawie czystych kultur śluzowców poświęcony został w ostatnich latach szereg prac, jak prace A. L. C o h e n a (1, 2), M. L o c q u i n a (3) i J o a n n y C. S o b e l s (8). Autorzy ci opisują różne metody oczyszczania plazmodiów z bakterii, ale żadna z nich nie daje 100% gwarancji, że oczyszczone plazmodia są naprawdę czyste, a jeżeli są zupełnie czyste to, że są żywe.

Starano się dotychczas uwolnić plazmodia śluzowców od bakterii: a) przez sterylizację zarodników przed ich kiełkowaniem; b) przez kiełkowanie zarodników w wielkiej masie płynu odżywczego — co rzadko doprowadzało do otrzymania czystych kultur; c) przez przeprowadzanie plazmodiów przez środowisko sterylne i nieodżywcze. Nie zawsze się te zabiegi udawały, bo zarodniki nie wszystkich śluzowców znoszą działanie antyseptyków przy pierwszej metodzie. (a) lub giną z głodu podczas dziesięciokrotnego przeprowadzania ich przez środowisko nieodżywcze i antyseptyczne (M. L o c q u i n).

Na specjalną uwagę zasługuje praca J. C. S o b e l s (l. c.). W rozdziale VIII-tym cytowanej pracy, na stronie 84, w części 5-ej, zatytułowanej: „Méthodes supplémentaires de purification des plasmodies“ autorka pisze: „Pour éviter les nombreux repiquages sur gélosel avec inhérents à la méthode de purification habituellement employée et pour détruire les bactéries difficiles à éliminer, nous avons mis au point une technique nouvelle.

Nous avons tout d'abord essayé sans succès trois méthodes dont la première consistait simplement à traiter la culture de plasmode par le milieu de Raulin (69), en la recouvrant de cette solution. Le plasmode arrête de se développer, mais les bactéries restent vivantes. La seconde méthode, mettait en oeuvre le sulfamide 1162F, aux concentrations de $1 \cdot 10^{-3}$ et $1 \cdot 10^{-4}$. Ni le plasmode, ni les bactéries ne souffrent de la présence de ce produit. Un traitement de la culture de plasmode pendant 20 minuts avec de l'eau oxygénée à 6 ou 12 volumes (un volume d'eau oxygéné à 12 volumes par exemple, peut dégager 12 volumes d'oxygène), donne seulement une contraction du plasmode qui reste vivant, les bactéries ne sont pas tuées. Si on fait agir $1' \text{ H}_2\text{O}_2$ pendant un temps plus long que 20 minutes, seul le plasmode meurt.

Nous avons enfin utilisé avec succès la méthode qui consiste à faire agir le mélange pénicilline (10 U. O.) — streptomycine (10 U. G.) dilué dans 10 cc d'eau bidistillée stérile. Après un contact de 24 heures, ce liquide est enlevé, et le plasmode est repiqué le jour suivant (Sobels (85).

Malgré l'efficacité de cette dernière méthode, il ne nous a pas encore été possible de conserver les quatre derniers plasmodes en culture pure."

Z zacytowanego tu ustępu wynika, że żadna z zastosowanych metod nie dała pozytywnego wyniku, nawet mieszanina penicyliny z streptomycyną. Próby zabicia bakterii i zachowania przy życiu plazmodiów zrobiły zupełne fiasko. Można jedynie osłabić bakterię czy to przez założenie kultury na pożywcę powtórzonej*, czy przez założenie na pożywcę zupełniej chudej, tj. na czystym, płukanym agarze na wodzie dystylowanej. Na tym podłożu bakterie żyją i rozmnażają się bardzo źle, przeto niedostatek ich wyraźnie odbija się na charakterze plazmodiów, które w tej sytuacji są bardzo drobne i bardzo anemiczne. Na takim jałowym podłożu drobnutkie plazmodia słabo się łączą w większe plazmodia, a słaby rozwój bakterii nie nadąża za potrzebami pokarmowymi śluzowca; jest wprost za mało bakterii dla zaspokojenia jego głodu. Ponieważ w podłożu bakterii jest coraz mniej, na skutek zjadania ich przez plazmodia, proces rozwojowy śluzowca nie dobiega do końca, plazmodia tworzą cysty i przechodzą w stan spoczynku. Od tego momentu można rozpocząć obserwację nad wpływem drożdży na rozwój śluzowców.

* Założenie kultury powtórzonej polega na tym, że blok agarowy, na którym odbył się całkowity cykl rozwojowy śluzowca, zalewamy wodą i całość sterylizujemy trzykrotnie. Na otrzymanym podłożu szczepimy świeże zarodniki tego samego gatunku śluzowca. Na takim odnowionym podłożu śluzowiec rozwija się bardzo źle: plazmodia są bardzo drobne, anemiczne i zazwyczaj nie dochodzi do ich owocowania.

W celu przeprowadzenia badań, założyłem kilka serii kultur, w różnych odstępach czasu w próbkach wielkości 2/20 cm, oraz szklanych naczyniach płaskich Kolle, zwanych sojkami, dających powierzchnię pożywki agarowej około 90 cm². Kultury przechowywane były zawsze w temperaturze pokojowej.

I - a s e r i a k u l t u r

W tej serii założyłem kultury trzech śluzowców: *Didymium nigripes*, *Didymium difforme* i *Physarum polycephalum* na czystym agarze na wodzie dystylowanej, w próbkach wielkości 20/2 cm.

A. *Didymium nigripes*

Zarodniki, użyte do kultur tego śluzowca, pochodzą z zarodni powstałych na agarze z wywarem z marchwi i kartofla (w kulturach czystych). Po mniej więcej dziesięciu dniach na powierzchni wszystkich kultur pojawiły się drobnutkie i anemiczne plazmodia. Do połowy kultur wprowadziłem (w dwa tygodnie po ich założeniu) po porcji drożdży, pobranych z czystych hodowli; porcja drożdży w moich doświadczeniach stanowi ilość drożdży, która daje się zaczerpnąć uszkiem igły platynowej o średnicy około 3 mm, co na wagę wynosi około 5 mg. Po pięciu dniach, w kulturach tych, dokoła każdego złoża drożdżowego pojawiły się plazmodia większego kalibru, łatwo dostrzegalne gołym okiem. W dalszym etapie plazmodia rozrosły się jeszcze więcej, a jednocześnie złoża drożdżowe mocno się zmniejszyły. W bloku agarowym plazmodia potworzyły głębokie wyżłobienia, odpowiadające ich formie. Widać tu wyraźne współdziałanie drożdży w procesie enzymetycznym śluzowca, wyrażające się w obfitszej niwelacji agaru przez plazmodium.

Tak odżywione i rozrośnięte plazmodia zaczęły, mniej więcej w dwa tygodnie po wprowadzeniu drożdży, przekształcać się w owocniki. W związku z tym zasługuje na uwagę znamieny fakt. Mianowicie, w niektórych kulturach plazmodia, pomimo że są najedzone drożdżami i silnie rozwinięte, nie owocują, dopiero dodanie nowej porcji drożdży przyspiesza proces owocowania; jeżeli natomiast takie niedokarmione plazmodium nie otrzyma nowej porcji drożdży, nie wytworzy owocników i ulegnie w końcu degeneracji. Należałoby w związku z tym przypuścić, że rytm dojrzewania plazmodiów czy to w środowisku naturalnym, czy w kulturach czystych, idzie w parze z ilością pobranego pożywienia: wystarczy niekiedy niewielka ilość dodatkowych komórek drożdżowych, aby plazmodium osiągnęło kulminacyjny punkt dojrzalsości i wyowocowało. Powstałe w takich kulturach owocniki nie odbiegają, tak pod względem formy jak i struktury od owocników, tworzących się w środowisku naturalnym.

W drugiej połowie kultur, które nie otrzymały drożdży, plazmodia zachowały, w ciągu dwóch miesięcy od daty ich powstania, pierwotny swój anemiczny wygląd, nie zdradzając absolutnie tendencji w kierunku wyowocowania. Aby się przekonać, czy plazmodia te zachowały swą zdolność rozwojową, wprowadziłem do każdej z kultur po zwykłej porcji drożdży. W dwunastu na dwadzieścia takich kultur pojawiły się dość szybko, bo już w pięć dni po wprowadzeniu drożdży, duże plazmodia, które z nadzwyczajną energią pożerały złoża drożdżowe. We wszystkich tych kulturach tak ożywione i dożywione plazmodia wyowocowały, tworząc normalne zarodnie, w 14 do 16 dni po dodaniu drożdży. W pozostałych ośmiu kulturach anemiczne plazmodia, mimo otrzymania świeżych drożdży, wcale się nie poprawiły; po bliższym ich zbadaniu okazało się, że są one martwe; prawdopodobnie długotrwała głódówka była powodem ich śmierci.

Ciekawym i stale powtarzającym się zjawiskiem jest to, że plazmodia głodzone przez dłuższy okres czasu (jak to było z ostatnimi dwudziestu kulturami), nabierają od samego początku, po wprowadzeniu drożdży, nadzwyczajnego wigoru i liczba zarodni, które z nich się tworzą, jest daleko większa niż w kulturach, w których głódówka trwała krócej. Mielibyśmy tutaj do czynienia z dodatnim wpływem przedłużonego głodu na podniesienie się plonu śluzowca.

B. *Didymium difforme*

W tym samym czasie i z zastosowaniem tej samej metody, co dla wyżej opisanego śluzowca, założyłem kultury *Didymium difforme*. Stwierdziłem od razu, że ten śluzowiec zachowuje się zupełnie inaczej niż dwa inne, użyte do doświadczeń. Plazmodia na czystym agarze tworzą się również w dużej ilości, są drobne i anemiczne jak plazmodia *Didymium nigripes*, ale różnią się od tych ostatnich tym, że mimo otrzymania drożdży ulegają zazwyczaj degeneracji; w nielicznych tylko kulturach tworzą się albo drobne okrągłe owocniki, normalne pod względem strukturalnym, albo okrągłe cysty koloru kremowego. Z całego szeregu powtórzeń mogłem wywnioskować, że drożdże nie sprzyjają rozwojowi *Didymium difforme*.

C. *Physarum polycephalum*

Ten organizm daje najlepsze efekty w doświadczeniach nad wpływem drożdży na rozwój śluzowców.

We wszystkich kulturach powstały, na agarze jałowym, już w siedem dni po zasianiu zarodników, liczne drobne plazmodia, które wyłobliły w podłożu wyraźne rozgałęzione wgłębienia, odpowiadające ich kształtom oraz okrągłe i głębokie jamki. Po dwóch tygodniach od poja-

wienia się plazmodiów, w żadnej z kultur nie było owocowania. Stwierdziwszy ten fakt, wprowadziłem do połowy kultur po porcji drożdży, a więc takiej samej ilości jak do kultur dwu poprzednich gatunków śluzowców (około 5 miligramów na kulturę). W krótkim czasie, bo po czterech już dniach, potworzyły się w tych kulturach duże pojedyncze plazmodia przez zlanie się drobnych i rozproszonych plazmodiów. Nowoutworzone plazmodia rozpostarły się szerokim wachlarzem na podłożu agarowym, nabierając barwy żółtej i wydrążając w podłożu głębokie rowki oraz jamki, wyrazistsze i głębsze niż te, które wytwarzają plazmodia anemiczne, źle odżywiane. Tak rozrośnięte plazmodia przekształciły się po dziesięciu dniach, w owocniki. Charakterystyczne jest, że liczba owocników, które powstały w takich „podpędzonych” kulturach, nie jest wielka, mianowicie od dwóch do czterech owocników w jednej kulturze. We wszystkich kulturach owocniki są zbudowane normalnie tj. w sposób, w jaki są zbudowane owocniki w środowisku naturalnym. W drugiej połowie kultur, które nie otrzymały drożdży, nie powstał ani jeden owocnik w okresie dwu miesięcy od daty zaszczepienia zarodników. Plazmodia w ciągu tego długiego okresu głodowania zachowały swą żywotność, poruszały się stale z miejsca na miejsce, lecz nie posiadały dostatecznych warunków do wyowocowania. Do wszystkich tych kultur, w dwa miesiące po rozsianiu zarodników, a w siedem tygodni po powstaniu plazmodiów, wprowadziłem drożdże w takiej samej ilości jak do kultur poprzednio opisanych. Drobniutkie plazmodia, będące dotychczas w stanie anemicznym, skupiły się w ciągu kilku dni dokoła złóż drożdżowych i pożerając je energicznie, powyrastały w duże, silnie rozgałęzione plazmodia, które w końcu zrosły się w jedno duże, silnie rozgałęzione plazmodium. Taki przebieg faktów miał miejsce we wszystkich kulturach bez wyjątku. W osiemnaście dni po wprowadzeniu drożdży plazmodia zaczęły owocować, przy tym stwierdziłem ciekawe zjawisko, mianowicie we wszystkich kulturach powstało trzy razy więcej owocników niż w pierwszej części kultur, bo od jedenastu do piętnastu w każdej kulturze (w poprzedniej grupie kultur tylko 2—4 owocniki). Fakt ten wydaje mi się o tyle ciekawszy, że warunki dla obu grup kultur były jednakowe: skład pożywki, rozpiętość jej powierzchni oraz temperatura. Tę trzykrotnie większą ilość powstałych owocników w drugiej grupie kultur należy, moim zdaniem, przypisać długotrwałemu procesowi głodzenia plazmodiów, trwającemu 50 dni wtedy, kiedy głodzenie plazmodiów w pierwszej grupie kultur trwało tylko 7 dni. Stwierdziłem jednocześnie, że dłużej głodzone plazmodia *Physarum polycephalum* pożerają energiczniej drożdże, ale nie mniej energicznie pożerają wraz z drożdżami i agar: na miejscu, gdzie znajduje się złożo drożdżowe, tworzy się w płycie agarowej obszerna kawerna, sięgająca ścianki probówki. Kwestię poże-

rania agaru przez plazmodia śluzowców potraktowałem w sposób specjalny tak w mojej pracy z 1920 r. (5), jak i w pracy z 1928 r. (6). Wówczas już stwierdziłem, że w obecności niektórych mikroorganizmów (jak np. Sarcyny) plazmodium jest w stanie rozpuszczać agar, tworząc w nim głębokie jamki. Odnosiło się to jednakże do plazmodiów *Didymium difforme*, które istotnie rozpuszczają aktywnie agar w obecności niektórych bakterii i pleśni, a najsłabiej w obecności drożdży. Ówczesne moje obserwacje, dotyczące słabego rozpuszczania agaru przez plazmodia *Didymium difforme* w obecności drożdży, potwierdziły się w całej rozciągłości w trakcie obecnych badań.

II-a seria kultur

Zarodniki trzech wyżej wspomnianych śluzowców pobranych z czystych kultur, zostały rozsiane na pożywce czystej, chudej (agar na wodzie dystylowanej), w naczyniach płaskich Kolle. Po dziesięciu dniach, we wszystkich kulturach, pojawiły się plazmodia, rozproszone po całej powierzchni pożywki, drobne, anemiczne jak w poprzednio opisanych kulturach. Po dalszych piętnastu dniach charakter kultur nie zmienił się, były te same drobne i anemiczne plazmodia. W tym stanie rzeczy umieściłem w każdej kulturze, w samym środku płyty agarowej, mierzącej około 90 cm², po zwykłej porcji czystych drożdży. W krótkim czasie złoża drożdżowe zostały opanowane przez plazmodia. Po kilku dniach ze złoż tych nie pozostało prawie śladu, ale zato mało dostrzegalne dotychczas plazmodia wyrosły w okazałe plazmodia zabarwione na kolor kremowy. Najokazalsze plazmodia dały kultury *Physarum polycephalum*, mniej okazałe — *Didymium nigripes*, a najsłabsze — *Didymium difforme*.

Po wykończeniu złoż drożdżowych, odkarmione i powiększone plazmodia odrywają się od ich resztek i wędrują w inne, dalej położone punkty płyty, gdzie po kilku dniach wytwarzają owocniki. Najobficiej wyowocowały plazmodia *Physarum polycephalum*, a najsłabiej plazmodia *Didymium difforme*, przy czym owocniki tego ostatniego nie dojrzały zupełnie w tych warunkach, co potwierdziło wcześniej już otrzymane wyniki w obrębie tego gatunku śluzowca. Pierwotne drobne plazmodia *Physarum polycephalum*, które znalazły się na peryferii płyt agarowych, a więc zdala od centralnie położonego złoża drożdżowego i które nie zostały zagarnięte przez odkarmione i wyrosnięte w centralnej części płyty agarowej plazmodium, zachowały swój pierwotny anemiczny wygląd. Dopiero wprowadzenie dodatkowych złoż drożdżowych w zasięgu tych plazmodiów, pobudziło je do intensywnego rozrostu i w końcu do owocowania. Ciekawy tu bardzo jest stosunek pomiędzy rozrastającym się plazmodium, ilością wprowadzonych (i zjedzonych) drożdży i ilością

powstałych owocników. Stosunek ten wydaje się być stałym, czy to będzie kultura o małej powierzchni podłoża (w próbówce), czy kultura o powierzchni dużej (w sojce); plazmodium, po pobraniu pewnej ilości wprowadzonych drożdży, przekształca się w jednakową liczbę owocników. Decyduje tutaj, jak widać, ilość drożdży spożytych przez plazmodium, a nie przestrzeń rozwojowa śluzowca: jeżeli jest nadmiar wprowadzonych drożdży, to plazmodium po zaspokojeniu koniecznych swych potrzeb, opuszcza niedojedzone złożo, oddala się od niego i owocuje; gdy natomiast wprowadzimy niedostateczną ilość drożdży, to plazmodium po ich całkowitym zjedzeniu nie jest jeszcze w stanie wyowocować, dopiero wprowadzenie dodatkowej porcji drożdży umożliwi proces owocowania.

III - a s e r i a k u l t u r

Zarodniki trzech wyżej wspomnianych śluzowców zostały zaszczipione na pełnej pożywce z agaru na wywarze z marchwii i ziemniaka, po 20 kultur dla każdego gatunku śluzowca. Jednocześnie z zaszczepieniem zarodników, do połowy kultur każdego śluzowca wprowadziłem po porcji drożdży czystych. W kilka dni później, w kulturach *Physarum polycephalum* z drożdżami pojawiły się plazmodia silniejsze i liczniejsze niż w kulturach bez drożdży.

W kulturach *Didymium nigripes* bez drożdży w tym samym czasie nie pojawiło się ani jedno plazmodium, w kulturach natomiast z drożdżami, w dwóch z tych kultur, powstały silne plazmodia.

Jeżeli chodzi o *Didymium difforme*, to nie powstały plazmodia ani w kulturach bez drożdży ani w kulturach z drożdżami.

Kultury skontrolowane w 10 dni po rozsianiu zarodników wykazują następujące cechy:

Physarum polycephalum — silny rozwój plazmodiów w kulturach z drożdżami i w kulturach bez drożdży, jednakże w obecności drożdży plazmodia są wyraźnie silniejsze.

Didymium nigripes — we wszystkich kulturach z drożdżami pojawiły się plazmodia (początkowo utworzyły się one w dwóch tylko kulturach), w kulturach natomiast bez drożdży plazmodia nie pojawiły się.

Didymium difforme — w dalszym ciągu nie było plazmodiów ani w kulturach bez drożdży ani w kulturach z drożdżami.

Kontrola kultur w cztery miesiące po ich założeniu dała następujące wyniki:

Physarum polycephalum — we wszystkich kulturach występują plazmodia o wyglądzie czerstwym. Jednakże w tych kulturach, które otrzymały drożdże, plazmodia są już na oko silniejsze niż w kulturach, które drożdży nie otrzymały. Nie wiadomo, z jakiej przyczyny nie doszło

do owocowania; zaważył tu prawdopodobnie charakter podłoża (wywar z marchwi i ziemniaka).

Didymium nigripes — W kulturach bez drożdży w dalszym ciągu nie było plazmodiów, zato w kulturach z drożdżami potworzyły się owocniki dwu kategorii: normalne, trzoneczkowate i siedzące, placuszkowate, powyginane o wyglądzie etalialnym.

Didymium difforme — Ten śluzowiec zachowuje się, w tych samych warunkach, zupełnie inaczej niż dwa poprzednie. W kulturach z drożdżami plazmodia nie pojawiły się wcale; analiza mikroskopowa płynu kondensacyjnego wykazuje, że zawarte w nim zarodniki śluzowca nie wykiełkowały w obecności drożdży. W kulturach bez drożdży zarodniki wykiełkowały, ale plazmodium powstało tylko w jednej kulturze (na 10).

IV - a s e r i a k u l t u r

W tej serii uwzględniłem jeden tylko gatunek śluzowca — *Physarum polycephalum*.

Założyłem dwie grupy kultur na agarze czystym na wodzie dystylowanej. Do założenia grupy pierwszej (A) kultur użyłem zarodników pochodzących z zarodni powstałych na agarze z wywarem z marchwi i ziemniaka.

Do założenia grupy drugiej (B) użyłem zarodników pochodzących z zarodni powstałych na agarze w obecności żywych drożdży.

Już po dziesięciu dniach we wszystkich kulturach obu grup powstały drobne, anemiczne plazmodia.

G r u p a A. Do kilku kultur tej grupy wprowadziłem po jednej porcji żywych drożdży. Po kilkunastu godzinach drobne plazmodia skupiły się przy złożu drożdżowym i bardzo aktywnie je pożerały, przy czym dokoła każdego złoża utworzyła się w agarze głęboka zapadlina — rezultat działalności enzymatycznej plazmodiów. W krótkim czasie złoża drożdżowe zostały całkowicie zjedzone, a drobne plazmodia połączyły się w jedno duże, mocno zbudowane plazmodium koloru kremowego. Takie wtórne i silnie rozbudowane plazmodium zajmuje cały prawie teren pożywki agarowej. Złoże drożdżowe jest w końcu całkowicie pożarte, a na jego miejscu tworzy się w agarze głęboki lej, sięgający zazwyczaj ścianki próbówki (Ryc. 1). Po dziesięciu mniej więcej dniach plazmodia te potworzyły, we wszystkich kulturach, owocniki.

Do kilku innych kultur tej samej grupy wprowadziłem po porcji drożdży zabitych. Do każdego złoża drożdżowego podpełzły drobniutkie plazmodia i zjadały je z widoczną żarłocznością. W końcu, z drobnych i podkarmionych plazmodiów, powstało jedno silnie zbudowane plazmodium, pokrywające całą powierzchnię pożywki agarowej. Złoża aga-

rowe zostały silnie podkopane przez plazmodia i w końcu na ich miejscu potworzyły się w agarze wkłęsnięcia, które jednakże są płytsze niż wkłęsnięcia potworzone w obecności drożdży żywych. Plazmodia te, mimo ich silnego rozwoju, nie owocowały. Dowodziłoby to, że w trakcie zabijania komórek drożdżowych, podczas ich sterylizacji, został znisz-

Ryc. 1. Plazmodium *Physarum polycephalum* skupione dookoła otworu wydrążonego przez siebie w agarze po spożyciu złoży drożdżowego.

Plasmode de Physarum polycephalum autour de la caverne, creusée par lui à la place du dépôt de la levure.

czony jakiś czynnik, który w drożdżach żywych pobudza plazmodia do owocowania. Wprowadzenie do takich kultur z drożdżami zabitymi drożdży żywych doprowadziło plazmodia do wytworzenia normalnych owocników.

G r u p a B. Do założenia tej serii kultur użyłem zarodników pochodzących z zarodni wyhodowanych na podłożu agarowym z drożdżami żywymi. Do kultur tych wprowadziłem po porcji drożdży żywych. Po kilku dniach potworzyły się bardzo silne plazmodia, które w szybkim tempie zjadły złoży drożdżowe, tworząc na ich miejscu głębokie kawerny.

Najwyraźniej jednak dał się tu odzwierciedlić wpływ drożdży w ilości owocników, tworzących się w obu grupach kultur: w grupie A ilość ta nie przekracza z reguły 10—15 owocników w jednej kulturze, w grupie natomiast B wynosi od 20 do 25 owocników. Ponieważ podobne zjawisko potwierdziło się w wielokrotnie powtarzanych kulturach, należy przypuścić, że chodzi tu o zsumowane działanie drożdży na rozwój śluzowca w grupie B kultur.

Zsumowanie działania drożdży polega prawdopodobnie na tym, że:
1^o zarodniki służące do założenia nowych kultur pochodzą z zarodni po-

wstałych na podłożu drożdżowym, więc są „zaprawione“ przez substancje drożdżowe (biotyczne) i 2^o dodanie do kultur założonych z takich „zaprawionych“ zarodników jeszcze po porcji drożdży, potęguje rozwój śluzowca.

V - a s e r i a k u l t u r

W tej serii kultur uwzględniłem ten sam gatunek — *Physarum polycephalum*. Zarodniki do założenia kultur pochodziły z kultury macierzystej, założonej jeszcze w roku 1947 (9.V.) na agarze czystym na wodzie. Do kultury tej dodawano w swoim czasie trzykrotnie czystych drożdży, co doprowadziło do utworzenia się owocników. Z tych właśnie czterech i pół-letnich owocników czerpałem potrzebny do wysiewu materiał. Jako podłoża do nowej tej serii kultur użyłem agaru czystego na wodzie destylowanej i agaru na roztworze Knopa bez glukozy. We wszystkich kulturach, w miesiąc po zasianiu zarodników, pojawiły się drobne i anemiczne plazmodia; były one wyraźnie silniejsze na pożywce z Knopem niż na wodzie destylowanej. Do owocowania, w ciągu następnego miesiąca (poczynając od momentu zaszczepienia zarodników) — w żadnej z tych kultur jednak nie doszło. Do części takich anemicznych i wygłodzonych kultur (20) wprowadziłem po porcji drożdży — co spowodowało ożywienie się drobnych plazmodiów i połączenie się ich w duże, pojedyncze plazmodia, łatwo dostrzegalne gołym okiem. W dwa tygodnie po dodaniu drożdży plazmodia we wszystkich kulturach wyowocowały, przy czym w kulturach na płynie Knopa utworzyło się dwa razy więcej owocników niż w kulturach na agarze na wodzie destylowanej. Knop, jak widać, pozytywnie działa na rozwój śluzowca. Poza tym charakter podłoża wpływa wyraźnie na strukturę wewnętrzną zarodni, a w szczególności na wielkość i kształt zarodników.

Na agarze z wodą destylowaną wszystkie zarodniki są zupełnie kuliste i jednakowej wielkości; przeciętnie ich średnica wynosi od 8 do 12 mikronów. Zarodniki otoczone są grubą błoną i cała powierzchnia pokryta jest delikatnymi igiełkami. (Rys. 2).

Na agarze z płynem Knopa zarodniki są różnej wielkości, mają formę poligonalną i zaopatrzone są w bardzo cienkie błony; średnica ich wynosi od 6 do 18 mikronów. (Rys. 3).

VI - a s e r i a k u l t u r

Do założenia tej serii kultur użyłem zarodników pochodzących z zarodni *Physarum polycephalum*, powstałych w roku 1947 na agarze z brzoźką słodową z dodaniem drożdży.

Nowe kultury zostały zaszczepione na agarze z bulionem z płatków owsianych. Na tym podłożu po 6-u tygodniach utworzyły się we wszyst-

kich kulturach silne plazmodia obok silnie rozwiniętych drożdży i bakterii. Komórki drożdżowe i bakterie zostały przeniesione wraz z zarodnikami przy zakładaniu kultur. Widać z tego, że tak zarodniki śluzowca jak komórki drożdżowe i bakteryjne zachowały jeszcze po pięciu latach

Ryc. 2. Zarodniki śluzowca *Physarum polycephalum* z kultury na agarze z wodą destylowaną i z drożdżami. Zarodniki mierzą od 8 do 12 μ .

Spores du myxomycète Physarum polycephalum provenant de la culture sur gélose à l'eau distillée et additionnée de levure. Les spores mesurent de 8 à 12 μ .

swą pełną żywotność. Przy tym zasługuje tu na uwagę fakt, że takie pięcioletnie zarodniki potrzebują co najmniej miesiąca czasu dla swego wykiełkowania, wtedy kiedy świeże zarodniki tego samego gatunku śluzowca kiełkują już po kilku lub kilkunastu godzinach.

Ryc. 3. Zarodniki śluzowca *Physarum polycephalum* z kultury na agarze z roztworem Knopa i z drożdżami. Zarodniki mierzą od 6 do 18 μ .

Spores du myxomycète Physarum polycephalum provenant de la culture sur gélose à la solution de Knop, additionnée de levure. Les spores mesurent de 6 à 18 μ .

Pomimo pojawienia się, we wszystkich kulturach silnie rozbudowanych plazmodiów i obecności obfitej pożywki w formie drożdży i bakterii, owocowanie nie nastąpiło w ciągu następnych dwóch miesięcy. Dopiero po dodaniu po porcji drożdży świeżych, plazmodia wszystkich kultur wyowocowały.

Jak wynika z tego doświadczenia chodzi tu nie o samo pożywienie, którego plazmodia miały pod dostatkiem, a o jakiś czynnik stymulujący, który utraciły drożdże z roku 1947-go, a który został wprowadzony przez zaszczepienie świeżych drożdży.

Powstałe zarodnie i zarodniki w tych warunkach posiadają zupełnie normalną budowę.

VII - s e r i a k u l t u r

Do założenia tej serii kultur użyłem zarodników *Physarum polycephalum* ze świeżo powstałych zarodni na agarze z brzeczką słodową. Zarodniki zostały zaszczepione na agarze z pożywką Knopa z 10% roztworem glukozy i na agarze z pożywką Knopa bez glukozy.

Na podłożu z Knopem z glukozą pojawiły się po 10-u dniach we wszystkich kulturach silne plazmodia, które po dalszych 3-ch tygodniach obficie wyowocowały. Utworzyły się normalne zarodnie z zarodnikami normalnej wielkości i formy.

Na podłożu z Knopem bez glukozy pojawiły się liczne drobnutki i anemiczne plazmodia, również po 10-u dniach od daty zaszczepienia. Po dalszych trzech tygodniach stan plazmodiów nie zmienił się absolutnie (wtedy, kiedy w tym samym czasie plazmodia na Knopie z glukozą wyowocowały). W żadnej kulturze nie doszło do utworzenia się pojedynczych silnych plazmodiów. Do części takich kultur dodałem po porcji drożdży. Drobne plazmodia zaczęły pęłzać ku złożu drożdżowemu i atakować je z widoczną żarłocznością. Po tygodniu utworzyły się pojedyncze silne plazmodia, wgryzające się w złoża drożdżowe i w podłoże agarowe. Tak powstałe plazmodia, po dalszych dwóch tygodniach nie wyowocowały — były więc niedokarmione. Dopiero dodanie do każdej kultury po nowej porcji drożdży doprowadziło, po dalszych 10-u dniach do owocowania. W kulturach, które nie otrzymały drożdży, plazmodia zachowały pierwotny swój stan anemiczny i w końcu zamarły wraz z wyschnięciem pożywki.

W tej serii kultur uwydatnia się wyraźnie pozytywny wpływ glukozy na rozwój śluzowca oraz potwierdza się pozytywne działanie drożdży na rozwój tego samego śluzowca.

Równolegle do opisywanych wyżej kultur (makrokultur) zakładałem z zarodników tych samych trzech śluzowców mikrokultury na szkiełkach przedmiotowych według własnej metody, stosowanej z powodzeniem od dłuższego czasu w badaniach cytologicznych nad śluzowcami. Do mikrokultur tych użyłem, jako pożywki, rozcieńczonej brzeczki słodowej (10%).

Jednocześnie z zarodnikami śluzowców wprowadzałem do mikrokultur drożdże, mieszając dokładnie, w kropli odżywczego płynu igłą

platynową, obie kategorie komórek. Okazało się, że w tych warunkach zarodniki kiełkują daleko trudniej i wolniej niż w mikrokulturach kontrolnych, nie zawierających drożdży.

Drożdże zawierają prawdopodobnie jakiś czynnik hamujący sam proces kiełkowania zarodników, ale nie działający na wzrost i owocowanie plazmodiów. Wyjątek stanowiłoby *Didymium difforme*, którego cała ontogeneza odbywa się słabo w obecności drożdży.

Streszczenie wyników

1^o Badania prowadzone były na trzech gatunkach śluzowców: *Didymium nigripes* Fr., *Didymium difforme* D u b y i *Physarum polycephalum* S c h w.

Jako drożdży używano czystych drożdży piekarnianych — *Saccharomyces cerevisiae*.

2^o Śluzowce hodowano w probówkach o wymiarze 20 × 2 cm i w naczyniach płaskich Kolle, tzw. sojkach, na agarze czystym, na wodzie dystylowanej; na agarze z brzeczką słodową; na agarze z roztworem Knopa oraz na agarze z roztworem Knopa plus 10% roztwór glukozy.

3^o Drożdże dodawano do kultur śluzowców w stanie żywym i martwym w ściśle odmierzonej ilości, w postaci tzw. porcji; porcją w niniejszych doświadczeniach stanowi ilość drożdży, która daje się zaczerpnąć uszkiem igły platynowej o średnicy około 3 mm; ilość ta waży około 5 mg.

4^o Wiadomym jest, że śluzowce współżyją w środowisku naturalnym z bakteriami (symbioza). Ażeby badania nad wpływem drożdży wypadły jak najdokładniej — należało najpierw uwolnić śluzowce od bakterii. Ponieważ oddzielenie bakterii od śluzowca jest niemożliwe, ograniczono się jedynie do ich osłabienia przez prowadzenie hodowli tego ostatniego na pożywce powtórzonej lub na agarze płukanym na wodzie dystylowanej.

5^o Śluzowiec *Didymium nigripes*, hodowany na agarze czystym z wodą dystylowaną, tworzy jedynie drobne, anemiczne plazmodia, które nigdy nie owocują. Dodanie do takiej anemicznej kultury porcji drożdży ożywia ją: drobne plazmodia skupiają się dokoła złoza drożdżowego, intensywnie pożerają komórki drożdżowe i po kilku dniach łączą się w jedno silnie zbudowane plazmodium, dostrzegalne gołym okiem. Plazmodium takie, po spożyciu złoza drożdżowego (wraz z agarem), po kilku dalszych dniach owocuje. W wielu wypadkach owocowanie nie następuje, dopiero dodanie drugiej, a niekiedy trzeciej porcji drożdży prowadzi do owocowania. Owocniki powstałe w tych warunkach są zupełnie normalne.

6^o Śluzowiec *Didymium difforme* zachowuje się w tych samych warunkach zupełnie odmiennie. Drobne, anemiczne plazmodia, powstałe na agarze z wodą dystylowaną, słabo reagują na obecność wprowadzonych do kultury drożdży, nie ożywiają się i w słabym tylko stopniu pożerają komórki drożdżowe. Rzadko przeto dochodzi do powstania normalnych owocników, względnie cyst koloru kremowego. Widać wyraźnie, że śluzowiec ten nie lubi drożdży.

7^o Śluzowiec *Physarum polycephalum* zachowuje się w stosunku do drożdży podobnie jak *Didymium nigripes* z tą tylko różnicą, że jego plazmodia wydrążają w agarze głębokie kawerny w obecności złóż drożdżowych.

8^o Jeżeli głódówka drobnych, anemicznych plazmodiów trwa niedługo, np. kilka dni, wtedy odżywione drożdżami plazmodia tworzą, z reguły, niewielką ilość owocników (2—5); jeżeli natomiast głódówka trwa dłużej, np. dwa miesiące wtedy odżywione plazmodium tworzy daleko większą ilość owocników (10—15), przy jednakowej ilości (porcji) podanych drożdży.

9^o Zarodniki *Physarum polycephalum*, pochodzące ze starych, pięć lat liczących kultur, kiełkują o cały prawie miesiąc później od zarodników tego samego gatunku śluzowca ze świeżych kultur. W późniejszych jednak stadiach plazmodia, powstałe z takich starych zarodników, zachowują się w identyczny sposób jak plazmodia powstałe ze świeżych zarodników.

10^o Kultury założone z pięcioletnich zarodników śluzowca *Physarum polycephalum*, powstałych w zarodniach na podłożu z drożdżami, dają na agarze z bulionem z płatków owsianych obfite plazmodia oraz silny rozwój bakterii i drożdży. Pomimo silnego rozwoju tych ostatnich, plazmodia takie nie owocowały. Dopiero dodanie świeżych drożdży doprowadziło do procesu owocowania. Nie chodzi więc w tym wypadku o drożdże jako czynnik odżywczy, a o drożdże jako czynnik pobudzający do owocowania. Czynnik ten w starzejących się drożdżach ulega — jak wynika z doświadczenia — zanikowi.

11^o Śluzowiec *Physarum polycephalum*, hodowany na agarze z roztworem Knopa daje po dodaniu żywych drożdży, dwa razy więcej zarodni niż hodowany na agarze z wodą dystylowaną po dodaniu takich samych drożdży.

12^o Śluzowiec *Physarum polycephalum* hodowany na agarze z Knopem, zawierającym 10% roztwór glukozy daje pozytywne wyniki: tworzą się na tym podłożu silne plazmodia, które po kilku już dniach, i bez dodania drożdży owocują, tworząc normalne zarodnie. Natomiast na pożywce (agar) z czystym roztworem Knopa (bez glukozy) tworzą się drobniutkie, anemiczne plazmodia, które nigdy nie owocują; dopiero

dodanie do takich kultur świeżych drożdży doprowadza do silnego wzrostu plazmodiów i ich owocowania.

13^o Zarodniki śluzowców, pomieszane z komórkami drożdżowymi (*S. cerevisiae*), kiełkują trudniej niż te same zarodniki w kulturach bez drożdży. Można się o tym przekonać zakładając dla jednego i drugiego wypadku mikrokultury.

RÉSUMÉ

Dans mes recherches sur l'influence de la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) sur le développement des myxomycètes, j'ai opéré sur trois espèces de ces organismes: *Didymium nigripes* F r., *Didymium difforme* D u b y et *Physarum polycephalum* S c h w., gardés, comme matériel de départ, en cultures pures mixtes.

Pour pouvoir étudier l'influence de la levure sur l'ontogénèse des myxomycètes il faut avant tout obtenir leurs souches à l'état de pureté absolue. Les tentatives de la purification complète de myxomycètes faites par plusieurs biologistes, tels que A. L. C o h e n (1, 2), M. L o c q u i n (3), J. C. S o b e l s (8) et moi-même ont complètement échoué. Un passage tiré de l'excellent travail de J. C. Sobels, paru il y a 3 ans comme thèse de doctorat (8) en constitut la preuve. Voici le texte du passage intitulé: „Méthodes complémentaires de purification des plasmodes“ a la page 84: „Pour éviter les nombreux repiquages sur gélosel avée inhérants à la méthode de purification habituellement employée et pour détruire les bactéries difficiles à éliminer, nous avons mis au point une technique nouvelle. Nous avons tout d'abord essayé sans succès trois méthodes dont la première consistait simplement à traiter la culture de plasmode par milieu de Raulin (69), en la recouvrant de cette solution. Le plasmode arrête de se développer, mais les bactéries restent vivantes. La seconde méthode, mettait en oeuvre le sulfamide 1162F, aux concentrations de $1 \cdot 10^{-3}$ et $1 \cdot 10^{-4}$. Ni plasmode ni les bactéries ne souffrent de la présence de ce produit. Un traitement de la culture de plasmode pendant 20 minutes avec de l'eau oxygénée à 6 ou 12 volumes¹, donne seulement une contraction du plasmode, qui reste vivant, les bactéries ne sont pas tuées. Si on fait agir $1' \text{ H}_2\text{O}_2$ pendant un temps plus long que 20 minutes, seul le plasmode meurt. Nous avons enfin utilisé avec succès la méthode qui consiste à faire agir le mélange pénicilline (10 U. O.) — streptomycine (10 U. G.) dilué dans 10 cc d'eau bidistillée stérile. Après un contact de 24 heures, ce liquide est enlevé, et le plasmode est repiqué le jour suivant (S o b e l s (85)). Malgré l'efficacité

¹ Un volume d'eau oxygéné à 12 volumes par exemple, peut dégager 12 volumes d'oxygène.

de cette dernière méthode, il ne nous a pas encore été possible de conserver les quatre derniers plasmodes en cultures pur¹.

On voit d'après le passage cité que différentes méthodes tendant à la purification complète des plasmodes ont fait fiasco. Tout ce qu'on peut obtenir c'est uniquement l'affaiblissement extrême de bactéries et non pas leur complète suppression; tuer la bactérie c'est tuer en même temps le plasmode. J'opère précisément dans mes recherches avec des plasmodes affaiblis, à la suite de l'affaiblissement de bactéries. J'arrive à ce fait par la double méthode: a) par la cultivation de myxomycètes sur le substratum répété¹, b) par leur cultivation sur le substratum maigre (la gélose bien lavée et fondue dans l'eau distillée).

Je montais pour chaque espèce de myxomycète plusieurs séries de cultures plusieurs fois répétées.

Les cultures furent gardées à la température de la chambre dont la moyenne était de 18°C.

La levure, provenant de cultures pures, fut administrée par „portion“. Une „portion“ dans mes expériences correspond, juste à la quantité que l'on racle avec une anse de platine, mesurant 3 millimètres de diamètre, et pesant à peu près 5 mg.

Dans la pratique courante je montais mes cultures sur le substratum maigre (gélose à la l'eau distillée), comme plus facile à obtenir.

A. Les spores de *Didymium nigripes*, ensemencées sur la gélose à l'eau distillée (substratum maigre) germent normalement et au bout de 10 jours environ apparaissent de tout petits plasmode anémiques, à peine visibles à l'oeil nu. A une partie de ce cultures on introduit, a chacune, une portion de levure. Au bout de quelques jours les petits plasmodes, éparpillés jusqu'à présent sur toute la surface du substratum, se réunissent autour du dépôts de la levure. Très vite à la place de ces petits plasmodes apparaissent de grands plasmodes de couleur crème, visible facilement à l'oeil nu. On constate en même temps que la diminution sensible du dépôt de la levure est synchronisée avec la disparition de petits plasmodes et la formation d'un grand et unique plasmode. Ce dernier creuse autour du dépôt même de la levure une profonde caverne, allant jusqu'à la paroi de la culture. La collaboration enzymatique de la levure et du plasmode est ici bien démonstrative.

Un plasmode suffisamment nourri ne tarde pas, au bout de quelques jours, de fructifier. J'ai constaté mainte fois que dans certaines

¹ Le substratum répété c'est le substratum sur lequel a eu déjà lieu le développement complet d'un myxomycète. Un substratum pareil (gélose au moût de bière) est refondu avec un peu d'eau distillée stérilisée; il contient des toxines bactériennes et les produits de désassimilation des plasmodes qui affaiblissent le développement de bactéries et n'empêchent pas le développement de plasmodes.

cultures, additionnées d'une seule portion de levure, les plasmodes, bien épanouis, ne fructifient pas. Il suffit d'ajouter à une pareille culture une nouvelle portion de levure pour que le plasmode ne tarde pas à fructifier. Il faut donc admettre que le rythme de mûrissement du plasmode va de paire avec le rythme alimentaire: il suffit parfois d'ajouter une minime quantité de levure (p. ex. un quart d'une portion) pour que la maturation du plasmode soit achevée et que celui-ci aboutisse à la fructification. Dans la deuxième partie de cultures qui n'ont pas reçu de la levure les plasmodes gardent, pendant deux mois suivants, le même aspect c-à-d. ils restent tout petits, anémiques et ne fructifient jamais. Finalement, à la suite de ce jeûne prolongé (et à la suite de l'évaporation de l'eau d'autre part), ces plasmodes meurent. Mais il suffit d'introduire, à de telles cultures une portion de levure, pour que les plasmodes anémiques reprennent leur allure énergique, forment un grand plasmode qui fructifie au bout de quelques jours. Les fructifications dans les deux séries de cultures sont analogues et normales.

B. *Didymium difforme* se comporte, au cours de mêmes expériences, d'une façon tout à fait différente que les autres myxomycètes. Les petits plasmodes anémiques de ce myxomycète réagissent faiblement à la présence de la levure introduite, en mangeant que très peu, finalement dégénèrent, sans former un grand et unique plasmode. Ce seulement dans un petit nombre de cultures qu'il se forme, par-ci par-là, de petites fructifications rondes ou des sclérotés de couleur crème.

C. *Physarum polycephalum* se comporte presque de la même manière que *Didymium nigripes*, avec néanmoins cette différence, que ses plasmodes, anémiques ou normaux, creusent dans le substratum des empreintes plus profondes que ceux de *Didymium nigripes*.

Une partie de cultures a reçu chacune, quelques jours après l'ensemencement des spores et apparition de petits plasmodes anémiques, une portion de levure (5 mg); ces cultures ont donné des fructifications normales, mais peu nombreuses (2—4 par culture).

La deuxième partie de cultures a reçu de la levure deux mois après l'ensemencement des spores. Après ce jeûne prolongé les résultats se sont montrés révélateurs: toutes les cultures dans lesquelles les plasmodes affamés se sont montrés très voraces, ont fourni un nombre de fructifications plus grand (10—15) que dans la première série de cultures. Le jeûne prolongé contribua donc à l'augmentation du nombre de fructifications.

D. Les spores de *Physarum polycephalum*, provenant de vieilles cultures (comptant 5 ans et demi) germent un mois environ plus tard que les spores fraîches, du même myxomycète. Les plasmodes, provenant de

pareilles spores sont néanmoins normaux et produisent des fructifications normales.

E. Les plasmodes de *Physarum polycephalum*, issus des spores âgées de 5 ans et demi, formées dans les sporanges sur le substratum contenant de la levure vivante, prennent une bonne allure sur la gélose aux flocons d'avoine; à côté de plasmodes il y a un bon développement de bactéries et de la levure, ces dernières étant inoculées en même temps que les spores. Malgré un bon développement des plasmodes ceux-ci ne fructifient pas; pour les obliger à fructifier il faut ajouter aux cultures de la levure fraîche. On voit d'après ce fait que les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* âgée de 5 ans et demi ont perdu leurs propriétés biotiques et stimulant la fructification; pour que celle-ci eu lieu il faut ajouter de la levure fraîche.

F. *Physarum polycephalum*, cultivé sur la gélose au Knop, donne, en présence de la levure vivante une quantité beaucoup plus grande de fructifications que sur la gélose à l'eau distillée (et en présence de la même quantité de la levure).

G. *Physarum polycephalum* cultivé sur la gélose au Knop additionné de glucose à 10%, produit de forts plasmodes qui fructifient normalement. Cultivé sur la gélose au Knop sans glucose, ce même organisme forme de petits plasmodes anémiques qui ne fructifient jamais; mais quand on ajout à ces derniers de la levure fraîche, les petits plasmodes grandissent et en se fusionnant forment un seul plasmode bien développé qui ne tarde pas à fructifier.

H. Les spores des myxomycètes, mélangées avec les cellules de *S. cerevisiae* vivantes, germent beaucoup plus difficilement que les spores montées en cultures sans levures. On peut s'en convaincre en faisant, pour les deux cas des microcultures.

A p p e n d i c e

La liste de publications concernant la cytologie des myxomycètes fut allongée ces dernières années par deux excellents travaux parus dans les Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg, Série chimique, Volume 20, N° 5—6, Copenhague 1952: 1° H. Holter and B. M. Pollock: Distribution of some enzymes in the Cytoplasm of the Myxomycete, *Physarum polycephalum*, 2° N. Andresen and B. M. Pollock: A Comparison between the cytoplasmic components in the Myxomycete, *Physarum polycephalum*, and in the Amoeba *Chaos Chaos*.

Dans ce second travail les auteurs, en parlant de vacuoles (p. 254), énumèrent, chez *Physarum polycephalum*, quatre différents types de vacuoles: Vacuoles contenant des masses d'aliments, vacuoles contenant

des débris non digérés, vacuoles contractiles et vacuoles vides mais non contractiles.

Un peu plus loin, dans le même passage (4, 32), à la page 255, ils écrivent que voici: „No attempt was made to distinguish between the different types of empty vacuoles by vital staining, since M a n g e n o t (17) has shown the toxicity of vital dyes for the myxomycetes“.

Il faut regretter que les auteurs, en abordant cette question, n'ont pas pris connaissance de mon article intitulé: „Sur la coloration vitale de *Didymium nigripes* (Fr.), imprimé en 1929 dans les „Acta Societatis Botanicorum Poloniae, Vol. VI, Nr. 3. Dans cet article je donne (à la page 207) l'énumération des vacuoles dans les cellules des myxomycètes, que voici: a) *Vacuoles élémentaires* qui se colorent par le rouge neutre en rose pâle. J'ai pu discerner dans leur intérieur des corpuscules colorables en rouge intense, comme chez les champignons (corpuscules méta-chromatiques). Ces vacuoles réduisent légèrement l'acide osmique; b) *Vacuoles pulsatiles*. Ces vacuoles ne prennent pas de colorants vitaux; c) *Vacuoles digestives*. Cette catégorie de vacuoles se colore le mieux; leur fond prend une teinte rose, tandis que les particules en voie de digestion (les débris nutritifs) se colorent en rouge intense.

Les premières vacuoles (élémentaires) correspondraient aux „Empty, non-contractile vacuoles“ des auteurs précités.

Les secondes correspondraient aux „Contractile vacuoles“.

Les troisièmes (digestives) correspondraient aux „Food vacuoles“ ainsi qu'aux „Vacuoles with debris“.

D'après moi la distinction entre les vacuoles digestives (Food vacuoles) et vacuoles contenant des débris d'aliments (Vacuoles with debris) est superflue: et les premières et les secondes sont les mêmes vacuoles digestives aux différents stade de leur fonctionnement.

Je considère que ma conception sur différents types de vacuoles est d'accord avec celle des auteurs mentionnés ci-dessus.

Si les vacuoles contractiles ne se colorent pas ce n'est pas par ce que le colorant vital (le rouge neutre) est toxique mais grâce à d'autres causes qu'il est difficile à dévoiler.

Les colorants vitaux, même leur mélange (le rouge neutre et le bleu de méthylène), additionnés aux cultures de *Didymium nigripes*, à la concentration 1 : 5000, n'ont aucune influence nuisible sur la marche normale du développement de ce myxomycète: depuis la germination des spores jusqu'à la formation des plasmodes et la fructification tout se passe comme dans les cultures sans colorants vitaux.

L'application du mélange des solutions du rouge neutre et du bleu de méthylène s'est montrée révélatrice. Grâce à cette méthode de la double coloration vitale j'ai réussi à établir, pour la première foi, un fait

capitale d'ordre morphogénétique dans l'ontogénèse des myxomycètes: la tête des sporanges provient de la masse protoplasmique interne du plasmode en fructification (coloration en rouge avec le rouge neutre) et le pied provient de la masse externe du même plasmode en fructification (coloration bleue foncée par le bleu de méthylène).

Cette méthode est très instructive et elle nous prouve que les colorants vitaux, appliqués à la concentration convenable, ne nuisent en aucun degré aux différents éléments ontogénétiques d'un myxomycète.

PIŚMIENNICTWO — LITTÉRATURE

1. A. L. C o h e n, 1939. Nutrition of the Myxomycetes. I. Pure culture and two-membered culture of Myxomycete plasmodia. Bot. Bazette, Vol. 101. No. 2.
2. A. L. C o h e n, 1941. Nutrition of the Myxomycetes. II. Relations between plasmodia, bacteria and substrate in two-membered culture. Bot. Bazette, Vol. 103, No. 2.
3. M. L o c q u i n, 1948. Culture des Myxomycètes et production de substances antibiotiques par ces organismes. C. R. Ac. Sc., Paris, T. 227, p. 149.
4. L. M a n g e n o t, 1933. Sur les plasmodes de *Fuligo septica* G m e l., Comptes rendus des séances de la Société de Biologie, tome CXII, p. 1160.
5. F. X. S k u p i e ń s k i, 1920. Recherches sur le cycle évolutif de certains Myxomycètes, Thèse, Paris.
6. F. X. S k u p i e ń s k i, 1928. Badania bio-cytologiczne nad *Didymium difforme*. Część pierwsza. (Etude bio-cytologique sur *Didymium difforme*. Première partie). Acta Soc. Bot. Poloniae, Vol. V, Nr 3.
7. F. X. S k u p i e ń s k i, 1952. Influence de la levure (*Saccharomyces cerevisiae*) sur le développement des Myxomycètes. Bulletin de la Société des Sciences et des Lettres de Łódź, Classe III De Sciences Mathématiques et Naturelles, Vol. III, 8.
8. J. C. S o b e l s, 1950. Nutrition de quelques Myxomycètes en cultures pures et associées et leurs propriétés antibiotiques. Thèse de doctorat à l'Université d'Utrecht.