

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

STUDIORUM PROGRESSUS

Über die Verwendung von Myzelsuspensionen als Impfmaterial in Wachstumsversuchen mit Pilzen

Von T. WIKÉN, H. G. KELLER, C. L. SCHELLING und A. STÖCKLI¹

In den Untersuchungen über die physiologischen Eigenschaften der mykorrhizabilgenden und streuzersetzenen Pilze sowie der Pilze, welche in der Rhizosphäre oder als Endoparasiten in den Wurzeln der Waldbäume leben, erfolgte die Impfung der flüssigen Substrate aus Kulturen der betreffenden Pilze auf festen Agarnährböden in Kulturröhrchen oder Petrischalen. Dabei wurden die Impfstücke mit einer Impfnadel, einem gewöhnlichen Skalpell oder einem speziellen Instrument aus der mit Myzel bewachsenen Nähragarschicht ausgeschnitten und mit großer Vorsicht in die Kulturkolben gebracht, so daß sie schwimmend auf der Oberfläche der Nährösung verblieben, wodurch sofort Lufthypfen sich entwickeln konnten. In einigen Fällen wurden ganz besondere Vorsichtsmaßnahmen getroffen, um das Schwimmen des Impfmyzels sicherzustellen, zum Beispiel Verwendung eines Glasstabes als Träger des Impfmaterials, bis sich so viel Luftmyzel gebildet hatte, daß sich das Impfstück ohne Schwierigkeit auf der Substratoberfläche schwimmend halten konnte, oder Aufbewahrung der ausgeschnittenen Impfstücke auf der Oberfläche eines festen Agarnährbodens in einer Petrischale, bis sich eine genügende Menge Lufthypfen entwickelt hatte. Diese Impfmethode wurde besonders bei Pilzen verwendet, welche unter Laboratoriumsbedingungen keine Sporen, Konidien oder Oidien bilden, sowie bei Pilzen, welche als submerse Myzellen nur äußerst langsam zu wachsen scheinen. In einigen Fällen wurde das verhältnismäßig schlechte Wachstum in den submersen Kulturen auf schlechten Luftzutritt zurückgeführt (MELIN², MELIN und Mitarbeiter³, FRIES⁴, LIHNELL⁵, MODESS⁶, LINDEBERG⁷, LINDEBERG und Mitarbeiter⁸, BJÖRCKMAN⁹, PEHRSON¹⁰, WILKINS¹¹ usw.)

¹ Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie und Gärungsbiologie, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, 15. November 1950.

² E. MELIN, Abderhald. Handb. biol. Arbeitsmeth. XI 4, 1015 (1936); Symb. Bot. Upsal. VIII 3 (1946).

³ E. MELIN und B. NYMAN, Arch. Mikrobiol. 12, 254 (1941). — E. MELIN und G. MIDÉN, Svensk Bot. Tidskr. 35, 333 (1941). — E. MELIN und B. NORKRANS, Physiologia Plantarum I, 176 (1948). — E. MELIN, T. WIKÉN und K. OEBLOM, Nature 159, 840 (1947). — E. MELIN und P. MIKOLA, Physiologia Plantarum I, 109 (1948). — E. MELIN und B. NORKRANS, Svensk Bot. Tidskr. 36, 271 (1942). — E. MELIN und G. LINDEBERG, Bot. Not. (Lund), 241 (1939). — E. MELIN und B. NYMAN, Arch. Mikrobiol. 11, 318 (1940).

⁴ N. FRIES, Symb. Bot. Upsal. III 2 (1938); Svensk Bot. Tidskr. 36, 451 (1942); ib. 40, 127 (1946); ib. 44, 379 (1950); Physiologia Plantarum 3, 185 (1950).

⁵ D. LIHNELL, Symb. Bot. Upsal. III 3 (1939); ib. V 2 (1942).

⁶ O. MODESS, Symb. Bot. Upsal. V 1 (1941).

⁷ G. LINDEBERG, Symb. Bot. Upsal. VIII 2 (1944); Bot. Not. (Lund), 89 (1946); Ark. Bot. (Stockholm) 33 A:10 (1946); Svensk Bot. Tidskr. 40, 63 (1946); ib. 43, 438 (1949); Physiologia Plantarum I, 196 (1948).

⁸ G. LINDEBERG und M. KORJUS, Physiologia Plantarum 2, 103 (1949). — G. LINDEBERG und K. MOLIN, ib. 2, 138 (1949).

⁹ E. BJÖRCKMAN, Physiologia Plantarum 2, 1 (1949).

¹⁰ S. PEHRSON, Physiologia Plantarum 1, 38 (1948).

¹¹ W. H. WILKINS, Brit. J. Exp. Path. 27, 140 (1946); Ann. Appl. Biol. 36, 257 (1949).

Die erwähnte Impfmethode hat nun neben gewissen Vorteilen auch Nachteile, und zwar unter anderem die folgenden:

1. Mit dem Impfstück wird nicht nur Pilzmyzel, sondern auch immer eine gewisse Menge des Impfkulturnähragars in die zu impfende Nährösung eingeschleppt.

2. Durch das Einschleppen von Impfkultursubstrat wird die peinlich genau definierte Zusammensetzung der zu impfenden Nährösung aufs Spiel gesetzt. Es ist bekannt, daß Agar unter anderem beträchtliche Mengen Wuchsstoffe und Spurenstoffe enthält. Wenn der Nährboden der Impfkulturen, wie es oft der Fall ist, aus Malzagar besteht, kommen dazu die organischen und anorganischen Wirkstoffe des Malzextraktes. Ferner sind im Impfstück auch extrazelluläre Stoffwechselprodukte des Pilzes vorhanden. In Untersuchungen über die Bedeutung verschiedener Wuchsstoffe und Spurenstoffe für das Wachstum der Pilze in genau definierten, synthetischen Nährösungen kann somit unter Umständen die Eindeutigkeit der Ergebnisse wesentlich gefährdet sein.

3. Bei langsam wachsenden Pilzen sind die zur Herstellung gleichmäßiger Impfstücke notwendigen Impfkulturen auf festen Nährböden in Petrischalen einer verhältnismäßig großen Infektionsgefahr ausgesetzt. Diese Gefahr wird noch größer, wenn die ausgeschnittenen Impfstücke vor dem Impfen eine Zeitlang auf neuen Agarplatten aufbewahrt werden müssen.

Die erwähnten Schwierigkeiten lassen sich nun bei vielen Pilzen ausschalten, und zwar durch Verwendung einer *Myzelsuspension als Impfmaterial an Stelle der Impfstücke*. Diese Suspension wird in folgender Weise hergestellt:

Eine Glasflasche mit eingeschliffenem Stopfen wird zur Hälfte ihres Volumens mit Glaskugeln von etwa 6 mm Durchmesser beschickt. Dann wird so viel destilliertes Wasser zugesetzt, daß die Kugeln gerade bedeckt sind. Die Flasche wird so mit einem Pfropfen aus chemisch reiner Baumwolle verschlossen und im Autoklaven sterilisiert. Der dazugehörige Glasstopfen wird separat sterilisiert. Aus einer Kultur aus flüssigem (synthetischem) Substrat wird ein angemessenes Myzestück geschnitten und in die Flasche steril übertragen. Die Flasche wird sodann mit dem sterilen Glasstopfen verschlossen und in einer Schüttelmaschine kräftig geschüttelt. Die Dauer des Schüttelns ist von der Natur und Menge des Myzels sowie vom gewünschten Verteilungsgrad der Myzelsuspension abhängig. Die so erhaltene Suspension enthält Myzelteilchen verschiedener Größe. Nachdem die größeren Teilchen sich abgesetzt haben, wird die überstehende Suspension, welche Myzel in sehr feiner Verteilung enthält, in einen sterilen Kolben pipettiert. Sie kann so nach Belieben mit steriles destilliertem Wasser oder einer sterilen physiologischen Salzlösung verdünnt werden.

Die erwähnte Methode läßt sich selbstverständlich in verschiedenen Richtungen modifizieren. So haben wir in mehreren Fällen die zur Impfung bestimmten Pilzmyzellen direkt in der Flasche gezüchtet, welche beim Schütteln zum Zerteilen und Aufschwemmen des Myzels verwendet wurde. Dabei wurde die Nährösung, welche als Substrat für das Impfmyzel gedient hatte, abgegossen und die Myzeldecke zur Entfernung des Restes

Tabelle I

Zeit - Tage	Impfung mit Agarstückmyzel				Zeit - Tage	Impfung mit Myzelsuspension				
	Myzeltrockengewicht mg		ρ_H			Myzeltrockengewicht mg		ρ_H		
	M	δ	M	δ		M	δ	M	δ	
<i>Cenococcum graniforme</i> ¹										
12	3,8	1,9	4,99	0,09	20	6,1	0,4	4,85	0,05	
19	13,7	5,5	4,41	0,21	24	18,6	2,3	4,33	0,05	
24	52,3	9,1	3,76	0,13	30	50,7	3,5	3,63	0,10	
30	111,8	14,7	3,02	0,11	35	124,0	7,7	2,75	0,01	
36	179,0	2,3	2,93	0,02	39	195,7	—	2,78	—	
<i>Mycelium Radicis atrovirens</i> ²										
10	6,5	4,2	4,68	0,20	13	14,8	2,0	4,43	0,04	
18	79,2	3,0	3,88	0,66	15	34,4	1,5	3,94	0,06	
26	117,8	38,6	5,97	1,63	19	74,9	4,6	3,27	0,03	
34	83,0	0,3	7,51	0,01	21	91,6	0,5	3,70	0,48	
42	74,7	0,1	7,56	0,03	26	87,6	0,7	7,03	0,04	
					29	85,2	0,4	7,31	0,00	

¹ *Cenococcum graniforme*: Anfangs- ρ_H = 5,28. ² *Mycelium Radicis atrovirens*: Anfangs- ρ_H = 5,14. Anzahl Parallelen = 3.

des alten Substrates zwei- bis dreimal mit sterilem destilliertem Wasser geschüttelt, bevor die Behandlung mit Glaskugeln in der Schüttelmaschine stattfand.

Bei gewissen Pilzen gestattet die Beschaffenheit des auf synthetischer Nährösung gezüchteten Myzels, daß ein genügendes Zerteilen und Aufschwemmen durch kräftiges Schütteln ohne Verwendung von Glaskugeln zustande gebracht werden kann.

Wenn nötig können die in der Suspension vorhandenen Myzelfragmente beziehungsweise Hyphen durch wiederholtes Aufschwemmen in destilliertem Wasser oder physiologischer Salzlösung und Zentrifugieren unter sterilen Bedingungen gewaschen werden.

Von den Versuchen, bei welchen Impfung mit Myzelsuspensionen zur Anwendung kam, seien hier einige mit *Cenococcum graniforme* (Sow.) FERD. et WINGE, *Mycelium Radicis atrovirens* MELIN, *Paxillus Prunulus* (SCOP. ex FR.), *Tricholoma pessundatum* (FR.), *Tricholoma flavobrunneum* (FR. ex PERS.) und *Boletus*

Grevillei KLOTZSCH (*Boletus elegans* FR.) näher erwähnt. *Cenococcum graniforme* und *Mycelium Radicis atrovirens* wurden auf den von MELIN und MIKOLA¹ bzw. MELIN und NORKRANS² für diese Pilze vorgeschlagenen Substraten mit Diammoniumtartrat als Stickstoffquelle gezüchtet. Für die übrigen Pilze wurde die von MELIN und MIKOLA¹ beschriebene Nährösung insofern modifiziert, daß sie nur 10,0 g Glukose und 0,5 g KH_2PO_4 pro 1000 ml enthielt. Als Kulturgefäße dienten Erlenmeyerkolben aus Jena-Geräteglas 20 von 100 ml Fassungsvermögen, wobei jeder Kulturkolben 20 ml des betreffenden Substrats enthielt. Die Bebrütung erfolgte bei 25°C. Die geernteten Myzellen wurden mit destilliertem Wasser gewaschen und im Trockenschränk bei 100°C getrocknet. In den Tabellen I-III bezeichnet M das arithmetische Mittel der Myzeltrockengewichte bzw. ρ_H -Werte und δ die mittlere Abweichung der Einzelgrößen vom Mittel.

¹ E. MELIN und P. MIKOLA, Physiologia Plantarum 1, 109 (1948).

² E. MELIN und B. NORKRANS, Svensk. Bot. Tidskr. 36, 271 (1942).

Tabelle II

Zeit - Tage	Myzeltrockengewicht mg		ρ_H		Zeit - Tage	Myzeltrockengewicht mg		ρ_H	
	M	δ	M	δ		M	δ	M	δ
<i>Paxillus Prunulus</i>									
10	4,2	1,0	5,04	0,14	7	0,7	0,3	5,38	0,04
12	6,4	1,1	4,67	0,00	13	5,5	1,1	4,84	0,06
17	16,9	7,1	4,36	0,08	19	16,5	0,4	4,32	0,01
22	108,5	2,8	2,68	0,10	23	21,1	3,6	4,19	0,16
28	112,7	3,1	2,72	0,04	30	36,6	1,0	3,83	0,03
34	115,6	0,6	2,73	0,02	35	35,8	3,2	3,75	0,08
<i>Tricholoma pessundatum</i>									
10	0,6	0,1	5,32	0,07	9	9,4	0,3	4,64	0,03
17	4,7	1,0	4,74	0,08	12	32,1	2,0	3,77	0,04
22	9,0	0,5	4,44	0,08	15	46,8	16,2	3,38	0,38
28	12,0	1,2	4,07	0,05	19	62,8	1,0	2,86	0,06
34	16,8	0,7	3,92	0,04	27	50,6	2,1	3,48	0,09
<i>Boletus Grevillei</i>									

Anfangs- ρ_H = 5,85. Anzahl Parallelen = 3.

Tabelle III

Impfmenge pro Kolben (Myzeltrockensubstanz) mg	<i>Cenococcum graniforme</i> ¹				<i>Mycelium Radicis atrovirens</i> ²			
	Myzeltrockengewicht mg		pH		Myzeltrockengewicht mg		pH	
	M	δ	M	δ	M	δ	M	δ
6 × 10 ⁻²	186,8	0,4	2,72	0,02	80,4	0,1	7,33	0,05
6 × 10 ⁻³	193,5	0,4	2,63	0,01	83,9	0,1	6,35	0,29
6 × 10 ⁻⁴	72,4	8,2	3,33	0,28	76,8	6,0	4,97	1,41
6 × 10 ⁻⁵	48,2	—	3,49	—	0,0	—	—	—
6 × 10 ⁻⁶	0,0	—	—	—	0,0	—	—	—

¹ *Cenococcum graniforme*: Anfangs-pH = 5,28, Versuchszeit = 55 Tage.

² *Mycelium Radicis atrovirens*: Anfangs-pH = 5,14, Versuchszeit = 34 Tage. Anzahl Parallelen = 2.

Die Tabellen zeigen, daß eine nach der oben erwähnten Methode hergestellte Myzelsuspension zu Wachstum befähigt ist, und zwar verläuft das Wachstum grundsätzlich in der gleichen Weise wie bei Impfung mit Agarstückmyzel. Aus Tabelle I ist ersichtlich, daß bei *Cenococcum graniforme* und *Mycelium Radicis atrovirens* die Höchstausbeute an Myzeltrockensubstanz, welche in den mit Myzelsuspension geimpften Kulturen erreicht wird, von der gleichen Größenordnung wie diejenige in den mit Agarstückmyzel beimpften Kulturen ist. Ferner sei erwähnt, daß die Versuchsergebnisse darauf hindeuten, daß die bei der Impfung mit *angemessenen* Mengen der betreffenden Hyphensuspensionen auftretende Streuung der Myzeltrockengewichte und der pH-Werte ebenso groß wie oder kleiner als die Streuung ist, welche bei der Verwendung von Agarstückmyzel erhalten wird.

Auch bei den übrigen Pilzen (siehe Tabelle II) werden mit Myzelsuspensionen als Impfmaterial Trocken-substanzmengen erreicht, die von derselben Größenordnung wie die Mengen sind, welche bei der Impfung mit Agarstückmyzel festgestellt wurden (vgl. MELIN und LINDEBERG¹, MELIN und NYMAN² sowie MELIN und NORRKRANS³).

Aus Tabelle III geht hervor, daß bei gewissen Pilzen außerordentlich kleine Mengen aufgeschwemmter Myzel-fragmente und Hyphen ausreichen, um in synthetischen Nährösungen normales Wachstum sicherzustellen. Die Verwendung zu kleiner Impfmengen führt unter Umständen zum Auftreten einer zu großen Streuung der in den Parallelkulturen feststellbaren Myzeltrockengewichte und pH-Werte.

Versuche über die Verwendbarkeit der Myzelsuspensionen als Impfmaterial wurden ferner durchgeführt mit *Boletus granulatus* L. ex FR., *Marasmius foetidus* (Sow. ex FR.) FR., *Marasmius putillus* (FR. ex FR.) FR., *Marasmius scorodonius* (FR.) FR., *Armillaria mellea* (M. VAHL ex FR.), *Collybia butyracea* (BULL. ex FR.), *Pholiota mutabilis* (SCHAEFF. ex FR.), *Polyporus borealis* FR., *Trametes gibbosa* (PERS. ex FR.) FR. usw. Dabei kamen synthetische Nährösungen, Malzextraktlösungen und Streumaterialien, wie Lärchen- und Weißtannennadeln sowie Ahorn-, Birken-, Buchen-, Edelkastanien- und Eichenlaub, zur Verwendung als Substrate. In allen Fällen hat sich die Impfung mit Myzelsuspensionen bewährt. Diese Methode wird jetzt bei den im hiesigen Institut laufenden Untersuchungen über die Physiologie der mykorrhizabildenden und streuzersetzenden Pilze routinemäßig verwendet.

¹ E. MELIN und G. LINDEBERG, Bot Not. (Lund), 241 (1939).

² E. MELIN und B. NYMAN, Arch. Mikrobiol. 11, 318 (1940).

³ E. MELIN und B. NORRKRANS, Svensk Bot. Tidskr. 36, 271 (1942).

Die verwendeten Stämme von *Cenococcum graniforme*, *Mycelium Radicis atrovirens*, *Paxillus Prunulus*, *Boletus Grevillei*, *Tricholoma flavobrunneum* und *Tricholoma pessundatum* verdanken wir Herrn Prof. Dr. E. MELIN, Institut für physiologische Botanik, Uppsala. Die Stämme von *Collybia butyracea* und den *Marasmius*-Arten haben wir vom «Centralbureau voor Schimmelcultures», Baarn, erhalten. Übrige Pilzstämme haben wir selbst durch Gewebekulturen isoliert.

Die Untersuchungen werden aus dem Fonds zur Förderung der Wald- und Holzforschung sowie vom Eidgenössischen Institut für das forstliche Versuchswesen (Direktor, Prof. Dr. H. BURGER) unterstützt.

Summary

In investigations on fungi incapable of producing spores, conidia, or oidia under laboratory conditions the liquid media used for growth experiments are, according to the ordinary technique, inoculated with mycelium bits cut from colonies of the fungi grown on solid agar media in tubes or Petri dishes. The difficulties and disadvantages met with in employing this method are discussed.

A new method is described using mycelial suspensions for inoculation of liquid substrates. The suspensions are prepared by shaking bits of mycelial mats with glass beads, about 6 mm in diameter, and distilled water or "physiological" salt solution under sterile conditions. The large mycelial particles are allowed to settle. The supernatant suspension is pipetted into a sterile flask and diluted to the proper volume. The suspended particles may be washed by sedimenting in a centrifuge, resuspending in distilled water or salt solution, and recentrifuging under sterile conditions.

Of course the method may be modified in different ways.

The new method is now used on a routine scale in this institute in investigations on mycorrhiza-forming and litter-decomposing fungi.

OECOLOGICA

Un Inventaire de la Faune marine de Roscoff

C'est en 1872 que H. DE LACAZE-DUTHIERS fonda, de façon bien modeste, dans un petit port des côtes bretonnes de la Manche, ce qui est devenu aujourd'hui la puissante Station biologique de Roscoff. On peut donc s'étonner qu'en 80 ans, ou presque, ce laboratoire maritime n'ait jamais publié une liste méthodique d'animaux, comparable à celle de Naples, de Plymouth, de l'île de Man et d'autres stations encore. Mais c'est que, pendant très longtemps, le laboratoire de Roscoff, dépendance de la Faculté des Sciences de Paris, n'a eu qu'un personnel