

Die Anwendung statistischer Methoden bei der Entwicklung eines Keimungstests mit Pilzsporen und Blütenstaubkörnern

Von A. LINDER* und F. H. SCHWARZENBACH**

I. Einleitung

Die vorliegende Mitteilung gibt einen Überblick über Erfahrungen, die bei der Entwicklung eines Keimungstests mit Pilzsporen und Blütenstaubkörnern gewonnen wurden. Die Arbeit will im besonderen zeigen, wie die Ausarbeitung eines mikrobiologischen Testverfahrens durch die konsequente Anwendung von modernen statistischen Verfahren für Planung und Versuchsauswertung entscheidend gefördert werden kann.

Die Versuche werden mit *Sporen* der beiden Pilzarten *Helminthosporium sativum* P. K. & B. und *Alternaria tenuis* Neerg. durchgeführt. Beide Pilzarten parasitieren auf Gräsern und lassen sich leicht auf Malzagar nachzüchten.

Als Versuchspflanzen für Experimente mit *Pollenkörnern* verwenden wir die Becherprimel *Primula obconica* Hance. Bei der Becherprimel treten innerhalb der gleichen Art zwei verschiedene Formen auf, die sich im Bau der Blüten unterscheiden und deren Blütenstaub sich keimungsphysiologisch verschieden verhält. Nach einem auffälligen Baumerkmal der Blüte wird die eine Form als «Kurzgriffel», die andere als «Langgriffel» bezeichnet. Durch geeignete Anbaumassnahmen gelingt es, die Becherprimel während rund acht Monaten im Jahr blühend zu erhalten.

Bei der Verwendung dieser Versuchspflanzen bietet die Keimung von Pilzsporen und Blütenstaubkörnern auf künstlichen Substraten günstige Voraussetzungen für die Entwicklung eines mikrobiologischen Testverfahrens. Folgende Vorteile stehen im Vordergrund:

1. Die ausgewählten Pilzsporen und Pollenkörner keimen bei wasserdampfgesättigter Luft auf Agar, auf festem Paraffin oder auf Filterpapier aus. In Agar lassen sich hydrophile Testsubstanzen lösen; Paraffin kann als Lösungsmittel für fettlösliche Stoffe dienen, während der Keimungstest auf Filterpapier unter ge-

wissen Voraussetzungen erlaubt, Papierchromatogramme und Papierelektropherogramme auf ihren Gehalt an keimungsaktiven Verbindungen zu prüfen, ohne die wirksamen Stoffe eluieren zu müssen.

2. Die ausgewählten Testobjekte keimen im Verlaufe von nur 1-4 h aus. Bei dieser raschen Keimung ist es nicht notwendig, die Versuche steril anzusetzen, da sich eine allfällige Fremdinfektion bis zum Abschluss der Experimente nicht auszuwirken vermag.

3. Die Keimfähigkeit der ausgewählten Sporen und Blütenstaubkörner liegt zwischen 30% und 70%. Es lassen sich daher mit dem gleichen Testobjekt sowohl keimungsfördernde wie keimungshemmende Einflüsse erkennen.

4. Die Testobjekte keimen unter ähnlichen Temperaturbedingungen aus. Es ist daher möglich, die Versuche mit allen Organismen bei der gleichen Temperatur (24°C) durchzuführen.

5. Die Testorganismen benötigen für die Keimung keine zusätzlichen Nähr- oder Wirkstoffe.

Über die *Versuchstechnik des Keimungstests* wird an anderer Stelle eine ausführliche Arbeit veröffentlicht (SCHWARZENBACH¹). Für das Verständnis der nachfolgenden Ausführungen genügt eine kurze Übersicht über den Arbeitsgang:

a) Vorbereitung des Keimsubstrates nach besonderen Vorschriften für die Keimung auf Agar, Serumagar, Paraffin oder Filterpapier.

b) Aussaat der Pilzsporen oder Blütenstaubkörner.

c) Keimung bei 24°C im Thermostaten. Dauer des Versuches 1-4 h, je nach Testobjekt und Keimsubstrat.

d) Herstellung eines Auszählpräparates.

e) Auszählung der gekeimten Sporen oder Pollenkörner unter dem Mikroskop.

¹ F. H. SCHWARZENBACH, *Untersuchungen über einen Keimungstest mit Pilzsporen und Blütenstaubkörnern zum Nachweis von Wirkstoffen. I. Die Versuchstechnik*. 1959 (im Druck).

II. Statistische Untersuchungen zur Wahl des biologischen Masses

Die Keimfähigkeit von Pilzsporen oder Blütenstaubkörnern wird bestimmt, indem man unter dem Mikroskop in einer zufällig herausgegriffenen Stichprobe bestimmten Umfangs sämtliche Sporen oder Pollenkörner einzeln als «gekeimt» oder «ungekeimt» klassiert und den Anteil der gekeimten Einheiten in der gesamten Stichprobe berechnet. Als «gekeimt» bezeichnen wir eine Spore oder ein Blütenstaubkorn, wenn der Keimschlauch im Minimum eine Länge erreicht, die dem Kaliber des Schlauches entspricht (Abb. 1, 2).



Abb. 1. *Alternaria tenuis*. Mikroaufnahme keimender Sporen. Längsdurchmesser der Sporen um 0,03 mm

Im Sinne der mathematischen Statistik stellt die Keimung von Pilzsporen oder Blütenstaubkörnern eine «Alles-oder-nichts-Reaktion» («quantal response») dar.

Umfang der Stichprobe. Es liegt im Ermessen des Experimentators, den Umfang der Stichprobe und die Art ihrer Erhebung festzulegen. Bei der Festsetzung des Umfangs waren für den Keimungstest folgende Überlegungen massgebend:

1. Die Auszählung von Sporen oder Pollenkörnern unter dem Mikroskop ist zeitraubend und mühsam. Als gute Tagesleistung ist die Auszählung von 12000 Sporen oder Blütenstaubkörnern zu werten.

Bei dem erheblichen Arbeitsaufwand, den die Auszählung erfordert, machen grosse Stichproben den Test schwerfällig und unrationell; bei einer auf 12000 Sporen oder Pollenkörner limitierten Tagesleistung wird bei umfangreichen Stichproben die Zahl der in einem Experiment möglichen Vergleichskulturen soweit vermindert, dass auf Versuchsanordnungen verzichtet werden muss, die eine grössere Zahl von Einzelbestimmungen vorsehen. Diese Argumente sprechen zu gunsten kleiner Stichproben.

2. Bei wachsendem Umfang der Stichproben nimmt die Streuung der Versuchsresultate ab. Bei «Alles-oder-nichts-Reaktionen» berechnet sich die Standardabweichung

$$s = \sqrt{p(1-p)/n},$$

worin p die Wahrscheinlichkeit für den Eintritt des Ereignisses, n den Umfang der Stichprobe angibt.

3. Stichproben einheitlichen Umfangs vereinfachen die Berechnungen für die gebräuchlichen statistischen Prüfverfahren; sehr oft lassen sich dabei für spezielle Versuchsanlagen zeitsparende graphische Methoden entwickeln.

Auf Grund zahlreicher Vorversuche erwies sich im Keimungstest eine Stichprobe im einheitlichen Umfang von 250 Sporen oder Pollenkörnern als geeignet.

Untersuchungen über die Streuungsverhältnisse des biologischen Masses. Die Kenntnis der Streuung, die einem biologischen Mass anhaftet, ist von entscheidender Bedeutung für die Planung der Versuche. Es lohnt sich erfahrungsgemäss immer, in ausgedehnten Vorexperimenten die Streuung eines biologischen Masses unter den gewählten Versuchsbedingungen eingehend abzuklären.

Bei der Entwicklung des Keimungstests mit Pilzsporen wurden zur Untersuchung der Streuungsverhältnisse unter anderem folgende Versuche durchgeführt:

An sechs, zeitlich über mehrere Wochen verteilten Versuchstagen prüften wir Sporen der gleichen Pilzgeneration auf ihre Keimfähigkeit. Zu diesem Zwecke säten wir jeweils auf fünf, in gleicher Weise vorbereitete Schalen mit Agar die Sporen des Testpilzes aus. Für die Auszählung stellten wir von der Sporenaufschwemmung in jeder Schale fünf verschiedene Präparate her; in jedem Präparat zählten wir fünf zufällig herausgegriffene Stichproben von je 50 Sporen aus.

Die Ergebnisse dieser Versuche mit *Alternaria tenuis* wurden in einer Streuungszerlegung ausgewertet^{2,3}.

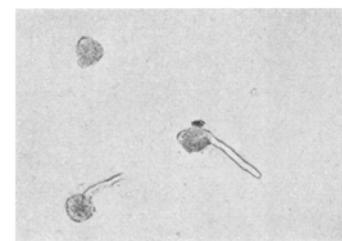


Abb. 2. Keimende Pollenkörner aus kurzgriffligen Blüten von *Primula obconica*. Mikroaufnahme. Durchmesser der Pollenkörner um 0,04 mm

Aus dieser Streuungszerlegung lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. Die Streuung zwischen den Stichproben eines Präparates und zwischen den Präparaten aus einer Schale stimmen im Rahmen des Zufalles überein. Bei der Herstellung der Auszählpräparate tritt daher keine Selektion der gekeimten Sporen ein.

2. Die Streuung zwischen den Schalen eines Versuches ist wesentlich grösser als die Streuung zwischen

² R. A. FISHER, *Statistical Methods for Research Workers*, 12th edition (Oliver & Boyd, Edinburgh 1954).

³ A. LINDER, *Statistische Methoden*, 2. Aufl. (Birkhäuser Verlag, Basel 1951).

Streuung	Freiheitsgrad	Summe der Quadrate	Durchschnittsquadrat	F	F _{0,001}
Zwischen den Versuchen	5	4 878,839	975,768	39,338	5,98
Zwischen den Schalen innerhalb eines Versuches	24	595,328	24,805	10,614	2,40
Zwischen den Präparaten innerhalb einer Schale	120	280,400	2,337
Zwischen den Stichproben innerhalb eines Präparates	600	1 552,400	2,537
Insgesamt	749	7 306,967

den Präparaten aus einer Schale oder zwischen den Stichproben eines Präparates. Aus diesem Befund ergibt sich zwingend, dass für die Beurteilung einer keimungsaktiven Wirkung auf die Streuung zwischen den Schalen, nicht aber auf die Variabilität zwischen den Stichproben eines Präparates oder zwischen den Präparaten aus einer Schale abzustellen ist.

3. Die Streuung zwischen den Versuchen ist erheblich grösser als die Streuung zwischen den Schalen. Es ist daher notwendig, *in jedem Versuch eine eigene Keimfähigkeitskontrolle mitzuführen*. Für den Vergleich verschiedener Versuche empfiehlt es sich, ein relatives Mass für die Beurteilung der Wirkung einzuführen. In der Regel wird dabei die Keimrate der Testschalen in Prozenten der Kontrollwerte ausgedrückt.

Diese Erfahrungen führten zur Festlegung eines einheitlichen Auszählverfahrens:

a) Von jeder Schale wird ein einziges Auszählpräparat hergestellt. Aus jedem Präparat werden fünf zufällig herausgegriffene Stichproben von je 50 Sporen ausgezählt.

b) Um die keimungsaktive Wirkung einer Testschale zu bestimmen, vergleichen wir die beobachtete Keimzahl mit dem Mittelwert aus vier im Versuch mitgeführten Kontrollen. Als relatives Mass wählen wir die Vergleichszahl

$$V = \frac{\text{Keimzahl Test} \times 100}{\text{Durchschnittliche Keimzahl aus 4 Kontrollen}}$$

III. Die Anwendung statistischer Verfahren bei der Entwicklung der Versuchstechnik

Die Hauptaufgabe des Experimentalbiologen bei der Entwicklung eines biologischen Tests besteht darin, durch systematische Analyse von Versuchsbedingungen eine günstige Kombination von Versuchsfaktoren aufzufinden und Fehlerquellen auszuschliessen.

Die Qualität eines biologischen Testverfahrens lässt sich an der Streuung der Ergebnisse abschätzen. Ein biologischer Test im Rohstadium liefert in der Regel Resultate, die mit einer grossen Streuung behaftet sind. Fälle, bei denen die Standardabweichung s mehr als 20% des Durchschnittes ausmacht, sind durchaus nicht aussergewöhnlich. Eine derart grosse Variabilität der Ergebnisse wirkt sich bei der statistischen Beurteilung der Versuche ungünstig aus.

Die beträchtliche Streuung der Ergebnisse bei der Anwendung ungenügend entwickelter Testverfahren beruht darauf, dass durch unkontrollierte Versuchsbedingungen das Resultat verändert wird. Der Experimentalbiologe hat die Aufgabe, diese störenden Einflüsse aufzuspüren und die Fehlerquellen durch geeignete Massnahmen auszuschalten. Die Aufdeckung von Störfaktoren ist schwierig; ein allgemeingültiges Rezept zur Lösung dieser Aufgabe lässt sich nicht geben.

Bei Testmethoden im Rohstadium genügt es gelegentlich, in einem Vergleichsversuch das Verfahren in bestimmter Weise zu variieren und die Streuungen der Ergebnisse statistisch zu vergleichen. Versuchsanordnungen, die zu Resultaten mit beträchtlichen Streuungen führen, sind als ungeeignet zu verwerfen.

In anderen Fällen gelingt es, Fehlerquellen zu entdecken, indem man in Experimenten mit auffällig hohen Streuungen die extremen Einzelwerte herausgreift. Auf Grund von Beobachtungen während des Ansetzens der Versuche ergeben sich oft Anhaltspunkte über die Natur des störenden Faktors. In besonderen Experimenten lässt sich dann prüfen, ob die Vermutung zutrifft.

Auswahl eines geeigneten Verfahrens zur Aussaat von Pilzsporen bei Keimungsversuchen auf Folien von Zellulose-Azetat. Bei Keimungsversuchen auf Folien von Zellulose-Azetat werden quadratische Stücke von $1,0 \times 1,0$ cm auf heissflüssigen Agar von 60° aufgelegt. Diese Abschnitte sinken leicht ein und saugen sich mit flüssigem Agar voll. Erstarrt der Agar unter Abkühlung, so bleiben die Folienstücke in ihrer Lage fixiert.

Für die Aussaat der Sporen auf diesen Folien wurden drei verschieden Verfahren nebeneinander erprobt.

1. Von einer filtrierten Sporensuspension werden auf die Agaroberfläche jeder Schale je 1,0 ml aufgetragen. Man lässt die Sporen während fünf Minuten absitzen und saugt anschliessend das überstehende Wasser an der Wasserstrahlpumpe ab. Die Oberfläche des Agars wird im Warmluftstrom getrocknet.

2. Die Sporensuspension wird durch Zentrifugation der Sporen sehr stark konzentriert. Mit einer Pipette trägt man einen Tropfen dieser Aufschwemmung auf die Folie auf und trocknet im Warmluftstrom nach.

3. Die Sporensuspension wird wiederum durch Zentrifugation stark konzentriert und im Exsikkator über Nacht getrocknet. Unter Verwendung von Gummi-

handschuhen streicht man mit dem Finger die trockenen Sporen auf der Zellulose-Azetat-Folie aus.

Nach jedem Verfahren werden mit Sporen von *Alternaria tenuis* vier Parallelen angesetzt. In jeder Schale zählten wir 5×50 Sporen aus.

Verfahren 1				Verfahren 2				Verfahren 3			
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
19	22	21	27	18	24	22	21	19	20	23	18
25	20	20	23	19	22	20	23	19	18	22	19
26	22	22	25	20	23	24	18	24	29	22	22
22	21	22	23	23	25	24	18	30	22	33	21
19	23	19	21	24	19	19	24	25	20	24	24
111	108	104	119	104	113	109	104	117	109	124	104
$s^2 = 5,25$				$s^2 = 5,84$				$s^2 = 16,54$			

Für den Vergleich der Verfahren 2 und 1 ist $F = 5,84:5,25 = 1,11$. Für den Vergleich der Verfahren 3 und 1 ist $F = 16,54:5,25 = 3,15$. Für $n_1 = 19$ und $n_2 = 19$ ist $F_{0,05} = 2,17$ und $F_{0,01} = 3,03$.

Massgebend für die Beurteilung der Versuche ist die Gesamtstreuung innerhalb eines Blockes; der Versuch zeigt, dass die beiden Verfahren 1 und 2 gleichwertig sind, während das Verfahren 3 eine wesentlich grössere Streuung aufweist und damit als ungeeignet ausscheidet.

Die Durchschnitte der drei Gruppen sind nicht miteinander vergleichbar, da für die Untersuchung verschiedene Sporensuspensionen verwendet werden müssen.

Der Einfluss der Suspensionsdichte auf die Keimfähigkeit von Pilzsporen. Bei der Aussaat der Pilzsporen wird eine wässrige Sporensuspension auf die vorbereiteten Schalen mit Agar oder Paraffin aufgetragen. Man lässt die Sporen während 5 min absitzen und saugt die überstehende Flüssigkeit ab. Um möglichst rationell arbeiten zu können, verzichteten wir bei grossen Serien anfänglich darauf, die Volumina der Sporensuspension abzumessen, die auf jede Schale übertragen wurden. Im Verlaufe der Untersuchungen schähte sich jedoch die Vermutung heraus, dass die Dichte der Aussaat die Keimfähigkeit der Sporen beeinflusse.

Um diese Vermutung zu prüfen, stellten wir von einer sehr dichten Sporensuspension von *Alternaria tenuis* eine fünfstufige Verdünnungsreihe in geometrischer Progression mit dem Verdünnungsfaktor $q = 0,5$ her. Von jeder Verdünnung setzten wir auf dem üblichen Agarsubstrat vier Parallelen an, wobei wir auf jede Schale genau 1,0 ml der Sporensuspension pipettierten. Nach Sedimentation der Sporen wurde das überstehende Wasser an der Wasserstrahlpumpe abgesaugt.

Die fünf Blöcke zu je vier Schalen wurden streng zufällig zusammengestellt und im Blindversuch ausgezählt. Eine erste Auswertung erfolgte in einer einfachen Streuungszerlegung, wobei die Daten des Versuches in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt sind.

Verdünnungsstufe	I	II	III	IV	V	Summe
	108	115	117	122	120	582
	116	122	116	115	119	588
	115	110	117	119	127	588
	111	115	120	123	115	584
Summe	450	462	470	479	481	2342

Durchschnitte	112,50	115,50	117,50	119,75	120,25	117,10
---------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

Summe der Quadrate innerhalb der Gruppen	41,00	73,00	9,00	38,75	74,75	236,50
--	-------	-------	------	-------	-------	--------

Streuung	Freiheitsgrad	Summe der Quadrate	Durchschnittsquadrat
Zwischen den Gruppen . . .	4	163,30	40,825
Innerhalb der Gruppen . . .	15	236,50	15,767

$$F = 40,825:15,767 = 2,589; \\ F \text{ für ein } P \text{ von } 0,05 \text{ bei } n_1 = 4, n_2 = 15: 3,06.$$

Bei Anwendung der *einfachen Streuungszerlegung* als statistisches Prüfverfahren lassen sich zwischen den fünf Gruppen *keine gesicherten Unterschiede* feststellen.

Macht man jedoch von der Voraussetzung Gebrauch, dass in diesem Versuch eine Verdünnungsreihe mit gleichmässig abgestuften Suspensionsdichten geprüft wird, so kann das Ergebnis mit den Verfahren der *Regressionsrechnung* statistisch beurteilt werden.

In der Tat lässt sich die Summe der Quadrate weiter zerlegen, indem man die Summe der Quadrate der Regressionswerte und jene der Abweichungen der Gruppendurchschnitte um die Regressionsgerade berechnet.

Streuung	Freiheitsgrad	Summe der Quadrate	Durchschnittsquadrat
Regressionswerte	1	156,025	156,025
Durchschnitte um Regression	3	7,275	2,425
Zwischen Gruppen	4	163,300	

Da $F = 156,025:15,767 = 9,896$ grösser ist als $F_{0,01} = 8,68$, stellt sich die Zunahme der Keimraten mit abnehmender Dichte der Sporensuspension als *gesichert* heraus.

Die Wahl der Pufferlösungen. Bei biologischen Versuchen wird in der Regel mit gepufferten Lösungen gearbeitet. Drei Punkte sind bei der Wahl des Puffers zu berücksichtigen:

1. Der Toleranzbereich der Testorganismen darf weder nach der sauren, noch nach der alkalischen Seite überschritten werden.
2. Pufferlösungen, die ausser dem Einfluss der Wasserstoffionen noch biologische Nebenwirkungen hervorrufen, sind zu vermeiden.
3. Die Ionenstärke des Puffers ist so zu bemessen, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen die Kapazität des Puffers nicht erschöpft wird.

Nachdem Vorversuche gezeigt hatten, dass die beiden Testpilze im Neutralbereich optimale Keimungsbedingungen aufweisen, prüften wir den Phosphatpuffer nach SOERENSEN auf seine Eignung für Keimungsversuche mit Pilzsporen. Zu diesem Zwecke variierten wir in einem Experiment gleichzeitig die Wasserstoffionenkonzentration und die Ionenstärke des Puffers. Zur Untersuchung gelangten die fünf Stufen pH 5,4, 5,8, 6,4, 7,0 und 7,4; bei jeder Stufe wurden die drei Verdünnungen 1,0-molar, 0,01-molar und 0,0001-molar des Puffers geprüft. Für jede Kombination setzten wir vier Parallelen an. Die 60 Schalen wurden in zufälliger Reihenfolge ausgezählt.

Die Ergebnisse eines Experiments mit *Helminthosporium sativum* sind in Abbildung 3 graphisch dargestellt; als Unterlage für die Berechnungen diente die folgende Tabelle:

Die Wirkung von Phosphatpuffer nach SOERENSEN (5 pH-Stufen, 3 Konzentrationen) auf die Sporenkeimung von *Helminthosporium sativum*

Molare Pufferkonzentration	Wasserstoffionenkonzentration						
	5,4	5,8	6,4	7,0	7,4		
1,000	105	106	120	117	109		
	104	116	120	118	106		
	104	104	114	115	111		
	106	111	115	120	114		
	419	437	469	470	440	2235	
	90	104	108	103	103		
	93	102	111	101	96		
	94	100	105	109	98		
	93	98	105	110	97		
	370	404	429	423	394	2020	
0,0100	105	102	102	105	104		
	105	103	111	105	99		
	104	104	102	103	110		
	103	103	105	102	102		
	417	412	420	415	415	2079	
	1206	1253	1318	1308	1249	6334	

Als Einzelwerte sind die Summen der gekeimten Sporen aus 5 Stichproben zu je 50 Sporen eingesetzt.

Eine erste Streuungszerlegung umfasst die Ergebnisse des ganzen Versuches.

Streuung	Freiheitsgrad	Summe der Quadrate	Durchschnittsquadrat
Zwischen Pufferkonzentrationen	2	246,807	123,404
Zwischen pH-Werten	4	142,047	35,512
Wechselwirkung	8	69,093	8,637
Zwischen den Gruppen	14	457,947	...
Zwischen den Schalen innerhalb einer Gruppe .	54	87,800	1,951
Insgesamt	59	545,747	...

Die Wechselwirkung zwischen Pufferkonzentration und pH-Werten erweist sich als gesichert, da $F =$

$8,637 : 1,951 = 4,427$ grösser ist als $F_{0,001}$, das etwa 4,1 ist.

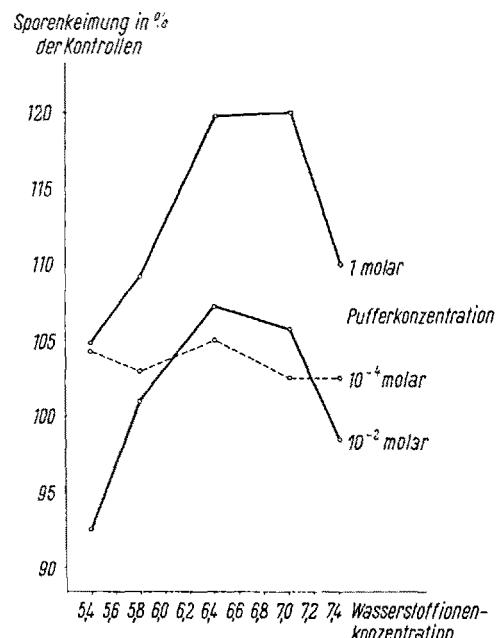


Abb. 3. Die Wirkung von Phosphatpuffer nach SOERENSEN auf die Sporenkeimung von *Helminthosporium sativum*

Ein Blick auf die Abbildung 3 zeigt, dass die Kurven für die Abhängigkeit der Keimrate von den pH-Werten für die beiden höheren Pufferkonzentrationen parallel verlaufen. Wenn man daher eine Streuungszerlegung unter Ausschaltung der niedrigsten Pufferkonzentration (0,0001-molar) durchführt, so erhält man folgendes Bild:

Streuung	Freiheitsgrad	Summe der Quadrate	Durchschnittsquadrat
Zwischen Pufferkonzentrationen	1	231,125	231,125
Zwischen pH-Werten	4	205,150	51,288
Wechselwirkung	4	4,250	1,062
Zwischen den Gruppen	9	440,525	...
Zwischen den Schalen innerhalb der Gruppen .	30	61,750	2,058
Insgesamt	39	502,275	...

Da das Durchschnittsquadrat der Wechselwirkung kleiner ist als jenes innerhalb der Gruppen, können die Unterschiede der Keimraten zwischen den Pufferkonzentrationen 1,000-molar und 0,0100-molar für alle pH-Werte im wesentlichen als gleich gross vorausgesetzt werden.

Schliesslich kann noch für die Pufferkonzentration 0,0001-molar die Summe der Quadrate zwischen den pH-Werten berechnet werden. Sie beläuft sich auf 1,740; darauf ergibt sich bei 4 Freiheitsgraden ein Durchschnittsquadrat von 0,435. Da dieses kleiner ist als das Durchschnittsquadrat innerhalb der Gruppen,

unterscheiden sich die Keimraten für die verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen nicht wesentlich.

Aus diesen Berechnungen werden folgende Schlüsse gezogen:

1. Der Phosphatpuffer nach SØRENSEN steigert in hohen Konzentrationen die Keimrate von *Helminthosporium sativum*. Diese Förderung, eine Nebenwirkung des Phosphatpuffers, ist in der Verdünnungsstufe 1,0000-molar gesichert.

2. Die Sporenkeimung wird in den Pufferkonzentrationen 1,000-molar und 0,0100-molar durch die Wasserstoffionenkonzentration beeinflusst. Das Keimungsoptimum liegt bei den pH-Stufen 6,4 und 7,0.

3. Sinkt die Konzentration des Puffergemisches auf 10^{-4} -molar ab, so reicht die Pufferkapazität nicht mehr aus, um dem System Sporen/Keimungsmedium eine bestimmte Wasserstoffionenkonzentration aufzuzwingen. Dieser Schluss wird aus der Beobachtung gezogen, dass die Verdünnungsstufe 0,0001-molar keine gesicherten pH-Effekte mehr aufweist.

4. In den Konzentrationsstufen 1,000-molar und 0,0100-molar besteht keine gegenseitige Beeinflussung zwischen der Förderwirkung des Puffers (Nebenwirkung) und der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung. Die beiden Wirkungskurven verlaufen parallel.

IV. Die Verwendung statistischer Verfahren bei der Auswertung von Versuchen. Die Wirkung von menschlichem Serum auf die Sporen- und Pollenkeimung

Wir versuchten, mit Hilfe des Keimungstests im menschlichen Serum Wirkstoffe nachzuweisen, welche die Keimung von Pilzsporen und Blütenstaubkörnern beeinflussen. Jede Blutprobe untersuchten wir gleichzeitig in ihrer Wirkung auf die Keimung von vier Testobjekten:

Sporen von *Helminthosporium sativum*;

Sporen von *Alternaria tenuis*;

Blütenstaubkörner aus kurzgriffligen Blüten von *Primula obconica*;

Blütenstaubkörner aus langgriffligen Blüten von *Primula obconica*.

Eine Versuchsserie umfasste 12–18 Blutproben. Von jeder Blutprobe mischten wir 1,0 ml Serum mit 9,0 ml flüssigem Agar von 43°–45° und gossen diesen Serum-agar gleichmäßig in vier Schalen. Je eine Schale wurde mit Sporen oder Pollenkörnern eines Testobjektes beschickt. Die Keimung erfolgte unter den üblichen Bedingungen.

Mit jedem Testorganismus setzten wir vier Kontrollschenale an, in denen dem Agar an Stelle von Serum eine entsprechende Menge Wasser beigefügt worden war. Wir wählten je vier Kontrollen, da bei einer Serie von n Proben die Zahl von \sqrt{n} Kontrollen die genauesten Vergleiche zwischen Proben und Kontrollen gewährleistet (siehe zum Beispiel BLISS und CALHOUN⁴).

Aus jeder Schale zählten wir eine Gruppe von fünf Stichproben mit je 50 Sporen oder Pollenkörnern aus; die Wirkung wurde in Prozenten des Durchschnittes in der Kontrollserie gemessen.

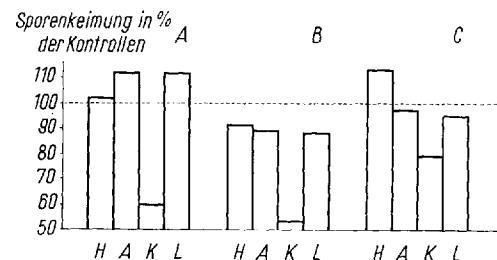


Abb. 4. Die Wirkung von menschlichem Serum auf die Keimung von Pilzsporen und Blütenstaubkörnern. Wirkungstypen A, B und C (Definition im Text, S. 90).

Testorganismen: H = Sporen von *Helminthosporium sativum*;
A = Sporen von *Alternaria tenuis*;
K = Pollenkörner aus kurzgriffligen Blüten von *Primula obconica*;
L = Pollenkörner aus langgriffligen Blüten von *Primula obconica*.

Die ersten Versuche zeigten, dass menschliches Serum die Keimung der vier Testorganismen in verschiedener Weise beeinflusst. In den meisten Fällen weisen die Sporen von *Helminthosporium sativum* die gleiche Keimfähigkeit bei Zusatz von Serum wie in der Kontrolle auf; die Sporen von *Alternaria tenuis* und die Pollenkörner aus langgriffligen Blüten von *Primula obconica* werden durch Serum leicht gefördert, während die Keimung von Blütenstaubkörnern aus kurzgriffligen Blüten von *Primula obconica* stark gehemmt wird. Dieses Wirkungsspektrum, das den meisten Seren eigen ist, wird als Reaktionstyp A bezeichnet (Abb. 4).

Bei der Untersuchung mehrerer hundert Blutproben stellte sich heraus, dass neben Seren des Wirkungstyps A Blutproben mit abweichender Wirkung auf die Sporen- und Pollenkeimung auftraten. Einzelne Seren bewirkten im Vergleich zu der üblichen Reaktion eine Hemmung bei allen vier Organismen. Diese Reaktionsweise wurde als Typ B bezeichnet (Abb. 4).

Bei anderen Seren wurde die Keimrate von *Helminthosporium sativum* und von Blütenstaub aus kurzgriffligen Blüten von *Primula obconica* im Vergleich zu den Normalseren erhöht, bei den anderen beiden Testobjekten erniedrigt; zur raschen Unterscheidung bezeichneten wir diese Reaktionsweise als Typ C (Abb. 4).

Diese Ergebnisse stellten uns vor das Problem, diese drei Typen von Seren nach ihren keimungaktiven Wirkungen gegeneinander abzugrenzen und ein Verfahren zu finden, das erlaubt, eine Blutprobe nach den Ergebnissen des Keimungstests eindeutig einer der drei Gruppen zuzuweisen. Eine zuverlässige Methode zur Klassierung von Einzelproben ist Voraussetzung, um die Frage prüfen zu können, ob die drei Reaktionstypen in gesetzmässiger Weise mit bestimmten Krankheiten korreliert sind. Diese Frage stand im Vordergrund des Interesses, da sich bald herausstellte, dass

⁴ C. I. BLISS und D. W. CALHOUN, *An Outline of Biometry* (Yale Cooperative Corp., New Haven 1954).

Helminthosporium sativum
Häufigkeitsverteilung der Vergleichszahlen bei den drei Wirkungstypen A, B und C.

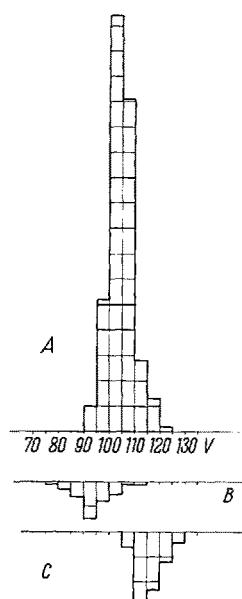


Abb. 5. Die Wirkung von menschlichem Serum auf die Sporenkeimung von *Helminthosporium sativum*.
V = Vergleichszahl (Sporenkeimung in % der Kontrolle).

der Reaktionstyp B sich vorwiegend bei Blutspendern fand, die eine epidemische Gelbsucht durchgemacht hatten, während Seren von Patienten, die an Malignomen litten, oft den Reaktionstyp C aufwiesen.

Alternaria tenuis
Häufigkeitsverteilung der Vergleichszahlen bei den drei Wirkungstypen A, B und C.

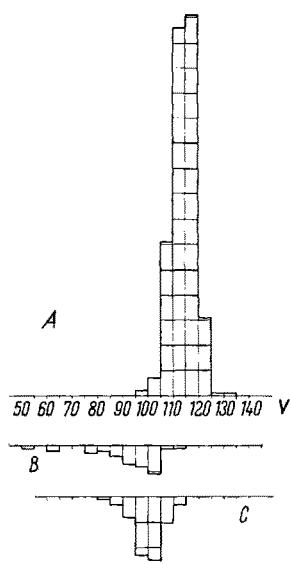


Abb. 6. Die Wirkung von menschlichem Serum auf die Sporenkeimung von *Alternaria tenuis*. V = Vergleichszahl.

Als Unterlagen für die Entwicklung eines Klassierungsverfahrens wählten wir 73 Seren mit eindeutiger C-Reaktion und 41 Proben mit B-Reaktion, die wir mit 400 Blutproben des normalen Reaktionstyps A verglichen.

Primula obconica, Kurzgriffel
Häufigkeitsverteilung der Vergleichszahlen bei den drei Wirkungstypen A, B und C.

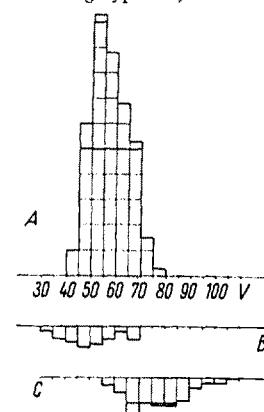


Abb. 7. Die Wirkung von menschlichem Serum auf die Keimung von Pollenkörnern aus kurzgriffligen Blüten von *Primula obconica*. V = Vergleichszahl.

Die Resultate dieser Versuche sind in den Abbildungen 5–8 zusammengestellt. Die drei Gruppen A, B und C werden einander gegenübergestellt; für jeden Organismus sind die beobachteten Vergleichszahlen in Form von Häufigkeitsverteilungen in Klassen von je fünf Einheiten zusammengefasst. Die Unterschiede zwischen den durchschnittlichen Vergleichszahlen in den Gruppen A und C einerseits, A und B anderseits sind für alle Organismen nach dem t-Test statistisch eindeutig gesichert; doch lehrt ein Blick auf die Häufigkeitsverteilung, dass sich die Kurven für die ver-

Primula obconica, Langgriffel
Häufigkeitsverteilung der Vergleichszahlen bei den drei Wirkungstypen A, B und C.

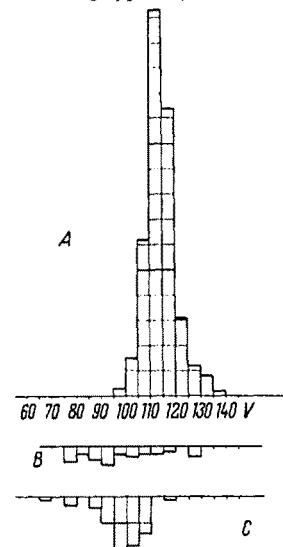


Abb. 8. Die Wirkung von menschlichem Serum auf die Keimung von Pollenkörnern aus langgriffligen Blüten von *Primula obconica*. V = Vergleichszahl.

schiedenen Gruppen teilweise überschneiden, so dass eine eindeutige Klassierung einer Einzelprobe auf Grund des Keimungsversuches mit einem einzigen Testobjekt nicht möglich ist.

Einen Ausweg aus dieser Schwierigkeit bietet die Anwendung des Trennverfahrens von FISHER⁵. Durch die Berechnung einer linearen Trennformel gelingt es, die einzelnen Bestimmungen mit den vier Organismen zu einem einzigen Index zusammenzufassen, der es nun erlaubt, die Zugehörigkeit einer Blutprobe zu einer der drei Gruppen zu bestimmen. Vorerst berechneten wir je eine Trennformel für die Unterscheidung der Gruppen *A* und *B*, bzw. *A* und *C*. Später erwies es sich als notwendig, eine dritte Formel aufzustellen, die in den seltenen Fällen angewendet wird, in denen eine Blutprobe nach den ersten Trennformeln sowohl für *B* wie auch für *C* eine positive Reaktion ergibt. Die drei Trennformeln lauten wie folgt:

Unterscheidung zwischen den Gruppen *A* und *B*:

$$Y = 1,00 x_H + 1,41 x_A + 0,32 x_K + 1,08 x_L$$

Unterscheidung zwischen den Gruppen *A* und *C*:

$$X = 1,00 x_H - 0,98 x_A + 0,58 x_K - 0,59 x_L$$

Unterscheidung zwischen den Gruppen *B* und *C*:

$$Z = 1,00 x_H - 0,03 x_A + 0,34 x_K + 0,13 x_L$$

In diese Formel sind folgende, experimentell bestimmten Vergleichszahlen einzusetzen:

x_H = Vergleichszahl für *Helminthosporium sativum*;

x_A = Vergleichszahl für *Alternaria tenuis*;

x_K = Vergleichszahl für Blütenstaub aus kurzgriffligen Blüten von *Primula obconica*;

x_L = Vergleichszahl für Blütenstaub aus langgriffligen Blüten von *Primula obconica*.

Berechnen wir nach diesen Trennformeln die *X*-, *Y*- und *Z*-Werte für alle Proben der Gruppen *A*, *B* und *C*, so erhalten wir die Ergebnisse, wie sie in den Abbildungen 9–11 dargestellt sind. Es zeigt sich, dass durch Anwendung dieser Trennformeln je zwei Gruppen ein-

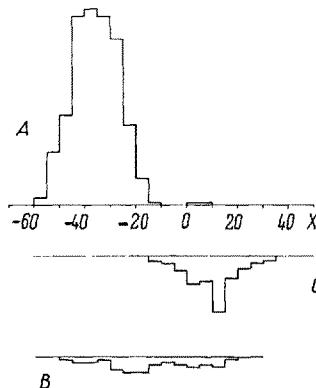


Abb. 9. Häufigkeitsverteilung der *X*-Werte für die drei Wirkungstypen *A*, *B* und *C*.

deutig getrennt sind. Für die Klassierung einer Einzelprobe wird an jede Häufigkeitsverteilung eine Normalverteilung angepasst. Auf Grund dieser Normalverteilungen lassen sich dann die Grenzen, ausserhalb deren 5 und 1% der Einzelwerte liegen, berechnen. Blutproben, deren *X*- oder *Y*-Werte ausserhalb der 1%-Grenze der Gruppe *A* liegen, werden der Gruppe *C*, bzw. *B* zugewiesen; liegt der Wert zwischen der 5%-

und der 1%-Grenze, so wird die Probe im Keimungstest erneut geprüft.

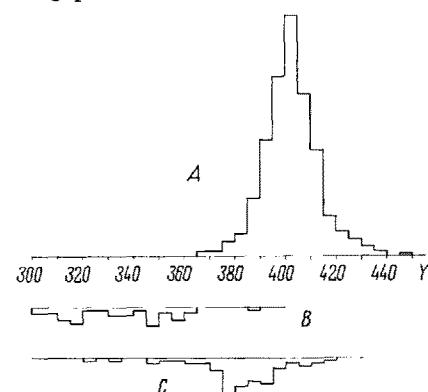


Abb. 10. Häufigkeitsverteilung der *Y*-Werte für die drei Wirkungstypen *A*, *B* und *C*.

Sprechen *X*- und *Y*-Test positiv an, so erfolgt die entscheidende Klassierung mit Hilfe des *Z*-Testes.

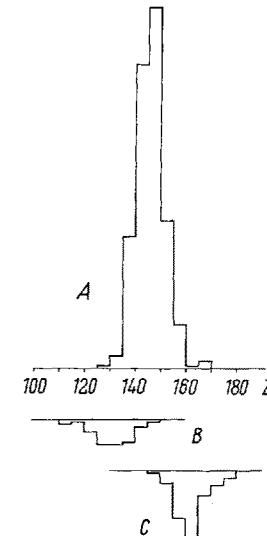


Abb. 11. Häufigkeitsverteilung der *Z*-Werte für die drei Wirkungstypen *A*, *B* und *C*.

Um die Auswertung der Versuche zu vereinfachen, versuchten wir, eine lineare Trennformel zu berechnen, die es erlaubt, mit einer einzigen Berechnung die end-

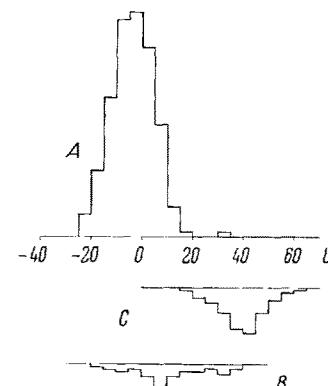


Abb. 12. Häufigkeitsverteilung der *U*-Werte für die drei Wirkungstypen *A*, *B* und *C*.

⁵ R. A. FISHER, Ann. Eugenics 8, 376 (1938).

gültige Zuordnung zu einer der drei Gruppen A, B oder C vorzunehmen. Es ergab sich folgende Trennformel:

$$U = 1,00 x_H - 0,81 x_A + 0,64 x_K - 0,50 x_L.$$

Bei der Anwendung dieser Trennformel erhielten wir die Resultate, die in Abbildung 12 dargestellt sind. Die Trennung zwischen den beiden Gruppen A und C vermag den Anforderungen zu genügen, dagegen befriedigt die Abgrenzung der Gruppe B nicht. Der Grund liegt darin, dass die Berechnung unter Annahme einer

linearen Trennformel erfolgte. Eine lineare Trennformel vermag aber der Tatsache nicht gerecht zu werden, dass Seren der Gruppe B alle vier Organismen im Vergleich zu Normalseren hemmen, während Proben der Gruppe C zwei Organismen hemmen, die beiden anderen aber fördern.

Summary

The methods of modern statistics are of great value in developing a new biological test. The advantage of the statistical design is demonstrated by experiments on the germination of pollen grains and spores of fungi.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. — Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. — Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. — The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Rigorous Proof of an Allylic Rearrangement in the Pyro-Isopyro Change in Delphinine

Some time ago¹ we have deduced the partial structure I for the C-D ring system of Delphinine. The asterisked methoxyl was at that time not directly proved and the pyro(II)-isopyro(III) change was considered to be either a shift of a double bond or an allylic rearrangement. However, it was already then emphasized² that our scheme can be maintained only if the asterisked methoxyl is real. A simple shift of the double bond (II → III) in the absence of the asterisked methoxyl is mechanistically implausible and a careful analysis of the data reveals that no possibility remains in the absence of the methoxyl to explain the existence of isomeric dihydropyro and dihydroisopyro derivatives.

We now wish to report a further corroboration of our scheme which includes also direct proof of the methoxyl in question and its allylic shift in the rearrangement II → III.

The alumina isomerisation products of α -oxodihydro-pyrodelphonone and α -oxodihydroisopyrodelphonone already reported by JACOBS³ were formulated by us as IV and V¹. Compound V takes up one mole of periodate and gives a quantitative yield of the seco acid VI formed by elimination of a methoxyl (m.p. = 138°C; calculated for $C_{23}H_{31}NO_7 \cdot H_2O$: C 61.18; H 7.37; N 3.10; 3 OCH₃ 20.62%. Found: C 61.38; H 7.24; N 2.92; OCH₃ 19.99%).

Compound VI is stable to hot alkali and acid, and may be sublimed at 200°C without much decomposition. This

shows that VI is not a vinylogous β -keto acid. That in some cases cyclopentenones may have abnormally high ultraviolet maxima is preceded⁴. α -Oxodihydroisopyrodelphonine with chromic acid gives a seco keto acid $C_{24}H_{35}NO_8$ already described by JACOBS⁵ and formulated by us as VII. This compound by sublimation *in vacuo* gives a diketone first prepared by JACOBS⁶ and formulated by us as VIII.

We now find that VIII is transformed to VI quantitatively and practically instantaneously on treatment with dilute warm aqueous alkali. Another way to obtain VI is also the treatment of the oily ester of VII with methanolic sodium methoxide. The ketole IV takes up also one mole of periodate and gives a quantitative yield of an amorphous keto acid IX. The fact that the 1744 cm^{-1} peak in the infrared spectrum of IX belongs to a cyclopentanone follows from the finding that the oily ester of IX shows a single peak at 1743 cm^{-1} .

An important prerequisite of our reasoning is the identity of the skeletal structure of delphinine and isopyrodelphinine derivatives. We have now proved this point by a rigorous correlation. The seco acid X prepared by a series of steps¹ from α -oxodelphinine was reduced by sodium amalgam in refluxing alcohol and the products esterified with diazomethane and separated by chromatography on alumina. One product was the oily ester of XI ($C_{24}H_{35}NO_7$). This compound showed no hydroxyl band, a band at 1739 cm^{-1} (cyclopentanone and ester) and 1675 cm^{-1} (amide) in the infrared spectrum. Hydrolysis of the ester gave the amorphous acid XI. In the infrared spectrum of XI, the peak at 1731 cm^{-1} belongs to a cyclopentanone and is unchanged on salt formation.

¹ K. WIESNER, F. BICKELHAUPT, and Z. VALENTA, in press.

² K. WIESNER, Lecture at the Gordon Conference for steroids and related natural products, New Hampton, July 30, 1958.

³ W. A. JACOBS and S. W. PELLETIER, J. org. Chem. 22, 1428 (1957).

⁴ J. FAJKOŠ, Coll. Czechosl. chem. Comm. 23, 1559 (1958).

⁵ W. A. JACOBS and S. W. PELLETIER, J. Amer. chem. Soc. 78, 3542 (1956).

