

Z. Pflanzenkrankh. 46, 484 (1936). — 62. WARTENBERG, H.: Studien über Redoxpotentiale der Gewebepreßsäfte. Biochem. Z. 302, 262 (1939). — 63. WARTENBERG, H.: Studien über Redoxpotentiale der Gewebepreßsäfte von Pflanzenteilen. Festschrift APPEL, Berlin-Dahlem 1947. — 64. WARTENBERG, H.: Das Chloroseproblem. Festschrift zum 50jähr. Best. der BZA.

S. 179. Berlin 1948. — 65. WARTENBERG, H.: Abbau der Kartoffel und Viruskrankheiten. Urania 12, 133 (1949). — 66. ZOGG, H.: Die Blattdürre des Mohns. *Pyrenophora calvescens*. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 55, 240 (1945). — 67. ZOGG, H.: Zur Kenntnis pflanzlicher Abwehrreaktionen. Der Einfluß der Temperatur auf das Zustandekommen der gummösen Demarkationszone. Ber. Schweiz. Bot. Ges. 56, 507 (1946).

(Aus dem Institut für Pflanzenzüchtung Quedlinburg.)

Über eine neue Kulturmethode für Mikroorganismen*.

Von GEORG SÖRGE.

Mit 3 Abbildungen.

Das Kultivieren und Beobachten von Mikroorganismen in Reinkulturen wird in der Regel, von Spezialkulturen abgesehen, entweder in flüssigen oder auf festen Nährböden vorgenommen. Die großen Vorteile, die eine Verfestigung der Nährlösung durch Agar mit sich bringt, haben diesen seit seiner Einführung in die Nährbodentechnik durch KOCH zu einem unersetzlichen Mittel bei der Untersuchung niederer Pflanzen gemacht. Auch andere Hydrogele wie Gelatine, Kiesel säuregallerte, Carrageen usw. dienten vielfach demselben Zweck, jedoch konnten sie den Agar wegen seiner universelleren Verwendungsmöglichkeit keineswegs verdrängen. Es hat deshalb auch nicht an Versuchen gefehlt, den immerhin ziemlich kostbaren Agar durch agarähnlichere Produkte, als es die eben genannten Stoffe sind, wenn möglich aus einheimischen Algen zu ersetzen.

Eine andere Ersatzmöglichkeit sollte ursprünglich auch die hier zu beschreibende neuartige Kulturmethode darstellen, die es gestattet, einen Mikroorganismus in einer Nährlösung, jedoch gleichzeitig auf festem Substrat zu kultivieren. Nach nunmehr dreijähriger Anwendung dieser Methode kann von einem Ersatz nicht mehr die Rede sein, sondern es stellte sich heraus, daß sie für manche Untersuchungen den üblichen Methoden in verschiedener Hinsicht überlegen ist. Nicht nur Pilze, für die diese Art der Kultur vor allen Dingen verwendet wurde, ließen sich mit bestem Erfolg kultivieren, sondern es gelang auch, Myxomyceten, Cyanophyceen und Chlorophyceen (z. B. *Vaucheria*) zu guter Entwicklung zu bringen. Wegen der vielseitigen Verwendbarkeit dieser Methode soll sie hier näher beschrieben werden; dabei sei aber betont, daß für gewisse Spezialfälle der Agar immer unentbehrlich bleiben wird.

Bei dieser Methode wird der betreffende Organismus zwar auch auf einer festen Oberfläche, nämlich auf Filtrierpapier, kultiviert, jedoch verwendet man als eigentliches Nährsubstrat grundsätzlich einen flüssigen Nährboden. Wie aus der schematischen Zeichnung (Abb. 1) ersichtlich ist, bedeckt dieses Filtrierpapier eine mit Nährlösung gefüllte Schale. Das Papier dient dem Pilz als „Trägersubstanz“. Um dem Organismus die notwendigen Nährstoffe gleichmäßig zugänglich zu machen, ist es erforderlich, daß Papier und Flüssigkeit überall in inniger Berührung sind. Bei der Kultur gewisser niederer Pilze wurde zwar auch schon Filtrier-

papier verwendet, jedoch in völlig anderer Weise. Es diente dabei als Zellulosenährsubstrat.

Für sehr viele Pilze erwies sich folgende Form der Kultur als vorteilhaft: Die eigentliche Kulturschale mit dem flüssigen Nährmedium und dem Filtrierpapier steht zum Schutz gegen Infektionen in einer größeren sterilen Schale. Im allgemeinen werden dazu Schalen mit einem Durchmesser von 14 cm und einer Höhe von 2 cm verwendet. Für die kleineren Kulturschalen lassen sich je nach dem Objekt und den geplanten Untersuchungen verschiedene Größen verwenden. Bei einem Kulturschalendurchmesser von 5,5 cm muß das Filtrierpapier mindestens einen Durchmesser von 8 cm

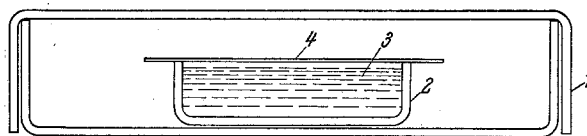


Abb. 1. Schematische Darstellung der neuen Kulturmethode. 1. Schale von 14 cm Ø, 2. eigentliche Kulturschale, 3. flüssiges Nährmedium, 4. Filtrierpapier.

haben, damit es genügend Halt auf der Schale findet. Kulturschalen mit einem geschliffenen Rand sind besonders geeignet, da auf ihnen das Papier sehr gut haftet.

Das Sterilisieren geschieht wie folgt: Die großen Schalen mit den darin befindlichen kleinen Kulturschalen werden in der üblichen Art und Weise im Trockenschrank hohen Temperaturen ausgesetzt. Getrennt davon werden im Dampftopf bzw. Autoklaven die Filtrierpapierblätter keimfrei gemacht, die zu 10–15 Stück in Petrischalen — gut in Pergamentpapier eingewickelt — hinreichend vor eindringendem Dampf geschützt sind. Ein Sterilisieren des Papiers im Trockenschrank empfiehlt sich nicht, weil infolge gewisser Veränderungen im Papier durch die Einwirkung hoher Temperaturen dieses u. a. nicht mehr so leicht wie vorher die Flüssigkeit annimmt.

Das Einfüllen der Nährlösung darf nicht geschehen solange die Flüssigkeit noch heiß ist, sondern erst nach genügender Abkühlung, indem die Flüssigkeit unter den bekannten mikrobiologischen Kautelen bei vorsichtigem geringen Öffnen der großen Schale in das Kulturschälchen gegossen wird. Es ist dabei unbedingt zu beachten, daß die Schalen bis an den Rand gefüllt werden, sofern man nicht vorzieht, mit vorher abgemessenen Mengen zu arbeiten, die je für eine Schale reichend getrennt in kleinen Kolben sterilisiert werden.

* Quedlinburger Beiträge zur Züchtungsforschung Nr. 7.

Ein geringes Überlaufen ist ohne Belang. Volumenunterschiede in den Kulturschälchen können durch Glasperlen ausgeglichen werden. Aus der daneben stehenden Petrischale mit dem sterilisierten Filtrierpapier entnimmt man mit einer durch Abflammen steril gemachten Pinzette das Blättchen und legt es vorsichtig auf das gefüllte Schälchen. Wichtig ist, daß Luftblasenbildung vermieden wird, weil an Stellen fehlender Berührung von Papier und Flüssigkeit das Wachstum beeinträchtigt werden würde.

Das Beimpfen kann in der gewohnten Art und Weise vorgenommen werden. Es ist zweckmäßig, vor dem Sterilisieren den Mittelpunkt auf dem Papier zu kennzeichnen, was anfänglich durch leichtes Einritzen mit einem spitzen Gegenstand geschah. Versuche ergaben, daß Striche aus Graphit keine nachteilige Wirkung auf die Entwicklung der untersuchten Pilze hatten; man kann daher die Mitte ohne Bedenken durch einen kleinen Bleistiftkreis von 4 mm Durchmesser markieren.

Für die Untersuchung über die Bildung von Fortpflanzungsorganen unter verschiedenen Ernährungs- und Außenbedingungen sind Agar-, noch mehr Flüssigkeitskulturen ungeeignet, weil man darauf ihre Entstehung nicht laufend verfolgen kann. Die neue Kulturmethode mit dem Filtrierpapier als Trägersubstanz für den Pilz erwies sich als besonders günstig, da ein geeignetes Muster auf dem Filtrierpapierblatt ermöglicht, die Lage eines jeden neu gebildeten Organes einwandfrei zu bestimmen. Das Papier muß natürlich vor dem Sterilisieren mit dem Muster versehen werden. Voraussetzung für solche Untersuchungen ist, daß der betreffende Pilz seine Fortpflanzungsorgane nur auf der Oberfläche des Papiers bildet. Das trifft aber für eine sehr große Zahl von Pilzen, besonders für viele As-

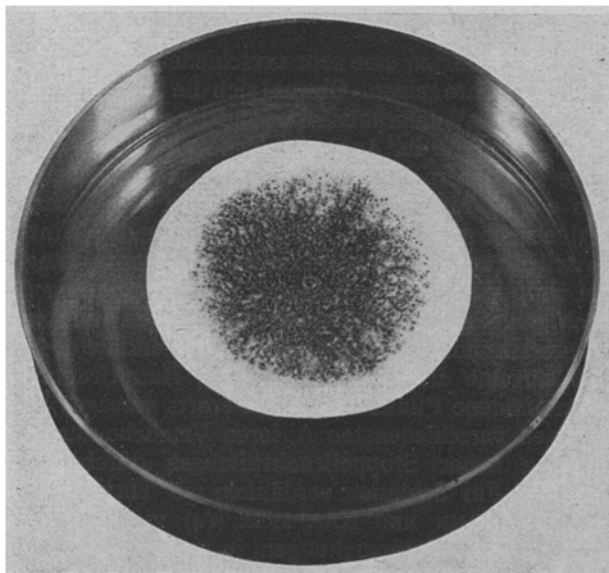


Abb. 2. Aufsicht auf eine geöffnete Kultur von *Stagonospora bujonia* Bresad. mit zahlreichen Pyknidien.

comyceten und Fungi imperfecti zu. Abb. 2 bringt eine gut entwickelte Kultur eines Pilzes mit Pyknidienbildung zur Darstellung.

Bei vielen Pilzen hält die Entwicklung des Myzels auf der Oberfläche des Papiers bei genügendem Nährstoffgehalt des Substrates Schritt mit einer Ausbrei-

tung in der Nährlösung. Abb. 3 bringt ein Beispiel für die Form des Myzels, welches viele Pilze unter der Oberfläche annehmen können. Meist haftet es von der Impfstelle ausgehend dem Filterpapier von unten in Form einer Halbkugel an; erst dann, wenn die Hyphen den Boden der Kulturschale erreicht haben, breitet sich

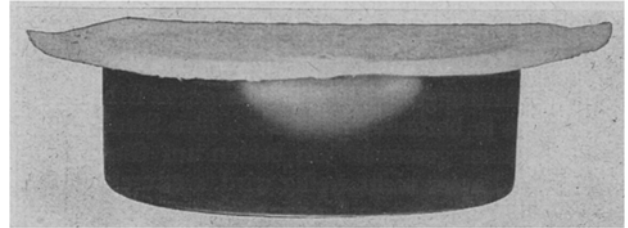


Abb. 3. Seitenansicht der inneren Kulturschale mit Oberflächen- und Submersmyzel.

das Myzel auch seitlich aus. Nimmt man tiefere Kulturschalen, so bestimmt das Oberflächenmyzel für längere Zeit fast immer den Radius des Submersmyzels.

Verunreinigungen durch Fremdinfectionen waren weit seltener zu beobachten als in gleichzeitig angesetzten Agarkulturen. Der Ursache für diese immer wieder beobachtete Tatsache wurde bisher nicht nachgegangen.

Das Binokularmikroskop gestattet eine genauere Betrachtung bei ziemlich starker Vergrößerung; selbst eine Betrachtung unter einem gewöhnlichen Mikroskop ist bei mittlerer Vergrößerung durchaus möglich.

Es ist jedoch in jedem Falle vorzuziehen, eine Beobachtung bei geschlossener Schale vorzunehmen, da ein Öffnen der Schale eine ungünstige Änderung des „Schalenklimas“ zur Folge haben würde. Die bei geöffneter Schale schneller vor sich gehende Verdunstung würde außerdem bald eine Änderung in der Konzentration der Nährlösung nach sich ziehen. Ein Eindellen des Papiers, verbunden mit Luftblasenbildung, würde störend in die Entwicklung eingreifen und zudem die Beobachtung erschweren. Falls der Deckel durch Beschlagen mit Feuchtigkeit eine gute Durchsicht verhindern sollte, läßt sich dieser leicht durch einen anderen sterilen Deckel während der Dauer der Beobachtung ersetzen.

Die Bildung von Fortpflanzungsorganen war in allen untersuchten Fällen bei dieser Kulturmethode lebhafter als bei entsprechenden Agarkulturen. Ob dafür bestimmte Stoffe im Papier oder die Zellulose an sich verantwortlich zu machen sind, ließ sich noch nicht einwandfrei entscheiden; wir haben aber Anhaltspunkte dafür, daß das verwendete Papier eine Rolle spielt.

Das Myzel ist innig mit dem Papier verflochten und haftet aus diesem Grunde sehr fest daran, sodaß es ohne Schwierigkeiten möglich ist, das Myzel verlustlos abzuspielen, zu trocknen und zu wiegen.

Diese Tatsache läßt sich auch sehr gut ausnutzen, um eine Kultur als Ganzes von einer Nährlösung unmittelbar in eine andere Nährlösung zu übertragen, ohne dabei irgend welche Hyphen zu beschädigen oder gar zu verlieren. Diese Umpflanztechnik eröffnet für die Mikrobiologie ganz neue Möglichkeiten.

Ein anderer Vorteil von nicht unerheblicher Bedeutung ist, daß das Filtrierpapierblatt mit Myzel und Fortpflanzungsorganen getrocknet und aufbewahrt

werden kann. Dadurch ist es möglich, jede beliebige Kultur in jedem gewünschten Entwicklungszustand für dauernd aufzuheben, und man ist so in die Lage versetzt, sich von seinen Versuchen ein „natürliches“ Protokoll anzulegen, während bisher sowohl bei Untersuchungen in flüssigen als auf festen Nährmedien die Kulturen in ihrer ursprünglichen Form nach Beendigung eines Versuches für immer verloren waren. Nimmt man das Trocknen mit einiger Sorgfalt vor — es muß verhältnismäßig schnell vor sich gehen —, so behalten die Fortpflanzungsorgane, auf deren guten Erhaltungszustand es ja besonders ankommt, ihre Struktur bei. Das Trocknen geschieht am besten auf Glasplatten, damit das Papier nicht wellig wird, wodurch ein einwandfreies Aufheben in Frage gestellt sein würde. Mit einem geeigneten feinen Messer läßt sich die getrocknete Kultur gut vom Glas ablösen, gegebenenfalls unter geringem Befeuchten mit abermaligem vorsichtigen Trocknen. Diese „lebenden“ Protokolle können in Pergamenttütten geordnet aufbewahrt werden.

Mit Hilfe dieses Verfahrens, die Myzelien zu trocknen, bereitet es auch keine Schwierigkeiten mehr, sich von Vertretern der verschiedensten systematischen Zugehörigkeit ein Herbar aus Reinkulturen anzulegen. Es kommen hierfür vor allem die niederen Pilze, viele

Ascomyceten, die Ustilaginales und die meisten Fungi imperfecti in Frage. Um die Pilze wie Herbarmaterial untersuchen zu können, feuchtet man sie am besten etwas an.

Nicht unerwähnt soll bleiben, daß mit Hilfe dieser Methode unschwer größere Mengen von Sporen z. B. für Infektionsversuche herangezogen werden können, ohne dabei auf Agarkulturen angewiesen zu sein. Die Sporen lassen sich durch Schütteln in einer Flüssigkeit leicht von der Papieroberfläche ablösen. Etwaige Papierreste kann man nachträglich leicht entfernen. Bei geeigneter Verpackung ist es sogar möglich, viele solcher Papiere in nicht allzu feuchtem Zustand übereinander geschichtet zu versenden, damit an einem anderen Orte daraus eine Sporenaufschwemmung bereitet werden kann.

Vielleicht ist es auch möglich, mit Hilfe dieser Methode sterile Gewebekulturen höherer Pflanzen durchzuführen.

Mit der hier beschriebenen Kulturmethode war es möglich, eine Reihe mykologischer Fragen, welche mit den bisherigen Methoden nur sehr schwer oder gar nicht angreifbar waren, zu klären. Über diese Untersuchungen wird in einer Folge von Arbeiten noch berichtet werden.

(Aus dem Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der JUSTUS-LIEBIG-Hochschule in Gießen,
Direktor Professor Dr. E. v. BOGUSLAWSKI.)

Untersuchungen über die Eignung von Neuzüchtungen für den Stoppelfruchtbau.

Von E. v. BOGUSLAWSKI

unter Mitwirkung von A. VÖMEL.

Mit 17 Textabbildungen.

Die Ausweitung der Feldfuttererzeugung auf dem Wege des Zwischenfruchtbaues hängt wesentlich von der noch möglichen Förderung des Stoppelfrucht-futterbaues ab, zumal für den mit größerer Ertrags-sicherheit verbundenen Winterzwischenfruchtbau vor-nehmlich aus Fruchtfolgegründen gewisse Grenzen ge-setzt sind und der Anbau von Untersaaten auf vielen Standorten ebenfalls nur begrenzt möglich ist. Wenn RHEINWALD (12) für einen Teil Ostdeutschlands auf Grund von Untersuchungen in der Praxis zu dem Ergebnis kommt, daß die mit dem Stoppelfruchtbau erzielten Erträge oft überschätzt werden, so können hierfür zahlreiche Ursachen angeführt werden. Neben Fragen der Bodenbearbeitung und der Herstellung des richtigen Saatbettes, wie sie von BÄR (1) ebenso wie von TIEMANN (13) und auch von KÖNEKAMP (8) unter-sucht wurden, kommt der Auswahl der im Einzelfall zweckmäßigsten Pflanzenart bzw. Sorte eine besondere Bedeutung zu. Dem Wesen des Stoppelfruchtbaues entsprechend hängt die Wahl der Pflanzenart stark von der nach der Aberntung einer Hauptfrucht noch zur Verfügung stehenden Vegetationszeit und den son-stigen von ihr hinterlassenen Wachstumsbedingungen ab. So ist es erklärlich, daß Aufgang und Entwick-lung sowie Massenbildung der Stoppelfrüchte erheb-lichen Schwankungen unterliegen und noch mehr als die Hauptfrüchte von der jeweiligen Witterung be-influßt werden. Daher müssen die in Frage kommen-

den Pflanzenarten eine sehr verschiedene Eignung als Stoppelfrüchte zeigen. Obwohl sich die Stoppelfrüchte bezüglich des Wasserhaushaltes und der zeitmäßigen In-anspruchnahme der Anbaufläche besser in die Frucht-folge eingliedern als die Winterzwischenfrüchte, was von uns (2) für die Stoppelfrüchte und von TIEMANN (13) ebenso wie von KÖNEKAMP (8) für die Winter-zwischenfrüchte nachgewiesen werden konnte, hängen die Stoppelfrüchte in Aufgang und Ausnutzung der noch günstigen Spätsommertemperaturen sehr vom Wasserhaushalt des Standortes ab. So erklärt es sich, daß einzelne ursprünglich aus dem Hauptfruchtbau übernommene Pflanzenarten vielerorts versagen, und von den verschiedensten Autoren Versuche zur Ein-führung neuer Stoppelfruchtpflanzen durchgeführt wurden. Für Schlesien verdanken wir TIEMANN (13) sowie TIEMANN und KÄMPFFER (14) vielseitige An-regungen und Untersuchungen, in welchen zahlreiche Variationen von Leguminosengemengen unter Hinzuziehung von Mais, Sonnenblumen, Hirsearten, Lu-pinen, Raps u. a. hervorgehoben und daneben auch Weißer Senf, Ackerspörgel, Buchweizen und *Phacelia* genannt werden. Für Norddeutschland bzw. Schles-wig-Holstein hat KÖHNLEIN (6, 7) zahlreiche und viel-jährige Untersuchungen durchgeführt, nach welchen neben den hier sehr leistungsfähigen Gemengen und den Stoppelfrüchten als frühe Stoppelfrüchte Sommer-raps und *Phacelia* besondere Beachtung verdienen.