

2. Die Korngröße als erbliches Sortenmerkmal dürfte bei den Sorten der Futtergräser vorhanden sein. Ein exakter Nachweis wird jedoch durch die Wirkung der Umwelteinflüsse erschwert.

3. Die durch die Züchtung erstellten spätblühenden, blattreichen Sorten des Weidetyps zeigen ein geringeres absolutes Gewicht als die frühblühenden Sorten des Heutyps. Dieses Ergebnis konnte bei *Phleum pratense*, *Dactylis glomerata* und *Lolium perenne* erzielt werden.

4. Im Hinblick auf die wertvollen blattreichen Typen ist es bei Angaben über die Höhe des Tausendkorgewichtes erforderlich, die Variationsbreite von Heu- und Weidetypen zu berücksichtigen. Als Maßzahl für die Bestimmung der Aussaatmenge kann nicht der Mittelwert des absoluten Gewichtes einer Art gelten. Vielmehr ist die dem Heu- bzw. Weidetyp entsprechende Variationsbreite in Rechnung zu stellen.

5. Das Tausendkorgewicht als Sortenmerkmal ist in der Samenkontrolle zwecks Sortenkennzeichnung nur bei den extremen Typen zu verwenden, da die Schwankungen, verursacht durch Umwelteinflüsse, zu groß sind.

#### Literatur.

1. ARMSTRONG, S. F.: zitiert nach J. CAPUTA (2). — 2. CAPUTA, J.: Untersuchungen über die Entwicklung einiger Gräser- und Kleearten in Reinsaat und Mischung. Ein Beitrag zur Konkurrenz- und Saatmengenfrage. Dissertation, Bern 1948. — 3. DERMANIS, P.: Versuche über die Düngung von Wiesenschwingel zur Samengewinnung. Pflanzenbau 15, 117. (1939). —

4. EGGEGBRECHT, H.: Untersuchung von Saatgut, Methodenbuch Bd. V. Neumann-Neudamm, 1949. —
5. EVANS: zitiert nach ZEIHER (23). — 6. FISCHER, W.: Samengewinnung und Saatgutbereitung bei den wichtigsten Klee- und Grasarten. Berlin 1928. — 7. GERDES, G.: Die Phenolprobe, auch bei Futtergräsern ein Mittel zur Sortenunterscheidung? Dissertation, Leipzig 1952. — 8. HALL, M.: Five hundred varieties of herbage and fodder plants. Bulletin 39, 1948. Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops Aberystwyth. — 9. HARZ, C. O.: Landwirtschaftliche Samenkunde. Berlin 1885. — 10. HEERMANN, W.: Untersuchungen über die Vermischung handelsüblicher Wiesenlieschgrassaat (Timothe) mit Unkrautlieschgras (Unkrauttimote). Pflanzenbau 9, 385. (1932/33). — 11. HEINISCH, O.: Das landwirtschaftliche Saatgut. Berlin 1950. — 12. KLAPP, E.: Futterbau und Grünlandnutzung. 5. Aufl. Berlin 1951. — 13. MAHLA, J.: Ist das Tausendkorgewicht ein wesentliches Beurteilungsmoment für Saatgut? Saatgutwirtschaft 2, 246. (1950). — 14. MANSFELD, R.: Verzeichnis der Farn- und Blütenpflanzen. Jena 1940. — 15. NÁDVORNÍK, J.: Les grânes des graminées fourragères et son influence sur la germination et le développement de la plantule en germination. Bulletin de l'École Supérieure d'Agronomie. Brno 1927. — 16. NOBRE, F.: Handbuch der Samenkunde. Berlin 1876. — 17. PETERSEN, A.: Die Gräser als Kulturpflanzen und Unkräuter auf Wiese, Weide und Acker. Berlin 1949. — 18. PIEPER, H.: Das Saatgut. 2. Aufl. Berlin 1952. — 19. SETTEGAST: Die landwirtschaftlichen Sämereien und der Samenbau. Leipzig 1892. — 20. STEBLER, G. und VOLKART, A.: Die besten Futterpflanzen. Bern, Bd. 1, (1913), Bd. 2, (1908). — 21. WITTMACK, L.: Landwirtschaftliche Samenkunde. Berlin 1922. — 22. ZADE, A.: Pflanzenbau für Landwirte. Berlin 1933. — 23. ZEIHER, E.: Untersuchungen über die Möglichkeit der Unterscheidung der Spelzfrüchte von *Phleum pratense* L. und *Phleum nodosum* L. Pflanzenbau 15, 161. (1938/39).

(Aus dem Institut für Agrobiologie der Universität Greifswald.)

## Beiträge zur Eigenschaftsanalyse der Anfälligkeit von *Papaver somniferum* gegen *Helminthosporium papaveris*.

### 3. Mitteilung.

Von GERHARD GRÜMMER.

Mit 10 Textabbildungen.

Frühere Untersuchungen über *Helminthosporium papaveris*, den Erreger der parasitären Blattdürre des Mohns, hatten ergeben, daß der Pilz ein Phytotoxin bildet. Dieses ist in der Lage, an Blättern von Mohn, Tomaten und anderen Pflanzen Erschlaffen oder Nekrosen hervorzurufen. Die Wirksamkeit des Toxins erwies sich als abhängig vom physiologischen Zustand der betreffenden Pflanzenteile. Es konnte gezeigt werden, daß in chlorotischen Geweben das Toxin stärker wirksam ist als in frischgrünen Blättern. Weiterhin wurde die Möglichkeit diskutiert, daß die verschiedenen starke Wirkung des Toxins auf chlorotische und frischgrüne Gewebe auf einem Wechsel der Aktivität des Toxins beruht, wobei möglicherweise die stärkere Reduktionskraft in chlorotischen Blättern im Sinne einer Aktivierung des Toxins wirkt, während in grünen Blättern der überwiegende Teil des Toxins in inaktiver, oxydierter Form vorliegen soll.

Inzwischen ist es gelungen, die fraglichen Substanzen im Kulturfiltrat von *Helminthosporium papaveris* von den Begleitstoffen weitgehend zu trennen und über ihre Aktivität gegenüber pflanzlichen Geweben und den Aktivitätswechsel, wie er oben skizziert worden ist, weitere Aufschlüsse zu erhalten. Die hierbei angewendeten Methoden sowie die gewonnenen Ergebnisse

bilden den Inhalt der vorliegenden Arbeit und sollen zur Ergänzung der ersten Mitteilung dieser Veröffentlichungsreihe und zur Unterstützung der dort gezogenen Schlußfolgerungen dienen.

### I. Methodik.

Die Erforschung der Phytotoxine (= Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, die gegen höhere Pflanzen schädigend wirken) ist in den letzten Jahren insbesondere durch Arbeiten von GÄUMANN und Mitarbeitern über Welketoxine (Marasmine) gefördert worden. Hierbei ist vor allem das Lycomarasin bearbeitet worden, das von *Fusarium lycopersici*, dem Erreger der Tomatenwelke, gebildet wird. Für die Arbeiten mit Lycomarasin und anderen Phytotoxinen ist von GÄUMANN, NAEPH-ROTH und MIESCHER (1950) eine besondere Testmethode ausgearbeitet worden, die es gestattet, in Kulturfiltraten und Lösungen mit unbekannter Toxin-Konzentration die Menge der wirksamen Substanz zu bestimmen. Hierzu werden Blätter von Tomaten verwendet, die man in die zu untersuchende Lösung einstellt. Nach einigen Tagen kann der Grad des Erschlaffens der Tomatenblätter und der Umfang der auf den Blättern gebildeten Fleckennekrosen festgestellt und an Hand eines Bewertungsschemas auf den Toxingehalt der betreffenden Lösung geschlossen werden.

Um zuverlässige Werte zu erhalten und allzugroße Streuungen auszuschließen, müssen die verwendeten Blätter physiologisch sehr gleichartig sein. Das setzt voraus, daß die Blätter gleich groß sind, von Pflanzen gleichen

Alters genommen werden und daß die Pflanzen unter sehr gleichmäßigen Bedingungen aufwachsen. Die Methode liefert bei genügender Anzahl von Parallelversuchen zuverlässige Resultate; doch ist der Aufwand an Mitteln und an Pflanzenmaterial erheblich, wenn das ganze Jahr hindurch Testblätter zur Verfügung stehen sollen, und größere Mengen von Welkstofflösung (100 ml für eine Verdünnungsreihe mit 10 Blättern für jede Stufe) werden für jede Versuchsserie gebraucht.

Um mit geringerem Aufwand arbeiten zu können, ist wiederholt versucht worden, einfache Methoden zur Testung der Phytotoxine heranzuziehen. Leider haben die Methoden der Antibioseforschung, die gut durchgearbeitet sind und leicht mit wenig Material große Testserien durchzuführen gestatten, bei der Erforschung der Phytoxine keine Bedeutung erlangen können. GÄUMANN, NAEHR-ROTH und MIESCHER (1950) beklagten sich darüber daß es ihnen trotz umfangreicher Versuche nicht gelang, Bakterien oder Pilze zu finden, die von *Lycomarasmin* deutlich gehemmt wurden. Auch KOBEL (1951), der die Toxine von *Nectria cinnabarinus* untersuchte, fand in Versuchen mit 16 Bakterienstämmen keine nennenswerten Hemmungen.

Meine entsprechenden Versuche, für das von *H. papaveris* gebildete Toxin einen geeigneten Testmikroorganismus zu finden, sind ebenfalls negativ verlaufen. Bei Prüfung von mehr als 50 Bakterienstämmen fanden sich zwar einige, die Hemmungen zeigten, doch reichte die Stärke der Toxinwirkung nicht aus, um für Testzwecke Bedeutung zu erlangen. Ähnliche Versuche mit Pilzen ergaben ebenfalls keine befriedigenden Resultate.

Die Mehrzahl der Phytotoxine (Definition s. o.) wirkt offenbar nicht oder nur wenig antibiotisch, während andererseits eine ganze Anzahl von hochwirksamen Antibiotika von der höheren Pflanze ohne wesentliche Schädigung aufgenommen werden. (Ausnahme: Patulin!) Wie weit dieser Unterschied auf einer verschiedenartigen Wirkungsweise dieser beiden Stoffklassen beruht, läßt sich im Augenblick noch nicht übersehen.

In letzter Zeit sind neue Testmethoden für Phytotoxine vorgeschlagen worden. KOBEL (1951) bestimmte die Wirksamkeit der Welkstoffe von *Nectria cinnabarinus* zunächst an Johannisbeerblättern, wobei jedoch erhebliche Schwankungen der Ergebnisse auftraten und große Mengen an Kulturfiltrat verbraucht wurden. Die Verwendung der durch die gleichen Stoffe hervorgerufenen Wachstums-hemmung von *Pythium de Baryanum* als Testmethode hatte den Nachteil, daß die Ablesung der Ergebnisse erst nach 7 Tagen erfolgen konnte. Geringere Streuungen erzielte KOBEL dagegen mit einer Methode, bei der die Keimung der Sporen von *Ustilago zea*, dem Erreger des Maisbrandes, durch Verdünnungsstufen des Kulturfiltrates gehemmt wurde. Die Ablesung der Ergebnisse war bereits nach 15 Stunden möglich. Als Einheit der Toxinimme wurde diejenige Konzentration definiert, bei der die Zahl der gekeimten Sporen auf die Hälfte herabgesetzt war. Durch Anwendung des Probit-Verfahrens bei der Auswertung (FINNEY 1947) konnte die Streuung der Werte recht gering gehalten werden. KOBEL wies jedoch selbst auf einen prinzipiellen Mangel seiner Methode hin: Es war bei seinen Versuchen nicht sicher, ob der Stoff, der auf die Pilzsporen wirkte, identisch mit dem gesuchten Welkstoff war. Daher mußten bei seinen Arbeiten von Zeit zu Zeit Welkteste mit Johannisbeerblättern eingeschaltet werden.

Im folgenden soll eine weitere Testmethode beschrieben werden, die sich bei meinen Untersuchungen bewährt hat und bei der die höhere Pflanze selbst als Versuchsobjekt verwendet wird.

Bei Versuchen über die Wirkung des *Helminthosporium*-Toxins auf Keimpflanzen des Mohns konnte festgestellt werden, daß bereits die Keimung durch das Toxin beträchtlich gehemmt werden kann. Das soll zunächst am folgenden Beispiel erläutert werden:

4 × 100 Mohnsamen werden für 24 Stunden in einem Kulturfiltrat eingekauft, das auf folgende Weise gewonnen wurde: Czapek-Dox Nährösung (nach JANKE 1946) mit nur einem Viertel der üblichen Salzkonzentration und 3% Traubenzucker wurde mit Konidien von *Helminthosporium papaveris* reichlich beimpft und bei 26° bebrütet. Da dieser Pilz in Nährösungen ohne Wirkstoffzusatz nur langsam zu wachsen vermögt, war erst nach etwa 10 Wochen polarimetrisch kein Zucker mehr in der Nährösung festzustellen. Die Nährösung wurde dann steril abfiltriert (pH 7,20—7,40) und für die folgenden Versuche verwendet.

Die Mohnsamen (Mahndorfer Schließmohn mit ca. 96% Keimfähigkeit von ausgesuchten, pilzfreien Kapseln) wurden 24 Stunden lang in wenigen ml des Kulturfiltrates eingekauft und nach Abspülen in Wasser auf Filterpapier (Schleicher & Schüll Nr. 595) zur Keimung ausgelegt. Abstände 5 mm. Versuchsanordnung siehe Abb. 1. Kontrolle: 400 Samen in Leitungswasser (pH 7,0—7,1). Durch Vorversuche war festgestellt worden, daß die Keimfähigkeit und Keimungsgeschwindigkeit durch die in der Nährösung enthaltenen Salze und durch die Glukose bei der oben angegebenen Konzentration gegenüber Leitungswasser nicht beeinflußt wurde. Höhere Salzkonzentrationen konnten jedoch bereits eine geringe Hemmung erzeugen; daher war, wie oben angegeben, die Salzkonzentration der Nährösungen auf  $\frac{1}{4}$  des normalen Ansatzes herabgesetzt worden. Die Ausbeute an Myzel in den Kulturen wurde jedoch dadurch nicht in merklicher Weise beeinflußt.

Alle 24 Stunden wurde die Zahl der gekeimten Samen ermittelt. Als Keimung wurde wie üblich der

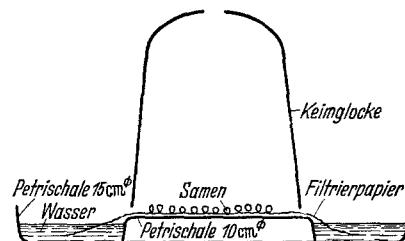


Abb. 1. Versuchsanordnung für die Keimversuche. Weitere Erklärungen im Text.

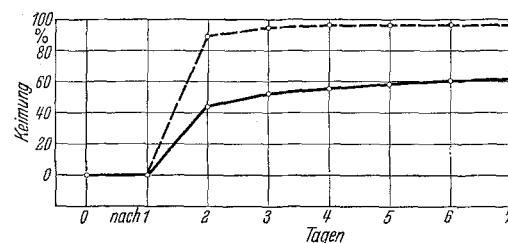


Abb. 2. Keimung von Mohnsamen in Toxinlösung (ausgezogene Kurve) und in Leitungswasser (gestrichelte Kurve). Die Standardabweichung  $\sigma$  ist bei den letzten Werten als senkrechter Balken eingetragen.

Austritt der Radicula gewertet. Die gekeimten Samen wurden jeweils entfernt. Die Ergebnisse des Versuches zeigt Abb. 2.

Wie aus der Kurve hervorgeht, war die Keimung des Mohns durch die Toxinwirkung deutlich verzögert, die Keimprozente waren herabgesetzt.

Schon vor Beginn der Keimung ließ sich die Wirksamkeit des Toxins daran erkennen, daß die Volumenzunahme der in Toxin quellenden Samen beträchtlich langsamer erfolgte als bei den Kontrollen. Diese Beobachtung konnte im folgenden Versuch durch gravimetrische Bestimmung des Quellungsverlaufes bestätigt werden. Das Einquellen der Samen erfolgte hierbei in

einer Toxinlösung mit einem Gehalt von 400 mg Toxin pro Liter in 0,1 mol Phosphatpuffer (pH 6,5). Kontrollen in der gleichen Pufferlösung ohne Toxin. In bestimmten Abständen wurden die Samen aus den Lösungen herausgenommen, oberflächlich sorgfältig mit gut sagendem Filterpapier abgetrocknet, schnell gewogen und in die Flüssigkeit zurückgebracht. Die Gewichtszunahmen von 200 Samen in Toxin und 200 Samen in reinem Puffer zeigt Abb. 3.

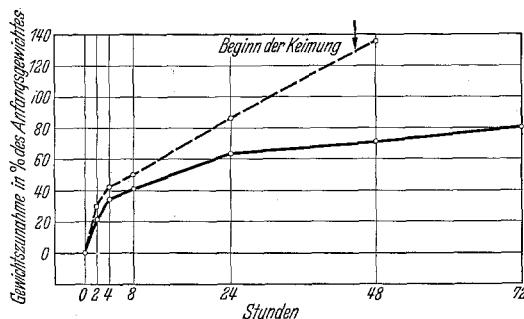


Abb. 3. Gewichtszunahme von Mohnsamen, die in Toxinlösung quellen (ausgezogene Kurve). Kontrollen: Quellung in Phosphatpuffer (gestrichelte Kurve).

Bei  $26^\circ \pm 0,2^\circ$  im Dunkeln. Mittelwerte aus 4 Parallelversuchen.

Genauer als durch die Keimungsrate von Mohnsamen ließ sich die Stärke der Toxinwirkung erfassen, wenn man außer der Beeinflussung der Keimzahlen auch die Längen der gebildeten Keimwurzeln berücksichtigte. Diese Methode wurde in den folgenden Versuchen immer angewendet und soll zunächst an einem Beispiel beschrieben werden, das gleichzeitig über die Genauigkeit der Methode Aufschluß gibt.

Ein beliebiges Kulturfiltrat (pH 7,38) von *H. papaveris* wurde mit 0,01 mol Phosphatpuffer (pH 7,50) verdünnt. Die hergestellten Lösungen enthielten die Toxinmengen  $1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16$ , die Kontrolle bestand aus reiner Pufferlösung. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 15 ml Lösung hergestellt, wozu insgesamt 30 ml der Ausgangslösung erforderlich waren. Dann wurden in Petrischalen von 6 cm Ø 50 Mohnsamen eingezählt und mit jeweils 1,5 ml einer der Lösungen benetzt. Die Schalen wurden bei völliger Dunkelheit in einem Brutschrank bei  $24^\circ$  aufbewahrt. Nach 48 Stunden konnte das Ergebnis abgelesen werden. Die Länge aller Keimwurzeln wurde gemessen, wobei

jeder Einzelwert auf ganze mm aufgerundet wurde. Die Messung ließ sich leicht und schnell durchführen, wenn die Schalen auf eine schwarze Unterlage gestellt wurden, auf die ein schmaler Streifen Millimeter-Papier geklebt war. Der Austritt der Radicula aus der dunklen Samenschale ließ sich in jedem Falle deutlich erkennen. Hypokotyle der Keimlinge, die nur in einzelnen Fällen nach 48 Stunden bereits sichtbar waren, (Abb. 5c), wurden nicht mit in die Längenmessung einbezogen. Die Messung der Wurzellängen konnte auch zu einem späteren Zeitpunkt vorgenommen werden, doch bot eine Verlängerung der Versuchsdauer gegenüber der Ablesung nach 48 Stunden keinerlei Vorteile.

Abb. 4 zeigt das Ergebnis der 10 parallelen Versuchsreihen. Bei den Stufen, die größere Mengen Toxin enthalten, war die Länge der Wurzeln nach 48 Stunden deutlich vermindert (Abb. 5a). Als „Toxineinheit“ soll im folgenden die Konzentration an Toxin gelten, die in der Lage ist, die Gesamtlänge der 50 Wurzeln gegenüber den Kontrollen um 50% herabzusetzen. Wie aus dem Kurvenbild Nr. 4 abgelesen werden kann, ist dies im eben beschriebenen Beispiel im Mittel aller 10 Versuche bei einer Verdünnung der Ausgangslösung von 1:2,3 der Fall. Demnach enthält die Ausgangslösung 2,3 wirksame Toxineinheiten.

Die Kurven geben gleichzeitig auch einen Überblick über die Streubreite der Methode. Unter den einzelnen Kurvenpunkten sind die zahlenmäßigen Angaben der Mittelwerte  $\bar{M}$ , der Standardabweichungen  $\sigma$ , der mittleren Fehler der Mittelwerte  $m$  und der Variabilitätskoeffizienten  $V$  aufgeführt.

Bestimmt man in Abb. 4 die Zahl der wirksamen Toxineinheiten der Lösung getrennt aus jeder einzelnen Versuchsserie (bezogen auf die jeweilige Kontrolle), so erhält man folgende Werte:

1,92	2,45
1,95	2,70
2,0	2,95
2,15	3,0
2,30	3,05

$M = 2,45$   
Toxineinheiten.

Wie aus diesen Zahlen ersichtlich ist, schwanken die Einzelergebnisse beträchtlich. Eine einzige Meßserie gestaltet es höchstens, die Konzentration  $x$  von der Konzentration  $2x$  zu unterscheiden. Bei dem geringen

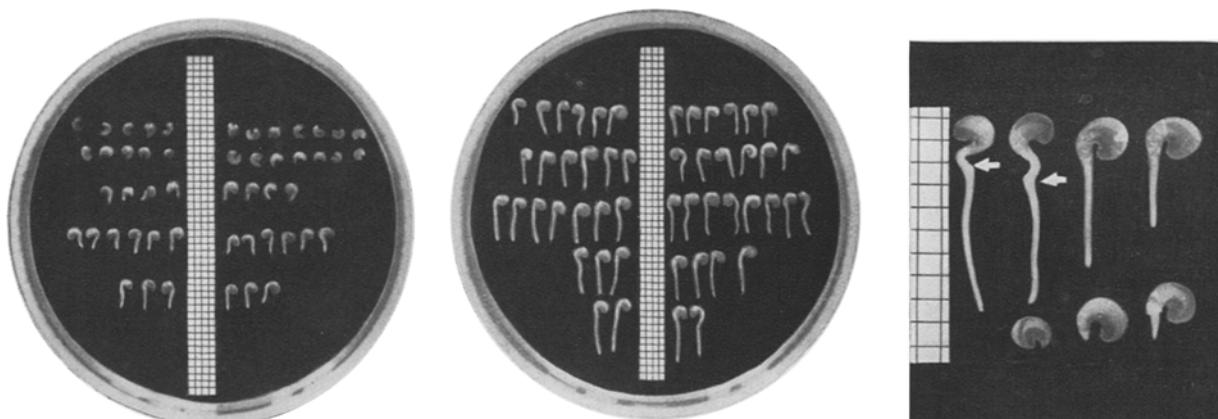


Abb. 5. Mohnwurzeltest nach 48 Stunden.

a) Petrischale mit 50 Mohnsamen nach starker Toxinwirkung. (Samen nachträglich geordnet.)  
1. und 2. Reihe: Samen nicht gekeimt.  
3. Reihe: Wurzeln 1 mm lang.  
4. Reihe: Wurzeln 2 mm lang.  
5. Reihe: Wurzeln 3 mm lang.  
Gesamtlänge der 50 Wurzeln: 50 mm.

b) Kontrollschele mit 50 Mohnsamen.  
1. Reihe: Wurzeln 3 mm lang.  
2. Reihe: Wurzeln 4 mm lang.  
3. Reihe: Wurzeln 5 mm lang.  
4. Reihe: Wurzeln 6 mm lang.  
5. Reihe: Wurzeln 7 mm lang.  
Gesamtlänge der 50 Wurzeln: 229 mm.

c) Mohnsamen mit verschiedenen Wurzellängen bei Lupenvergrößerung. Links Millimeterpapierstreifen. Die Pfeile zeigen auf die Grenze zwischen Keimwurzel und Hypokotyl.

Verbrauch an Toxinlösung (3 ml für jede vollständige Meßreihe!) ist es jedoch möglich, je nach der erforderlichen Genauigkeit eine größere Anzahl von Parallelversuchen anzusetzen und Mittel aus den gemessenen Werten zu bilden.

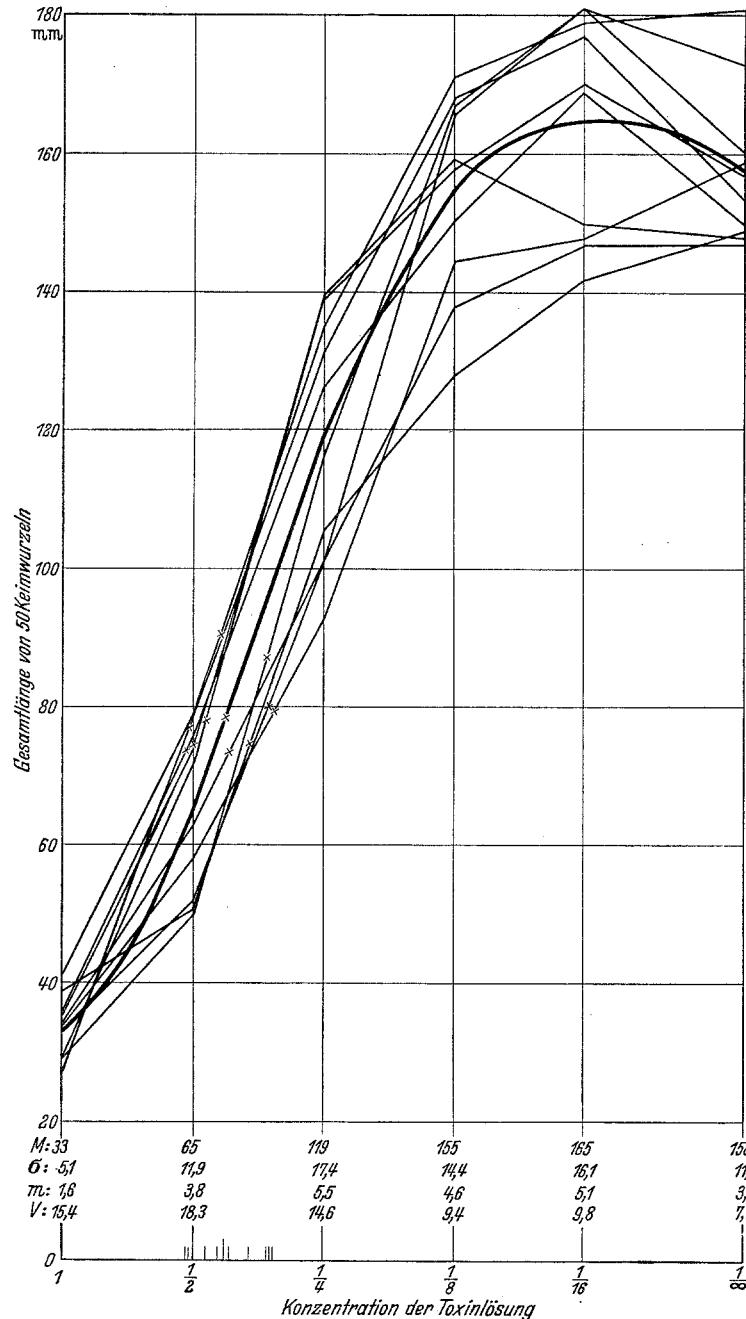


Abb. 4. Gesamtlänge der Keimwurzeln von 50 Mohnsamen bei Keimung in Lösungen verschiedener Toxin-Konzentration. 10 Parallelen. Die stark ausgezogene Linie stellt den Mittelwert der 10 Messungen dar. Mit waagerechten Strichen sind an den Kurven die Punkte markiert, bei denen die Länge der Wurzeln gegenüber den Kontrollen durchschnittlich auf die Hälfte herabgesetzt ist. Die Loten dieser Punkte auf der Abszisse gestatten die Ermittlung der in der Ausgangslösung enthaltenen Toxineinheiten (s. Text).

Für orientierende Bestimmungen während der Aufarbeitung der Kulturfiltrate (siehe Abschnitt II) genügten im allgemeinen 2 parallele Reihen. Mittel aus 5 oder 10 Serien lieferten schon zuverlässige und gut reproduzierbare Ergebnisse.

Da das *Helminthosporium*-Toxin auch gegen Blätter von Tomaten und anderen Pflanzen wirksam ist, (GRÜMMER 1951, Seite 314), konnte in gelegentlichen Vergleichsversuchen festgestellt werden, daß die Wirksamkeit der Fraktionen auf Blätter höherer Pflanzen und auf Mohnsamen parallel liefen.

Es soll nicht versäumt werden darauf hinzuweisen, daß bei Versuchen über die Geschwindigkeit des Wurzelwachstums mit gewissen Schwankungen gerechnet werden muß, die nicht durch die Versuchsanstellung bedingt sind. NIEMANN (1952) konnte am Beispiel der Kresse zeigen, daß meteorologische Faktoren auch die Geschwindigkeit

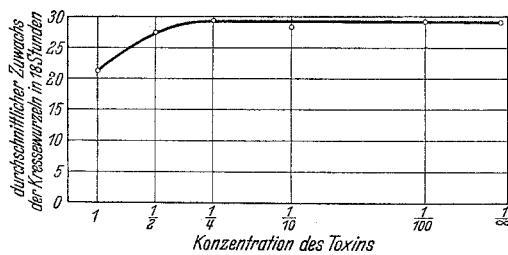


Abb. 6. Wachstum von Kressewurzeln in Lösungen von *Helminthosporium*-Toxin. Konzentration 1: = 200 mg gereinigtes Toxin je Liter 0,01 mol Phosphatpuffer (pH 6,50) Versuchsbedingungen und Auswertung nach MOEWUS (1948). Mittel aus 20 Werten.

des Wurzelwachstums beeinflussen können. Außerdem hat BÜNNING (1948) darauf aufmerksam gemacht, daß bei *P. somniferum* eine vom Alter der Samen abhängige Änderung der Quellgeschwindigkeit auftreten kann. Insbesondere in den Monaten Dezember bis Februar erreichte die Quellgeschwindigkeit ein Minimum. Ob zwischen diesen beiden Befunden eine Beziehung besteht, soll hier nicht weiter diskutiert werden. Da bei der oben angegebenen Testmethode das Ergebnis auf die gleichzeitig angesetzten Kontrollen bezogen wird, können die Werte von diesen störenden Faktoren nicht in entscheidender Weise beeinflußt werden.

Der Mohnwurzeltest weist manche Ähnlichkeit mit dem Kressewurzeltest (MOEWUS 1948) auf, der ebenfalls für die Bestimmung hemmend wirkender Substanzen geeignet ist. Für den Zweck der vorliegenden Arbeit bot jedoch der Mohntest wesentliche Vorteile. Die Auswertung größerer Zahlenmaterials ging schneller, weil die Samen zur Längenbestimmung der Keimwurzeln nicht aus den Schalen herausgenommen zu werden brauchten. Arbeiten bei rotem Licht war nicht erforderlich. Die Empfindlichkeit der Kressewurzeln für das *Helminthosporium*-Toxin war außerdem nur gering, wie aus Abb. 6 entnommen werden kann.

## II. Die Aufarbeitung der Kulturfiltrate.

Mit Hilfe der eben beschriebenen Testmethode war es möglich, Schritte zur Gewinnung des Toxins aus den Kulturfiltraten zu unternehmen. Zur Orientierung über die Möglichkeiten der Reinigung wurden zunächst jeweils 15 ml Kulturfiltrat mit 10 ml eines organischen Lösungsmittels extrahiert, im Scheidetrichter getrennt und der Extrakt nach dem Verdampfen des Lösungsmittels (bei 40–45°) in 2 ml Leitungswasser aufgenommen. Kontrolle: Rückstand von 10 ml Lösungsmittel in 2 ml Leitungswasser aufgenommen. Als Extraktionsmittel wurden verwendet: Äther, Essigsäureäthylester, Chloroform, Isobutylalkohol, Benzol.

Die stärksten Hemmungen des Wurzelwachstums wurden mit den Extrakten von Essigester und Äther erzielt. Außerdem konnte festgestellt werden, daß schwaches Ansäuern der wäßrigen Phase den Übergang des Toxins in das organische Lösungsmittel beträchtlich begünstigte. Zu größeren Extraktionsversuchen wurde daher das Kulturfiltrat mit Phosphorsäure auf ca. pH 3 angesäuert. Zur leichteren Trennung vom Extraktionsmittel wurde die wäßrige Phase mit Kochsalz gesättigt.

Größere Extraktionen wurden in einem Perforator mit 1,2 Liter Fassungsvermögen mit Essigester als Extraktionsmittel durchgeführt. Schon kurze Zeit nach Beginn der Perforation begann die organische Phase die gelblich-braune Farbe des Kulturfilters anzunehmen. Nach 8 Stunden wurde die Perforation unterbrochen und das extrahierte Toxin durch Abdampfen des Lösungsmittels gewonnen. Die Perforation wurde an den folgenden Tagen in gleicher Weise fortgesetzt. Über die Ausbeute gibt folgende Zusammenstellung Aufschluß:

Ausbeute am 1. Tag	104,0 mg
, , 2. "	82,2 "
, , 3. "	52,6 "
, , 4. "	24,6 "
, , 5. "	14,3 "
,, insgesamt	277,7 mg

Die Farbintensität des extrahierten Kulturfilters nahm ständig ab. Länger als 5 Tage zu extrahieren lohnte nicht, weil die Ausbeuten dann verschwindend gering wurden.

Der gewonnene Rückstand, das Rohtoxin, hatte in trockenem Zustand eine braune Farbe. Er war im Wasser nur wenig löslich. Von dem Ester, der sich unter den angegebenen Bedingungen etwas spaltete, haftete dem Toxin noch ein leichter Geruch von Essigsäure an. Zur weiteren Reinigung wurde das wenig lösliche Toxin zunächst durch längeres Schütteln in wenigen ml kalten Wassers von allen leicht löslichen Verunreinigungen befreit. Dann wurde das Toxin getrocknet, gewogen und in heißem Wasser oder heißem Phosphatpuffer gelöst.

Dieser durch die Extraktion mit Essigester gewonnene Rückstand enthielt den überwiegenden Teil der toxischen Wirksamkeit des Kulturfilters. Es darf daher angenommen werden, daß vor allem der extrahierte Farbstoff die toxisch wirksame Verbindung des Kulturfilters ist.

Daneben existiert im Kulturfiltrat von *H. papaveris* noch eine zweite Verbindung, die gegen Mohnsamen und gegen Tomatenblätter als Toxin wirksam ist. Bei den Vorversuchen war festgestellt worden, daß die mit Äther gewonnenen Extrakte zwar farblos blieben, aber trotzdem toxische Wirksamkeit zeigten. Dieser farblose Stoff konnte auf folgende Weise gewonnen werden: 1 Liter Kulturfiltrat wurde mit 150 ml Äther 30 Minuten lang kräftig ausgeschüttelt. Nach Trennung der Phasen blieb beim Verdampfen des Äthers ein farbloser Rückstand von 25,5 mg, der leicht in Wasser löslich war. Er war auch in der Lage, an Tomatenblättern Erschlaffen und Nekrosen hervorzurufen. Seine Wirksamkeit konnte ebenfalls im Mohnwurzeltest ermittelt werden. Ein nochmaliges Aus-

unter anderem auch das Wachstum von Kressewurzeln beträchtlich hemmen. Es besteht die Möglichkeit, daß es sich um ein unspezifisches Stoffwechselprodukt (organische Säure?) handelt.

### III. Aktivitätswechsel des Toxins.

Beim Ansäuern des Kulturfilters mit Phosphorsäure vor der Perforation war aufgefallen, daß im Bereich zwischen pH 7 und pH 5 ein Farbumschlag von gelbgrün nach blauviolett erfolgte. Um diesen Farbumschlag genauer verfolgen zu können, wurde die Änderung der Färbung in Abhängigkeit von der cH kolorimetrisch verfolgt.

Jeweils 3 ml Toxinlösung wurden mit 1 ml eines 0,1 mol Phosphatpuffer gemischt (in neutralem bis schwach saurem Bereich  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  — Puffer, in stärkerem Bereich Gemische von 0,1 mol  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Gemessen wurden die Aziditäten dieser Gemische mit der Chinhydronelektrode, wobei sich die gemessenen Werte zwischen pH 1,90 und pH 8,95 bewegten. (Der extremste Puffer — pH 8,95 — wurde durch einen geringen Zusatz verdünnter Natronlauge hergestellt; die Messung mit der Chinhydronelektrode war hier — an der Grenze ihres Anwendungsbereiches — etwas unsicher.)

Die Extinktionen der Lösungen wurden mit dem Pulfrich-Stufenphotometer (Schichtstärke der Lösungen 1 cm) bei Filter S 12 (Filterschwerpunkt 6270 Å) bestimmt. Die Extinktionen lagen zwischen 0,09 und 0,63. Die Abhängigkeit der Farbintensität der Lösungen von der Azidität kann aus Abb. 8 entnommen werden. Die stärkste Farbänderung lag im Bereich zwischen pH 5 und pH 7.

Es muß hierbei noch betont werden, daß der Übergang des gelben Farbstoffes in den farblosen Körper reversibel war; die durch Ansäuern fast farblos gewordene Lösung konnte jederzeit durch Zusatz von Basen wieder ihre Ausgangsfarbe annehmen. Der reversible Übergang von der Leukoform des Systems zum gelben Körper konnte in dieser Weise beliebig oft wiederholt werden. Eine Änderung der Farbintensität ließ sich in gleicher Weise auch durch Oxydations- und Reduktionsmittel erzielen. Zusatz von Reduktionsmitteln, z. B.  $\text{H}_2\text{S}$ , entfärbte die Lösung, während sie bei Zusatz von Oxydationsmitteln, z. B.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , eine gelb-braune Färbung annahm. Dieser durch Oxydation bzw. Reduktion erzielbare Farbumschlag erwies sich ebenfalls als reversibel.

Es blieb weiterhin die wichtige Frage zu untersuchen, ob mit der Farbänderung des Systems, die offenbar auf einer Änderung der Konstitution des Farbstoffmoleküls beruht, auch eine Aktivitätsänderung des Toxins verbunden war.

Hierbei ist vorauszuschicken, daß die Anwendung des Mohnwurzeltests in weiten Grenzen von der Azidität fast unabhängig ist. Die Keimung des Mohns und das erste Wachstum der Keimwurzeln verläuft bei geringen Pufferkonzentrationen im gesamten Aziditätsbereich zwischen pH 4 und pH 8 fast gleichmäßig schnell (vgl. Abb. 10). Dadurch wird es möglich, den Test durch Zusatz von verschiedenen Puffern bei jeweils der gleichen Konzentration an Gesamt-Toxin, jedoch verschiedenen Anteilen an farbloser und gelber Phase durchzuführen. Hierzu wurde folgende Versuchsreihe angesetzt:

Von der oben angegebenen Lösung, an der die photometrischen Messungen gemacht worden waren, wurde

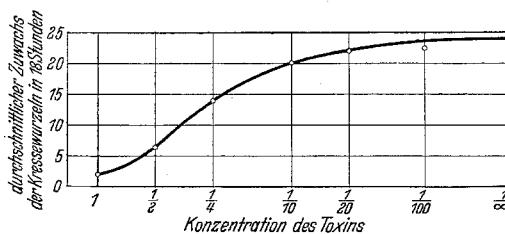


Abb. 7. Wachstum von Kressewurzeln in wässriger Lösung des ätherextrahierbaren Begleitstoffes. Ausgangskonzentration 0,4 g/Liter. Lösungs- und Verdünnungsmittel: Aqua bidest. Versuchsbedingungen, -dauer und Auswertung nach MOEWUS (1948). Mittel aus 20 Einzelwerten.

schütteln des Kulturfilters brachte nur noch verschwindend geringe Ausbeuten, weil fast der gesamte Stoff bei der ersten Extraktion in die organische Phase übergegangen war. Diese ätherlösliche, toxische Verbindung besaß jedoch nur untergeordnete Bedeutung; ihr Anteil an der toxischen Wirksamkeit des Kulturfilters betrug etwa 10%. Wie Abb. 7 zeigt, konnte diese Verbindung

eine Verdünnungsreihe mit 0,01 mol Phosphatpuffern hergestellt, wobei die Konzentration der Ausgangslösung  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$ ,  $\frac{1}{16}$ ,  $\frac{1}{32}$  und 0 betrug. Zur Herstellung der Verdünnungsreihen wurden herangezogen:

Phosphatpuffer pH 7,50	pH 5,55
pH 6,59	pH 5,31
pH 6,35	pH 4,15

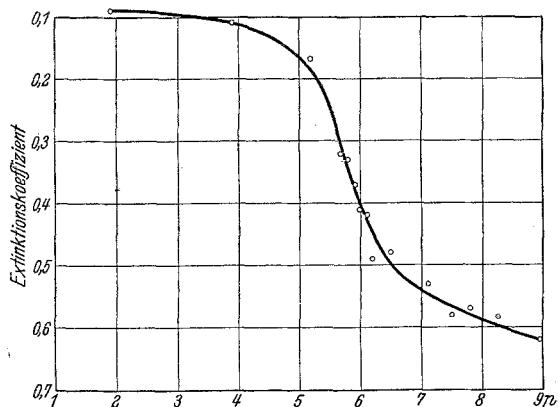


Abb. 8. Abhängigkeit der Farbe einer Toxinlösung von der Azidität.  
Abszisse: Wasserstoffionenkonzentration. Ordinate: Extinktion der Lösung.

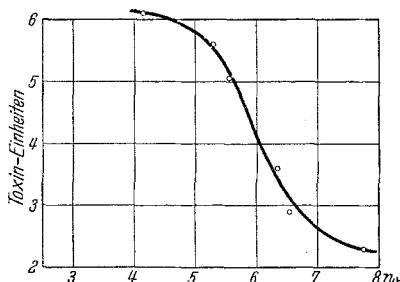


Abb. 9. Aktivitätswechsel einer Toxinlösung in Abhängigkeit von der Azidität.  
Abszisse: Wasserstoffionenkonzentration. Ordinate: Aktivität der Lösung in Toxineinheiten. Vergleiche hiermit auch Abb. 8.

Von jeder Verdünnungsstufe wurden bei jeder der angegebenen Aziditäten Parallelversuche angesetzt. Aus den Mittelwerten von 10 Parallelen wurde für die betreffende Azidität, d. h. für das bei dieser Azidität vorliegende Verhältnis von Oxy- und Leukoform, der Gehalt der Lösung an wirksamem Toxin errechnet. In Abb. 9 sind die Ergebnisse dieser Versuche eingetragen.

Wie aus der Kurve ersichtlich ist, nimmt die Aktivität der Lösung — in Toxin-Einheiten ausgedrückt — mit steigender Wasserstoffionenkonzentration zu. Wie aus einem Vergleich von Abb. 8 mit Abb. 9 hervorgeht, besteht eine enge Beziehung zwischen der Farbänderung des Systems und dem Aktivitätswechsel. In dem Maße, in dem der gelbe Farbstoff zur Leukoform reduziert wird, steigt die toxische Wirksamkeit der Lösung an. Dagegen hat eine Umwandlung in gelbes Oxydationsprodukt durch Verringerung der Wasserstoffionenkonzentration zunehmende Inaktivierung der Lösung zur Folge. Offensichtlich ist demnach die farblose Leukoform die toxisch wirkende Verbindung und der gelbbraune Farbstoff ein inaktives Oxydationsprodukt.

Der Test für die Bestimmung der Toxinaktivität läßt sich, wie eben gezeigt wurde, bei verschiedenen Aziditäten durchführen; er versagt aber, wenn in der Lösung stärkere Oxydations- oder Reduktionsmittel anwesend sind, weil diese die Samenkeimung vollständig hemmen können. Infolge dieser methodischen Schwierigkeit läßt sich der Einfluß von Oxydation und

Reduktion auf die Toxinaktivität direkt nicht vorführen.

Es ist damit zu rechnen, daß außer der Konstitutionsänderung, die sich offenbar mit dem Übergang vom gelben zum farblosen Körper vollzieht, auch eine Änderung der Dissoziationsverhältnisse beteiligt ist, wie sie allgemein bei Indikatoren (einschl. Redoxindikatoren) in Abhängigkeit von der Azidität (bzw. vom

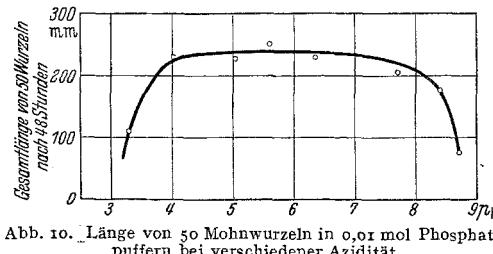


Abb. 10. Länge von 50 Mohnwurzeln in 0,01 mol Phosphatpuffer bei verschiedener Azidität.

Redoxpotential) auftritt. Die stärkere Aktivität des Toxins im sauren Bereich könnte dann — infolge Veränderung der Dissoziationsverhältnisse — durch eine erhöhte Permeation hervorgerufen worden sein.

Daß die Permeation eines Redoxindikators von der Azidität der Außenlösung abhängig ist, hat STRUGGER (1935) am Beispiel des Neutralrots zeigen können. Die Abhängigkeit der Farbstoffpermeabilität von der cH des Außenmediums hat DRAWERT (1943, 1947) an vielen Beispielen behandelt.

Eine vollständige, quantitative Übereinstimmung zwischen den Kurven der Farbänderung und der Aktivitätsänderung tritt nicht auf und ist auch nicht zu erwarten.

Einmal, weil während des Versuchs (wahrscheinlich durch Ausscheidungen des keimenden Samens) eine geringe Verschiebung der Azidität in Richtung auf den Neutralpunkt erfolgte (wenige Zehntel pH-Einheiten). Zum anderen ist auch zu bedenken, daß der Aktivitätszustand der Lösung bei Berührung mit dem Gewebe des Keimplings verändert werden kann. Bei der vorliegenden Versuchsanordnung ist jedenfalls die Toxinlösung mengenmäßig stark im Überschuß, weil bei der Quellung eine Volumenzunahme auf ungefähr das dreifache des Ausgangsvolumens erfolgte. Aus den Ergebnissen ist zu schließen, daß offenbar die Aktivität der Lösungen nur in geringem Umfang durch die Keimplingssubstanz beeinflußt worden ist.

Irreversible Schädigungen der toxischen Wirksamkeit ließen sich erzielen durch:

1. Längere Einwirkung von konzentrierter Essigsäure, insbesondere in der Hitze. Dabei entstand ein dunkelbrauner Körper, der nicht mehr in Wasser oder Essigester löslich war.

2. Durch längeres Stehen des getrockneten Toxins an der Luft (mehrere Monate). Das entstandene Produkt war ebenfalls dunkelbraun und unlöslich.

3. Durch Einwirkung stärkerer Oxydationsmittel, z. B.  $H_2O_2$ . Schwächere Konzentrationen an Oxydationsmitteln führten dagegen nur zu geringen und teilweise reversiblen Abschwächungen der Toxinwirkung.

#### IV. Der Toxingehalt des Myzels.

Die geringe Löslichkeit des Toxins in Wasser machte es wahrscheinlich, daß die Kulturfiltrate mit Toxin gesättigt waren und daß weitere Mengen Toxin im Myzel unlöslich gespeichert waren.

RAISTRICK und Mitarbeiter (1933, 34, 36, 38), die eine Reihe von Farbstoffen aus Kulturen der verschiedensten

*Helminthosporium*-Arten isolierten, benutzten zur Gewinnung größerer Farbstoffmengen ausschließlich das getrocknete Myzel, das teilweise bis zu 40% seines Trocken gewichtes aus Farbstoff bestand.

Zur Prüfung dieser Frage bei *Helminthosporium papaveris* wurden 40 g getrocknetes Myzel fein gemahlen und mit Essigester 2×8 Stunden extrahiert. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels blieb ein dunkelbrauner, schmieriger Rückstand von 5—6 g, der außer dem Farbstoff vor allem aus Reservefett des Myzels bestand. Durch Lösen des Rückstandes in kaltem Eisessig gelang es, einen großen Teil der Fette abzutrennen. Es ist bisher nicht gelungen, den Extrakt zur Kristallisation zu bringen. Lösungen des Extraktes in Wasser erwiesen sich als sehr welkeaktiv.

Das Myzel enthielt jedoch außer dem gelb-braunen, im Kulturfiltrat gelösten Farbstoff noch andere Pigmente, z. B. einen dunkelgrünen Farbstoff, der vor allem mit Petroläther leicht aus dem Myzel gewonnen werden konnte. Auch RAISTRICK und Mitarbeiter (1933, 34, 36, 38) hatten bereits darauf hingewiesen, daß bei den verschiedensten *Helminthosporium*-Arten mehrere Farbstoffe nebeneinander vorkommen können.

Es ist bisher nicht gelungen, den aus dem Myzel gewonnenen Farbstoff von den Begleitpigmenten und von den mitextrahierten Fetten vollständig zu trennen. Die Ausbeuten an reinem Toxin, die nach der Trennung zu erwarten sind, betragen jedoch mehr als das 10-fache dessen, was aus dem Kulturfiltrat durch mühsame Perforation zu erzielen war. Für die weitere chemische Bearbeitung des Toxins dürfte die Extraktion des Myzels wegen der größeren zu erwartenden Ausbeuten von Bedeutung sein.

## V. Die Wirksamkeit des Toxins auf verschiedene Mohnarten.

In den bisherigen Versuchen ist der Mohnkeimungstest ausschließlich mit einheitlichem Material von

Tabelle I. Anzahl der gekeimten Samen verschiedener Mohnarten nach Vorquellung in Toxin und in Pufferlösung. Die Ziffern geben die Mittelwerte der Versuchsreihen in Prozenten an.

Art	Keimung in	Keimung nach Tagen															Mittelwerte aus	Ergebnis
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
<i>P. somniferum</i> L.	Toxin Kontrolle	15 40	32 67	41 79	44 84	48 87	55 96	57 98	59 98	59 98	59 98	59 98				6 × 100 6 × 100	Keimung durch die Toxinwirkung gehemmt	
<i>P. setigerum</i> D.C.	Toxin Kontrolle	1 14	56 91	78 97	82 99	83 99	87 99	92 99	92 99	92 99						6 × 100 6 × 100		
<i>P. californicum</i> hort.	Toxin Kontrolle	3 16	62 79	87 91	89 96	89 96	89 96	90 96	93 96	95 96						2 × 100 2 × 100		
<i>P. orientale</i> L.	Toxin Kontrolle	0 0	0 5	9 24	22 49	45 54	56 69	70 70	70 71	79 74	79 74	80 76				4 × 100 4 × 100	Keine merkliche Beeinflussung der Keimung durch das Toxin	
<i>P. bracteatum</i> LINDL.	Toxin Kontrolle	0 0	0 23	25 66	58 86	77 87	80 92	93 93	96 94	96 95	96 95					4 × 100 4 × 100		
<i>P. caucasicum</i> BIEB.	Toxin Kontrolle	0 0	0 11	12 27	37 40	56 48	64 54	68 60	69 63	71 68	75 71	78 71				4 × 100 4 × 100		
<i>P. dubium</i> L.	Toxin Kontrolle	0 0	0 0	0 7	6 13	14 26	23 37	38 51	49 64							6 × 100 6 × 100		
<i>P. nudicaule</i> L.	Toxin Kontrolle	0 0	1 1	1 6	1 6	2 6	2 6	6 8	9 9	10 10	14 13	17 24	26 36	31 41		6 × 100 6 × 100		
<i>P. rhoeas</i> L.	Toxin Kontrolle	0 0	1 0	15 47	57 54	64 63	67 66	74 66								2 × 100 2 × 100		
<i>P. persicum</i> LINDL.	Toxin Kontrolle	0 0	4 2	39 21	67 50	82 67	89 80	93 84	93 88	94 90						4 × 100 4 × 100	Keimung durch die Toxinwirkung gefördert	
<i>P. atlanticum</i> BALL.	Toxin Kontrolle	0 0	0 0	0 0	0 1	3 2	11 7	28 24	54 49	73 61	86 64	88 71	90 72	92 72		6 × 100 6 × 100		

Phase toxisch wirkt und dessen oxydierte Phase inaktiv ist, werden Vermutungen bestätigt, die bereits früher ausgesprochen worden sind. (siehe 1. Mitteilung, S. 318.)

Ausgehend von der Beobachtung, daß *H. papaveris* chlorotische Blätter schneller und leichter zu infizieren vermag als grüne Blätter und daß die Wirkung des von dem Pilz gebildeten Toxins in chlorotischen Geweben stärker ist als in grünen Geweben, wurde dieser Unterschied mit den stoffwechselphysiologischen Änderungen gedeutet, die bei einer Chlorose in den Blättern eintreten. Hierbei bot insbesondere die Tatsache, daß in chlorotischen Blättern stärkere Reduktionskräfte auftreten (Literatur siehe 1. Mitteilung), eine Möglichkeit, die unterschiedliche Wirksamkeit des Toxins in grünen und chlorotischen Blättern verständlich zu machen:

Es ist damit zu rechnen, daß die stärkeren Reduktionskräfte in chlorotischen Blättern in der Lage sind, das Toxin in die aktive, toxische Form überzuführen, während in den grünen Blättern das Toxin hauptsächlich in oxydierter, inaktiver Form vorliegen dürfte.

Bezüglich der Schwierigkeiten, die einer direkten Messung der Reduktionskräfte in lebendem Gewebe oder in Preßsäften entgegenstehen, muß auf die Angaben in der 1. Mitteilung verwiesen werden.

Zu den im letzten Kapitel beschriebenen Ergebnissen ist zu sagen, daß *P. somniferum* und *P. setigerum* die beiden Mohnarten sind, an denen auch im Freiland häufig Infektionen durch *Helminthosporium papaveris* beobachtet werden können. Infektionen an anderen Wildarten sind dagegen selten. Das Auftreten des Pilzes wurde bei ihnen hauptsächlich an Samenmaterial unter Laborbedingungen festgestellt. (NEERGARD 1937, 38, MEFFERT 1949, BALLARIN 1950).

In groben Zügen zeigen also die hemmenden Wirkungen des Toxins auf Samen von Mohnarten und die Anfälligkeit der Mohnarten gegen *H. papaveris* einen parallelen Verlauf. (An Blättern konnten dagegen toxische Wirkungen bei einer viel größeren Zahl von Pflanzenarten erzielt werden.)

GÄUMANN, NAEPH-ROTH und MIESCHER (1948) haben jedoch in anderem Zusammenhang vor einer Über- schätzung derartiger Beziehungen gewarnt und selbst an Beispielen vorgeführt, daß nicht in allen Fällen die Wirksamkeit der Toxine auf bestimmte Pflanzen und die Anfälligkeit dieser Pflanzen gegen den Toxinbildner parallel zu gehen brauchen. Es bleibt abzuwarten, ob sich weitere Beziehungen zwischen dem Verhalten der Arten und Sorten gegenüber Infektionen und dem Verhalten ihrer Samen gegenüber dem Toxin werden finden lassen.

## VII. Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Es wird eine neue Testmethode zur Bestimmung des Gehaltes an *Helminthosporium*-Toxin in Lösungen unbekannter Konzentration angegeben, die auf der Hemmung der Keimung und des anfänglichen Wurzelwachstums von *Papaver somniferum* durch das Toxin beruht.

2. Schritte zur Aufarbeitung der Kulturflüssigkeit und zur Reinigung des Toxins werden beschrieben.

3. Das Toxin wird als reversibles Redoxsystem erkannt, dessen reduzierte Form toxisch und dessen oxydierte Form inaktiv ist.

4. Die Wirkung des Toxins auf verschiedene Wildarten des Mohns wird beschrieben und diskutiert.

## Literatur.

1. ASHLEY, J. N. and RAISTRICK: Luteoleersin and Alboleersin, metabolic products of *H. leersii* Atkinson. Biochem. J. **32**, 449–454 (1938). — 2. BALLARIN, C.: Untersuchungen über *Helminthosporium papaveris*. Phytopath. Z. **16**, 399–442 (1950). — 3. BÜNNING, E.: Die endogene Ruheperiode der Samen. Planta **35**, 352–359 (1948). — 4. CHARLES, J., H. RAISTRICK, R. ROBINSON and A. TODD: Helminthosporin and Hydroxyisohelminthosporin, metabolic products of the plant pathogen *H. gramineum* RABENH. Biochem. J. **27**, 499 (1933). — 5. DRAWERT, H.: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. III. Flora **35**, 21–64 (1941). — 6. DRAWERT, H.: Zur Frage der Stoffaufnahme durch die lebende pflanzliche Zelle. V. Z. Naturforschg. **3b**, 111 bis 120 (1948). — 7. FINNEY, D.: Probit analysis. A statistical treatment of the sigmoid response curve. Cambridge 1947. zitiert nach KOBEL (1951). — 8. GÄUMANN, E.: Über den Mechanismus des infektiösen Welkens. Biol. Zbl. **67**, 22–26 (1948). — 9. GÄUMANN, E., ST. NAEPH-ROTH und G. MIESCHER: Untersuchungen über das Lycomarasmin. Phytopath. Z. **16**, 257–288 (1950). — 10. GÄUMANN, E., ST. NAEPH-ROTH und P. REUSSER: Über die Inaktivierung von Lycomarasmin durch Streptogenin. Phytopath. Z. **17**, 229–232 (1950). — 11. GÄUMANN, E. und ST. NAEPH-ROTH: Über die unterschiedliche biologische Wertigkeit junger Gewebe von verschiedenen alten Pflanzen. Phytopath. Z. **17**, 233–239 (1950). — 12. GRÜMMER, G.: Beiträge zur Eigenschaftsanalyse der Anfälligkeit von *Papaver somniferum* gegen *Helminthosporium papaveris*. 1. Mitteilung. Züchter **21**, 306–322 (1951). Desgleichen, 2. Mitteilung. Nachrichtenbl. D. Pfl.-Schutzdienst **6**, 32 bis 36 (1952). — 13. JANKE, A.: Arbeitsmethoden der Mikrobiologie I. Dresden und Leipzig 1946. — 14. KOBEL, F.: Untersuchungen über toxische Stoffwechselprodukte von *Nectria cinnabarinia* (Tode) Fr. Phytopath. Z. **18**, 157 bis 195 (1951). — 15. MEFFERT, M.-E.: Ein Beitrag zur Biologie und Morphologie der Erreger der parasitären Blattläuse des Ölmoths. Z. Parasitenkunde **14**, 442–498 (1950). — 16. MIESCHER, G.: Über die Wirkungsweise von Patulin auf höhere Pflanzen, insbesondere auf *Solanum lycopersicum* L. Phytopath. Z. **16**, 369–397 (1950). — 17. MOEWUS, F.: Der Kressewurzeltest, ein neuer quantitativer Wuchsstofftest. Biol. Zbl. **68**, 118–140 (1949). — 18. NEERGARD, P.: Aarsberetning fra J. E. Ohlsens Enkes plantepatologiske Lab. 1. April 1936 bis 31. Marts 1937. II Seiten. Ref.: Rev. appl. Mycol. **17**, 96 (1938). Desgleichen, 1. April 1937 bis 31. Marts 1938. 12 Seiten. Ref.: Rev. appl. Mycol. **17**, 653 (1938). — 19. NIEMANN, E.: Abhängigkeit des Kressewurzelwachstums von meteorologischen Faktoren. Naturwiss. **39**, 190 (1952). — 20. RAISTRICK, H., R. ROBINSON and TODD R.: Cynodonitin, a metabolic product of *H. cynodontis* MARIG. and *H. euchlaena* ZIM. Biochem. J. **27**, 1170–75 (1933). — 21. RAISTRICK, H., R. ROBINSON and E. WHITE: Ravenelin, a new metabolic product of *H. raveneli* CURTIS and of *H. turricicum* PASSERINI. Biochem. J. **30**, 1303–1313, (1936). — 22. STRUGGER, S.: Beiträge zur Gewebephysiologie der Wurzel. Zur Analyse und Methodik der Vitalfärbung pflanzlicher Zellen mit Neutralrot. Protoplasma **24**, 108–127. (1935).