

Züchterische Arbeiten an „59 c“, einem Champignonstamm mit neuer Fruchtkörperform

II. Cytologische Untersuchungen

GERDA FRITSCHE

Forschungsvorhaben Champignon des Max-Planck-Institutes für Züchtungsforschung Köln,
Ahrensburg/Holst. (BRD)

Breeding Experiments with Strain 59 c, a Strain of Mushrooms having a New Type of Fruiting Body

II. Cytological Investigations

Summary. 1. Cytological examinations of mycelia of strains 59b and 59c were made in order to determine whether the nuclei in the mycelia of strains 59b and 59c differ in number and size. Cultures of strain 59c, which form large, massive fruiting bodies, degenerate easily into the low-yielding puffball-like ancestral form 59b when the mycelium is propagated by transfer.

2. Strain 59c has been propagated by several methods (tissue cultures, cultures of pieces of hyphae, and direct transfer of mycelia). For the 59c-type propagation culture "SS 585, 1.V." was used a culture of pieces of hyphae. New tissue cultures and the mycelium of a monospore culture which forms normal, white fruiting bodies, were examined also.

3. The nuclei were stained by a slightly modified "HCL-Giemsa" method.

4. Strain 59c showed a statistically significant increase in the number of nuclei when compared to strain 59b. The latter strain showed the least variation as regards numbers of nuclei.

5. Strain 59c furthermore showed a statistically significant increase in the size of nuclei when compared to strain 59b. Whereas most of the nuclei of strain 59c measured from 1.72–7.82, almost all of the nuclei of strain 59b fell within the 0.15–3.93 size range.

6. The mycelium of new tissue cultures of fruiting bodies of type 59c was examined after different treatments. In hyphal cultures we try to obtain cells without nuclei of strain 59b, the influence of the environment on the number of nuclei is therefore of interest.

7. The number of nuclei increased with increasing temperature. The mycelia grown at 28 °C and at 24 °C had a statistically significant higher number of nuclei than the mycelia grown at 20 °C. No statistically significant differences were found between the 24 °C and the 28 °C cultures.

8. Mycelia grown on wheat-agar showed a statistically significant decrease in the number of nuclei when compared with mycelia grown on compost-agar.

A. Einleitung

Bei „59c“ handelt es sich um einen Champignonstamm, der in der Form der Fruchtkörper, im Geschmack und in der Wachstumsrate des Mycels von der für „*Agaricus bisporus*“ geltenden Norm abweicht. Die Fruchtkörper besitzen weder einen Stiel noch einen Hut noch Lamellen, sondern sind klumpenförmig. Sie können Gewichte von 1,8 kg erreichen. Der Geschmack ist intensiver und das Mycelwachstum langsamer als normal. Der erste Fruchtkörper vom Typ 59c bildete sich spontan im Kulturbett von Stamm „59b“, der bovistförmige Fruchtkörper und deformierte Fruchtkörperanlagen hervorbringt (Fritzsche und v. Sengbusch, 1963). Die neue Form blieb durch Plektenchymvermehrung (Gewebekultur) erhalten. Durch weitere Vermehrungen von Fruchtkörpern des Typs 59c der ertragreichsten Kulturbeteile konnte eine erhebliche Steigerung des

Ertrages erreicht werden. Es zeigten sich jedoch bald Degenerationserscheinungen, indem Fruchtkörper sowie Fruchtkörperanlagen der ertragsarmen Vorform 59b sichtbar wurden und der Ertrag sank (Fritzsche, 1968).

Abb. 1 zeigt im Vordergrund eine Kiste, bei der die Deckerde mit deformierten Fruchtkörperanlagen vom Typ 59b bedeckt ist. Die Kiste dahinter trägt Fruchtkörper vom Typ 59c.

Die cytologischen Untersuchungen sollten zeigen, ob man schon an den Zellkernen Unterschiede zwischen den beiden Typen 59b und 59c erkennen kann. Auffällige Unterschiede wären von praktischem Nutzen, denn man könnte das Mycel auf „Art der Kerne“ cytologisch überwachen. Das Mycel eines normalen Stammes mit gleicher Fruchtkörperfarbe wurde mit in die Untersuchungen einbezogen.

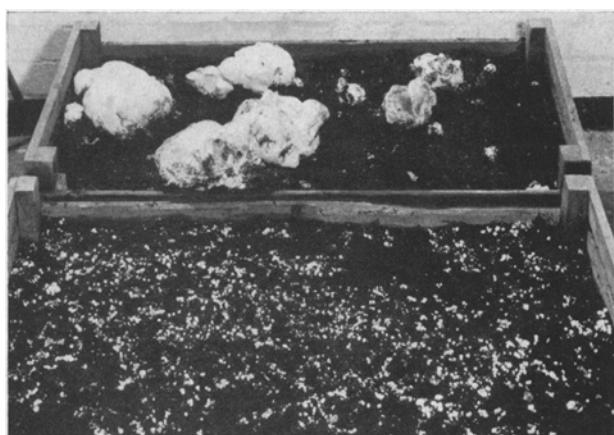


Abb. 1. Vordere Kiste: Deformierte Fruchtkörperanlagen vom Typ 59b. Hintere Kiste: Klumpenförmige Fruchtkörper vom Typ 59c. 1/2 qm Beetfläche je Kulturtkiste

B. Vergleiche hinsichtlich der Zahl der Kerne

1. Methoden

Das Mycel wurde zunächst auf Weizen-Agar kultiviert (Rezept: 125 g Weizenkörner werden mit 4 l Aqua dest. 2 Std. lang gekocht. 24 Std. später wird die Nährösung abgegossen, grob filtriert und mit 2% Agar-Agar verdickt). Nach etwa 8–10 Tagen wurden, wie von Hoffmann (1964) beschrieben, an den Rand der Kulturen Deckgläschchen aufrecht in den Nährboden gesteckt. Nach etwa 8 Tagen war genügend Mycel auf die Deckgläser gewachsen, so daß mit den Untersuchungen begonnen werden konnte.

Für die Kernfärbung wurde die HCl-Giemsa-Methode angewendet, allerdings in etwas abgeänderter Form, wie von Stephan (1967) beschrieben.* In Anpassung an das Objekt „Champignon“ wurden von Gadkari noch weitere geringfügige Veränderungen vorgenommen. Der Arbeitsgang sah im einzelnen folgendermaßen aus:

a) Fixierung. Die Deckgläschchen mit dem Mycel wurden 2–3 Min. an der Luft getrocknet, damit die Hyphen besser auf dem Glas hafteten. Die Präparate kamen anschließend 15 Min. in Carnoysches Gemisch, danach für 5 Min. in 95%igen Alkohol und anschließend in 70%igen Alkohol.

b) Hydrolyse und Färbung. Nach 40 Min. wurden die Präparate aus dem Alkoholbad genommen, behutsam in Aqua dest. gespült und in 1 N-HCl überführt. Nachdem die Präparate 5 Min. in diesem bei Zimmertemperatur gehaltenen Salzsäurebad gestanden hatten, kamen sie für 7 Min. in auf ca. 57 °C erwärmtes 1 N-HCl. Danach wurden sie in 4 Bädern Aqua dest. sorgfältig gespült und anschließend für 65 Min. ins Färbebad gestellt. Nach der Entnahme aus dem Färbebad wurden die Präparate kurz in Phosphatpuffer (pH 6,9) gespült. Bei der mikroskopischen Untersuchung wurde das Deckgläschchen mit dem Mycel in einen Tropfen Phosphatpuffer gelegt.

c) Herstellung der Giemsa-Stammlösung. 0,76 g Azur-Eosin-Methylenblau (Merck 9203) wurden bei 60 °C in 25 ml Glycerin aufgelöst. Nach der Abkühlung wurde 79 ml 99,9%iger Alkohol zugesetzt. Die Lösung wurde filtriert und bei +3 °C aufbewahrt. Für das Färbebad wurde die Stammlösung mit Phosphatpuffer (pH 6,9) verdünnt (25 Tropfen Farblösung auf 10 ml Puffer). Das Färbebad wurde jedes Mal neu angesetzt.

* Herrn Dr. Stephan möchte ich sehr für die persönliche Beratung bei der Anwendung der Methode danken.

Für die Untersuchungen wurde ein Standard-Universal-Mikroskop der Firma Zeiß benutzt.* Die Kerne wurden bei 800facher Vergrößerung beobachtet. Die Kernzählungen wurden von zwei Personen (Fräulein Klinckmann und Herrn Gadkari) durchgeführt, wobei darauf geachtet wurde, daß jeder von jedem Stamm Material in annähernd gleichem Umfang untersuchte.

2. Ergebnisse

Abb. 2 zeigt die Kerne von Hyphen aller drei Stämme. 4385 ist eine eigene Einsporenlkultur mit normalem weißen Hut. SS 585, 1. V. ist eine Vermehrung, die bisher viele Fruchtkörper vom Typ 59c und fast keine Anlagen vom Typ 59b gebracht hatte (SS-Nr. = zweimalige Vermehrung über Hyphenstücke frischer Gewebekulturen, Fritsche, im Druck, 1. V. = 1. Vermehrung durch Mycelteilung). Daß SS 585, 1. V. auf der Aufnahme besonders viele runde Kerne zeigt, während man bei 59b vorwiegend längliche Kerne sieht, ist zufällig. In allen Stämmen kamen die verschiedensten Kernformen vor. Vermutlich befinden sich die länglichen Kerne in der Teilung.

Das Ergebnis der Kernzählungen veranschaulicht die graphische Darstellung in Abb. 3. Die sechs jeweils nebeneinander gezeichneten Säulen zeigen die durchschnittliche Kernzahl von sechs nebeneinander liegenden Zellen an. Die links außen gelegene Säule steht dabei für die Spitzenzelle. Unter den Säulen ist die Anzahl der überprüften Zellen angegeben. Die errechnete Streuung wird durch eine in die Mitte jeder Säule eingezeichnete unterbrochene Linie veranschaulicht. Es fällt auf, daß bei 59b die wenigsten Kerne pro Zelle gezählt wurden. Auch die Streuung ist bei 59b wesentlich geringer als bei den anderen Stämmen. SS 585, 1. V. zeigte die höchsten Kernzahlen im Vergleich mit 4385 und 59b. Vom Typ 59c wurden aber außer SS 585, 1. V. auch zwei frisch aus klumpenförmigen Fruchtkörpern gewonnene Gewebekulturen mit in die Untersuchung einbezogen (G 738 Org. und G 739, Original). Da die Gewebekulturvermehrung bei der Erhaltungszüchtung von 59c eine wichtige Rolle spielt, interessiert das Kernverhalten junger Gewebekulturen. Die vorliegenden Kulturen wurden aus Fruchtkörpern derselben G-Nr. gewonnen. Der für G 738 verwendete Pilz bildete sich drei Wochen früher als der für G 739 genutzte und war 2,5 mal so schwer wie dieser. Die Kiste, auf die G 738 zurückzuführen ist, brachte einen etwas höheren Ertrag als die Kiste, aus der die andere Gewebekultur stammt. Während G 738, Org. mehr Kerne als SS 585, 1. V. aufwies, lag G 739, Org. in der Kernzahl zwischen SS 585, 1. V. und 59b und unterschied sich kaum von 4385. Nur die Streuung war geringer.

75 Wiederholungen je Zelle wurden zur varianzanalytischen Auswertung herangezogen. Da von den

* Herrn Professor Reimann-Philipp und Fräulein Pohl möchte ich vielmals dafür danken, daß wir die Untersuchungen an diesem Mikroskop durchführen durften.

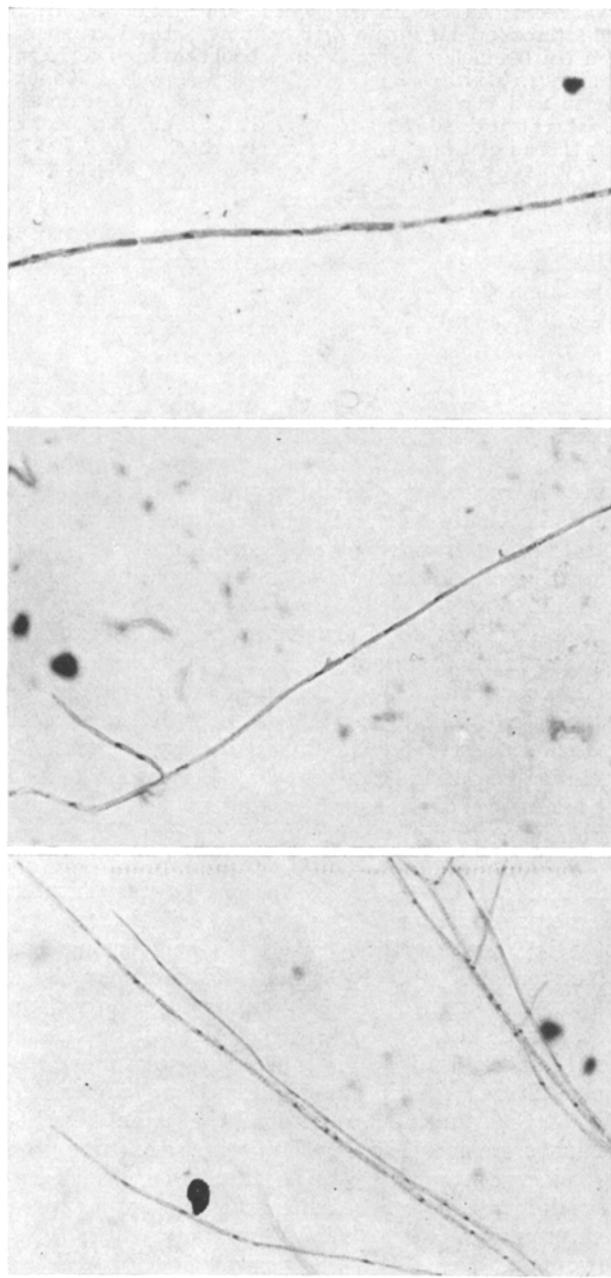


Abb. 2. Oben: Hyphe von 4385 (normaler Stamm mit weißem Hut). Mitte: Hyphe von 59b (Stamm mit deformierten Fruchtkörperanlagen und bovitistörmigen Fruchtkörpern). Unten: Hyphen von SS 585, 1. V. (Stamm mit klumpenförmigen Fruchtkörpern vom Typ 59c). 750× vergrößert]

beiden G-Nr. nicht genügend Zahlenmaterial vorlag, wurden sie nicht mit in die Berechnung einbezogen. 59b hatte gut gesichert weniger Kerne als der 59c-Typ. Die Differenz zu „normal“ war jedoch nicht statistisch gesichert. Dagegen war die Differenz zwischen „normal“ und „Typ 59 c“ statistisch gesichert. Die Spitzenzellen hatten nicht gesichert mehr Kerne als die Folgezellen, wie es bei anderen

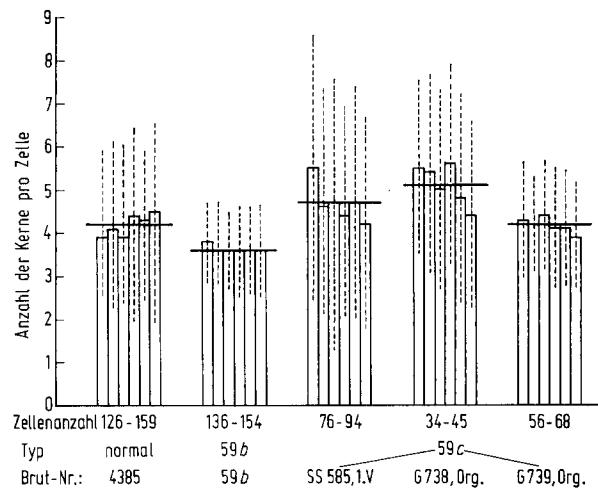


Abb. 3. Vergleich verschiedener Brutten hinsichtlich der Anzahl der Kerne pro Zelle. Die 6 Säulen stehen jeweils von links nach rechts für die Spitzenzelle und die anschließenden 5 Zellen einer Hyphe. Es sind Durchschnittswerte von 34—159 Zellen, entsprechend den Angaben unter den Säulen. Die gestrichelten Linien in den Säulen kennzeichnen die Streuung der Einzelwerte

Pilzen festgestellt worden war (Hoffmann, 1964, Stephan, 1969).

C. Vergleiche hinsichtlich der Größe der Kerne

1. Methoden

Die Kerne wurden mit einem Okular-Mikrometer von Zeiß bei 1000facher Vergrößerung (12,5 (Okular) × 40 (Objektiv) × 2 (Optovar)) gemessen. Dabei wurden zwei Werte, Länge und Breite, notiert und in μ umgerechnet. Es mußte in Kauf genommen werden, daß die Meßwerte wegen der geringen Kerngröße naturgemäß mit beachtlichen Ungenauigkeiten behaftet sind. Die Bestimmung der Kernvolumina erfolgte nach der Ellipsoidformel $V = 4/3 \pi a b c$. Da wir die Tiefe der Kerne nicht messen können, aber annehmen, daß sie der Breite entspricht, setzten wir in der Formel b^2 an Stelle von $b \times c$. Bei a und b handelt es sich um Halbachsen.

Die Kernmessungen wurden von denselben Personen durchgeführt wie die Kernzählungen. Wieder wurde auf gleichmäßige Verteilung des Materials geachtet und darauf, daß von jedem Stamm Meßwerte mehrerer Tage vorlagen.

2. Ergebnisse

In Tab. 1 sind die durchschnittlichen Kernvolumina aufgeführt. Bei der Messung wurde notiert, welche Kerne in derselben Zelle lagen. Die in der Tabelle unter 1. angegebenen Werte sind die Durchschnittswerte von 50 in verschiedenen Zellen liegenden Kernen, die zufällig als Erste gemessen wurden. Die unter 2. angeführten Werte beziehen sich auf die als nächstes gemessenen Kerne derselben Zellen usw. Die auf diese Weise ermittelten Durchschnittswerte geben bereits einen Anhalt für die Streuung der Einzelwerte. Es fällt auf, daß bei 59b die geringste Abweichung der drei Durchschnittswerte voneinander zu finden ist. Hinsichtlich der Zahl der Kerne pro Zelle hatte dieser Stamm auch die geringste

Tab. 1. Übersicht über die durchschnittlichen Volumina der Zellkerne verschiedener Bruten

Brut		\bar{x} Volumina von je 50 Kernen in μ^3			\bar{x} aller 150 Kerne	Statistisch gesicherte Differenz zu:			
		1.	2.	3.		4385	59b	SS 585, 1. V.	Fri. G.
Nr.	Typ	1.	2.	3.					
4385	normal	2,92	2,64	2,35	2,64	—	+++	000	+
59b	59b	1,65	1,64	1,63	1,64	000	—	000	0
SS 585, 1. V.	59c	3,97	4,26	4,46	4,23	+++	+++	—	+++
Fri. G.	59c	2,25	2,02	2,38	2,22	0	+	000	—

Volumina

mit $p < 5,0\%$ gesichert

größer = +

kleiner = 0

mit $p < 1,0\%$ gut gesichert

größer = ++

kleiner = 00

mit $p < 0,1\%$ sehr gut gesichert

größer = +++

kleiner = 000

Differenz nicht gesichert = K

Fri. G. = Frische Gewebekultur aus Fruchtkörpern vom Typ 59c

Streuung (Abb. 3). Die varianzanalytische Verrechnung der Kernvolumina ergab, daß 59b die statistisch gesichert kleinsten Kerne hat (Tab. 1). Die statistisch sehr gut gesichert größten Kerne hat SS 585, 1. V. Die frische Gewebekultur, die wie SS 585, 1. V. dem Typ 59c zugeordnet ist, hat sehr gut gesichert kleinere Kerne als diese. Es handelt sich nicht um die Gewebekulturen, die bei den Kernzählungen verwendet wurden. Sie auch hier zu untersuchen war arbeitstechnisch nicht möglich. Wir wollten mit „Frischen Gewebekulturen“ arbeiten, aber Kernzählungen und -messungen eines größeren Materials beanspruchten längere Zeit, zumal das von einem anderen Institut geliehene Mikroskop uns nur 1–2 mal wöchentlich zur Verfügung stand. Es schien uns auch unwichtig, da es uns um das cytologische Verhalten „Frischer Gewebekulturen aus Pilzen vom Typ 59c“ im allgemeinen ging.

Einen Überblick über die Größenverteilung aller der Tab. 1 zu Grunde liegenden Kerne gibt Abb. 4.

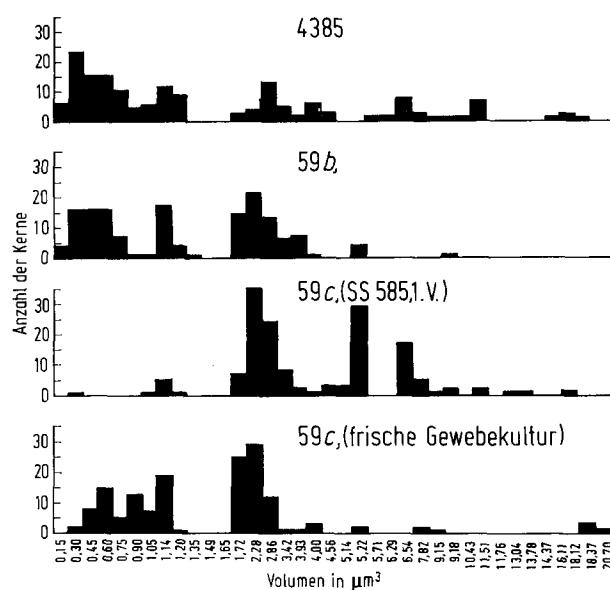


Abb. 4. Vergleich verschiedener Bruten hinsichtlich der Größe der Kerne. Es werden je Brut 150 Kerne angeführt

Die Art der Darstellung entspricht der von Tschermak-Woess und Hasitschka (1953) angewendeten. Die beiden Autorinnen zogen allerdings nur Ruherkerne und Kerne mit endomitotischer Teilungsstruktur für die Zeichnung heran. Wie Abb. 4 veranschaulicht, waren die meisten Kerne des normalen Stammes 4385 relativ klein. Sie lagen im Bereich von $0,15$ – $1,20 \mu^3$. Es kamen aber auch größere Kerne vor bis hin zu einer Größe von 20 , $70 \mu^3$. Daß Stamm 59b im Durchschnitt gesichert kleinere Kerne als 4385 hatte, ist offenbar darauf zurückzuführen, daß das Mycel dieses Stammes praktisch nur Kerne bis zu einer Größe von $5,22 \mu^3$ enthielt. Ein einziger größerer Kern von $9,18 \mu^3$ kam noch vor. Bei SS 585, 1. V. lag die Mehrzahl der Kerne im Bereich von $1,72$ – $3,42 \mu^3$. Weitere Anhäufungen der Werte gab es bei $5,22$ und $6,54 \mu^3$. Kleine Kerne kamen dagegen nur vereinzelt vor; ebenso große Kerne. Die frischen Gewebekulturen hatten wie SS 585, 1. V. sehr viele Kerne von der Größe $1,72$ – $2,86 \mu^3$. Es kamen jedoch auch sehr viele kleine Kerne vor. Große Kerne waren nur vereinzelt zu finden.

D. Vergleich der Kernzahlen von unterschiedlich behandeltem Mycel frischer Gewebekulturen

Wie bereits erwähnt, zeigten ertragreiche Gewebekulturen von 59c in der Regel nach einiger Zeit Ertragsdepressionen. Die deformierten Fruchtkörperanlagen und bovitostiformen Fruchtkörper der ertragsarmen Vorform 59b wurden sichtbar. Offenbar enthielt der Fruchtkörper vom c-Typ, aus dem die Gewebekultur geschnitten worden war, auch die Erbanlagen der ertragsarmen Vorform 59b, die sich allmählich anreicherten. In der Hoffnung, diese Erbanlagen auszuschalten, schnitten wir deshalb unter dem Präpariermikroskop kleine Hyphenstücke frischer Gewebekulturen ab und vermehrten sie getrennt. Mit einem nur aus wenigen Zellen bestehenden Hyphenstück erfaßt man naturgemäß viel weniger Kerne als bei normaler Abimpfung. Wir sahen erhöhte Chancen, ein von den Allelen des Types 59b freies Hyphenstück zu isolieren. In diesem Zusammenhang ist auch die Kernzahl pro Zelle von In-

teresse. Möglicherweise enthalten die Zellen unter bestimmten Umwelteinflüssen besonders wenig Kerne.

1. Verschiedene Nährböden

Tab. 2 gibt eine Übersicht über die Kernzahlen, die bei Kultur des Mycels auf zwei verschiedenen Nährböden erhalten wurden. Außer Weizen-Agar, dessen Rezept bereits angegeben wurde, kam Kompost-Agar zur Anwendung. Kompost-Agar eignet sich seiner dunklen Farbe wegen gut zur Isolierung von Hyphenstücken. Die weißen Pilzfäden sind gut unter dem Präpariermikroskop zu erkennen. Bei der Herstellung des Kompost-Agars wurde folgendermaßen vorgegangen. Pasteurisierte Pferdemistkompost wurde gefroren und im Allesmuser (Marke „Wolf“, Fa. Gebrüder Tigges) zerkleinert. 500 g des grob zerkleinerten Kompostes wurden im gefrorenen Zustand mit 2 l Aqua. dest. im Starmix zerkleinert und danach mit 1,5% pulverisiertem Agar-Agar verfestigt. Sterilisiert wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen je 2 Stunden.

Tabelle 2. Übersicht über die durchschnittlichen Kernzahlen pro Zelle bei Kultur auf verschiedenen Nährböden. Mycel einer frischen Gewebekultur eines 59 c Fruchtkörpers

Nährboden	\bar{x} Kernzahl von je 55 Zellen					\bar{x} aller Zellen	
	1 = Spitzenzelle, 2–5 = anschließende Zellen						
	1	2	3	4	5		
Weizen-Agar	4,27	3,82	3,87	3,91	3,82	3,94	
Kompost-Agar	4,47	4,64	4,29	4,49	4,40	4,46	

Zur Prüfung kam das Mycel einer weiteren frischen Gewebekultur aus einem klumpenförmigen Fruchtkörper (Typ 59 c). Die Kernzählungen wurden an vier Tagen durchgeführt, wieder von Fräulein Klinckmann und Herrn Gadkari. An jedem Tag wurde Mycel beider Nährböden untersucht, und zwar von jeder Behandlung etwa gleich viele Zellen.

Wie man aus Tabelle 2 entnehmen kann, hatte das auf Kompost kultivierte Mycel im Durchschnitt etwas mehr Kerne als das auf Weizen-Agar gezogene Mycel. Das trifft für alle Durchschnittswerte zu. Die Differenz ist statistisch gesichert. Die Spitzenzellen haben nicht gesichert mehr Kerne als die Folgezellen.

2. Verschiedene Temperaturen

Für die Untersuchungen wurden die drei Temperaturbereiche 20 °C, 24 °C und 28 °C gewählt. 24 °C wird als optimale Temperatur des Mycelwachstums bei Kultur in Pferdemistkompost angesehen (Steineck, 1970). Huhnke und v. Sengbusch stellten 1967 durch Versuche in Wasserbädern fest, daß das Mycel im Till-Substrat bei 27 °C am schnellsten wächst.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde eine weitere frische Gewebekultur vom Typ 59c angesetzt. Das Mycel wurde auf Kompost-Agar geimpft. Die Kernzählungen wurden an zwei Tagen durchgeführt. An jedem Tag wurde die Einwirkung aller drei Temperaturen untersucht, wobei von jeder Behandlung die gleiche Anzahl Zellen erfaßt wurde.

Wie die in Tab. 3 aufgeführten Durchschnittswerte zeigen, nimmt die Zahl der Kerne mit Erhöhung der Temperatur zu. Die Differenzen zwischen 20 und 24 °C sowie 20 und 28 °C sind statistisch gesichert, während die Differenz zwischen 24 und 28 °C nicht gesichert ist. Statistisch gesicherte Differenzen der Kernzahlen der einzelnen Zellen innerhalb eines Temperaturbereiches gibt es nicht.

E. Diskussion der Ergebnisse und Schlußfolgerungen

Eine der wichtigsten Fragen, die man sich bei der züchterischen Bearbeitung des Stammes 59c stellen muß, ist, ob es cytologische Unterschiede zwischen den Mycelien von 59c und 59b gibt. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten Unterschiede in Zahl und Größe der Kerne, wenn man „SS 585, 1. V.“ als typischen Vertreter von „59c“ ansieht. In Fortsetzung der Arbeiten wäre es gut, von weiteren ertragreichen SS-Nr. sowie einigen stark in 59b degenerierten SS-Nr. Kernmessungen oder Auszählungen zu machen und zu prüfen, ob die in Abb. 4 bzw. 3 veranschaulichten Unterschiede auch hier gefunden werden. Im Falle eines positiven Ausgangs der Untersuchungen könnte man die cytologische Überwachung der Mycelvermehrungen des Stammes 59c einführen. Daß die frischen Gewebekulturen sich nicht immer wie SS 585, 1. V. verhielten, spricht nicht gegen die Nützlichkeit einer solchen Mycelüberwachung. Wir mußten öfter feststellen, daß frische

Tab. 3. Übersicht über die durchschnittlichen Kernzahlen pro Zelle bei Kultur unter verschiedenen Temperaturen. Mycel einer frischen Gewebekultur eines 59c-Fruchtkörpers

Temperatur in °C	\bar{x} Kernzahlen von je 45 Zellen 1 = Spitzenzelle, 2–5 = anschließende Zellen					\bar{x} aller 225 Zellen	Statistisch gesicherte Differenz zu:		
	\bar{x}	1	2	3	4		20 °C	24 °C	28 °C
schwankend von ... bis									
16–23	20	4,49	4,53	4,49	4,42	4,64	4,51	—	00
22–26,5	24	5,02	5,13	5,27	4,91	5,04	5,07	++	K
27–29	28	5,69	5,31	5,07	5,02	4,96	5,21	++	K

mit $p < 1\%$ gut gesichert mehr Kerne = ++, weniger Kerne = 00
Differenz nicht gesichert = K

Gewebekulturen bereits Anlagen vom Typ 59b zeigten und wenig Ertrag brachten. In diesem Zusammenhang sind die Daten interessant, die sich auf die beiden Gewebekulturen der Abb. 3 beziehen. Die in der Zahl der Kerne SS 585, 1. V. sogar übertreffende G-Nr. stammt von einem Fruchtkörper ab, der im Vergleich mit dem Fruchtkörper der anderen G-Nr. größer war, sich drei Wochen früher bildete und aus einer ertragreicher Kiste genommen wurde.

Bei Betrachtung der Abb. 4 drängt sich die Frage auf, ob der 59c-Typ polyploid ist, da er vorwiegend größere Kerne hat als 59b. Auch bei Pilzen gibt es Beispiele dafür, daß mit dem Polyploidiegrad das Kernvolumen zunimmt (Sost, 1955, Franke, 1962, u. a., nach Esser und Kuennen 1965). Eine klare Antwort auf die Frage kann nicht gegeben werden, zumal sich die Zeichnung vorwiegend auf länglich geformte, also offenbar in der Teilung befindliche Kerne, bezieht. Bei jedem Stamm waren von den 150 gemessenen Kernen auch einige rund. Bei der Kleinheit der Kerne konnte jedoch nicht erkannt werden, ob es sich um einen Ruhekern handelte oder ob sich der Kern schon in der Teilung befand und dadurch an Größe zugenommen hatte. Von den runden Kernen gab es fünf Größen ($0,15/ 1,14/ 3,93/ 9,18$ und $18,12 \mu^3$). Am häufigsten waren $1,14 \mu^3$ große Kerne vertreten. Bei 59b fehlte der größte Kern. Bei SS 585, 1. V. kam er zu 10% vor. Dafür fehlte hier der kleinste Kern, während er bei 59b 14% ausmachte. Doch war die Gesamtzahl der runden Kerne sehr gering (10 bei SS 585, 1. V., 29 bei 59b).

In keiner Untersuchung wurden in den Spitzenzellen gesichert mehr Kerne als in den Folgezellen gefunden, wie es von anderen Pilzen bekannt ist (Hoffmann, 1964, Stephan, 1969). Für unsere Arbeit bedeutet diese Feststellung, daß wir nicht Gefahr laufen, beim Abschneiden von Hyphenspitzen besonders kernreiche Zellen zu isolieren. Wir hatten teils Hyphenspitzen abgetrennt, teils aus der Nähe des aufgeimpften Gewebestückes Hyphen mit einer Nadel an den mycelfreien Rand übertragen, und dort ein Stück von der Hymen abgeschnitten. Bei der letztgenannten Methode ist evtl. die Chance größer, möglichst viele c-Kerne zu isolieren. Das Mycel ist erst wenig gewachsen, d. h. es haben erst wenige Kernteilungen stattgefunden, so daß die c-Kerne vermutlich noch überwiegen. Wir nehmen an, daß das Mycel der klumpenförmigen Fruchtkörper vorwiegend c-Kerne enthält, da sonst der c-Typ nicht in Erscheinung getreten wäre. Möglicherweise teilen sich die Kerne vom Genotyp 59b häufiger als die vom Genotyp 59c, so daß sie allmählich überwiegen. Daß sich die Kerne des Kulturchampignons unabhängig voneinander und von der Zellwandbildung teilen, ist schon seit längerer Zeit bekannt (Kligman, 1943, Sarazin, 1955, Evans, 1959).

Aus den Ergebnissen des Temperatur-Versuches können wir den praktischen Schluß ziehen, das Mycel

zur Hyphenstückisolierung bei 20°C zu kultivieren, da hier die wenigsten Kerne gefunden wurden. Bei noch tieferen Temperaturen ist das Mycelwachstum zu langsam. Die cytologischen Untersuchungen hatten sich deshalb auf den Temperaturbereich von $20-28^\circ\text{C}$ beschränkt.

Bei Kultur auf Weizen-Agar enthielt das Mycel weniger Kerne als bei Kultur auf Kompost-Agar. Da der Unterschied nur einen Kern auf zwei Zellen betrug und sich die einzelnen Hyphen vom dunklen Kompost-Agar viel besser abheben als von dem hellen Weizen-Agar, werden wir dennoch weiterhin den Kompost-Agar für die zur Hyphenstückisolierung bestimmten Kulturen benutzen.

F. Zusammenfassung

1. Durch die cytologischen Untersuchungen sollte geklärt werden, ob sich die Mycelien von 59b und 59c hinsichtlich Zahl und Größe der Zellkerne von einander unterscheiden. Die Kulturen von 59c, die große, klumpenförmige Fruchtkörper bilden, degenerieren nach Mycelvermehrung leicht in die bovit-förmige, ertragsarme Vorform 59b.

2. Von 59c gibt es Vermehrungen verschiedener Art (Gewebekulturen, Hyphenstücke, Mycelteilungen). Als Vertreter für den 59c-Typ wurde die Vermehrung „SS 585, 1. V.“ benutzt (Hyphenstück). Ferner wurden frische Gewebekulturen sowie das Mycel einer Einsporenkultur, die normale weiße Fruchtkörper bringt, untersucht.

3. Die Kerne wurden nach der etwas abgeänderten „HCl-Giemsa-Methode“ gefärbt.

4. 59c hatte gut gesichert mehr Kerne als 59b. 59b zeigte die geringste Streuung der Einzelwerte.

5. 59c hatte auch statistisch sehr gut gesichert größere Kerne als 59b. Während bei 59c die Mehrzahl der Kerne im Größenbereich $1,72-7,82 \mu^3$ lagen, verteilten sich die Kerne von 59b fast nur auf den Bereich zwischen $0,15$ und $3,93 \mu^3$.

6. Das Mycel frischer Gewebekulturen aus Fruchtkörpern vom 59c-Typ wurde nach unterschiedlicher Behandlung untersucht. Da die Hyphenstückisolierung den Sinn hat, wenig Kerne zu übertragen, um möglichst von 59b-Kernen freie Zellen zu gewinnen, interessiert der Einfluß der Umwelt auf die Zahl der Kerne.

7. Die Zahl der Kerne nahm mit der Temperatur zu. Das bei 28° und 24°C gewachsene Mycel hatte gesichert mehr Kerne als das bei 20°C kultivierte. Zwischen 24 und 28°C gab es keine gesicherten Unterschiede.

8. Das auf Weizen-Agar herangezogene Mycel hatte gesichert weniger Kerne als das auf Kompost-Agar kultivierte.

Danksagung

Fräulein Jutta Klinckmann und Herrn Dilip Gadkari möchte ich vielmals für ihre sorgfältige Arbeit danken.

Literatur

1. Esser, K., Kuenen, R.: Genetik der Pilze. Berlin/Heidelberg/New York: Springer 1965. — 2. Evans, H. J.: Nuclear behaviour in the cultivated mushroom. Chromosoma (Berlin) **10**, 115—135 (1959). — 3. Fritsche, Gerda: Züchterische Arbeiten an „59c“, einem Champignonstamm mit neuer Fruchtkörperform. I. Steigerung des Ertrages. Theor. Appl. Genetics **38**, 28—37 (1968). — 4. Fritsche, Gerda: Weitere Arbeiten an Stamm 59c zum Erreichen der Handelsreife. Mushroom Science VIII — im Druck. — 5. Fritsche, Gerda, Sengbusch, R. v.: Beispiel der spontanen Entwicklung neuer Fruchtkörperformen beim Kulturchampignon. Der Züchter **33**, 270 bis 274 (1963). — 6. Hoffmann, G. M.: Untersuchungen über die Kernverhältnisse bei *Fusarium oxysporum* f. *callistephii*. Arch. Mikrobiol. **49**, 51—63 (1964). — 7. Huhnke, W., Sengbusch, R. v.: Die Bedeutung der Temperatur bei der Kultur des Champignons insbesondere beim „Till-Verfahren“. Gartenbauwiss. **32**, 387—398 (1967). — 8. Kligman, A. M.: Some cultural and genetic problems in the cultivation of the mushroom "Agaricus campestris". Amer. J. Bot. **30**, 745—762 (1943). — 9. Sarazin, A.: The cultivated mushroom. Translated from French by C. J. La Touche. Yorkshire: W. S. Maney & Son, Ltd. 1955. — 10. Steineck, H.: Champignonkultur. Stuttgart: Verlag Eugen Ulmer 1970. — 11. Stephan, B. R.: Untersuchungen über die Variabilität bei *Colletotrichum gloeosporioides* Penzig in Verbindung mit Heterokaryose. Zentralbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten u. Hygiene, II. Abt., **121**, 41—83 (1967). — 12. Stephan, B. R.: Karyologische Untersuchungen an keimenden Ascosporen und Hyphenzellen von *Lophodermium pinastri* (Schrad.) Chev. Arch. Mikrobiol. **67**, 318—327 (1969). — 13. Tschermak-Woess, Elisabeth, Hasitschka, Gertrude: Veränderungen der Kernstruktur während der Endomitose, rhythmisches Kernwachstum und verschiedenes Heterochromatin bei Angiospermen. Chromosoma **5**, 574—614 (1953).

Eingegangen am 30. Juni 1971

Angenommen durch W. Seyffert

Dr. Gerda Fritsche
Proefstation voor de champignoncultuur
Venrayseweg 101
Horst (L.) (The Netherlands)