

# Beitrag zur Kenntnis einiger Wurzelpilze

---

Von der  
Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich  
zur Erlangung  
der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften

genehmigte

## Promotionsarbeit

vorgelegt von

**Sophie Renner**  
aus Zürich

---



850  
Ser.

Kat.

Referent: Herr Prof. Dr. E. Gäumann  
Korreferent: Herr Prof. Dr. Jaccard

---

Dessau 1935

Anhaltische Buchdruckerei Gutenberg Gustav Zichäus G. m. b. H.



**Aus dem Institut für spezielle Botanik  
der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich.**

Direktor: Professor Dr. E. G ä u m a n n.

---

**Beitrag zur Kenntnis einiger Wurzelpilze.**

Von

Sophie Renner, Zürich.

Mit 15 Textabbildungen.

Inhaltsverzeichnis: I. Einleitung. — II. Vorversuche. — III. Kultur der Versuchspflanzen und Syntheseversuche: A. *Salix repens*. B. *Schoenus ferrugineus*. C. *Acer pseudo-platanus* und andere Acerarten: a) Keimungsversuche mit verschiedenen Acerarten; b) Einwirkung differenzierter Nährlösungen auf die Keimlinge; c) Topfkulturen. — IV. Die Wurzelpilze. A. Isolierung und Nährmedien. B. Temperaturansprüche der Pilze. C. Änderung der H-Ionen-Reaktion durch den Pilz. D. Beeinflussung des Pilzwachstums durch Phosphatide. E. Stickstoffversorgung der Pilze: a) Kultur in N-haltiger Lösung; b) Kultur in N-freier Lösung. — V. Zusammenfassung. — Literaturverzeichnis.

**I. Einleitung.**

Das Problem der Wurzelpilze beschäftigt die Wissenschaft bereits seit 50 Jahren. Der erste, welcher die Materie in Angriff nahm, war Frank, der 1885 seine erste Arbeit darüber veröffentlichte. Er deckte die morphologische Natur der Erscheinung auf und führte den Namen Mykorrhiza dafür ein. Biologisch deutete er die Erscheinung als symbiontische Verbindung zwischen Pilz und Gefäßpflanze, wobei letztere außer Wasser und Mineralsalzen auch organische Nährstoffe erhalte. Die Hypothese einer Symbiose wurde 1900 von Stahl aufgenommen und ausgebaut. Er war der Ansicht, daß es sich vor allem um Pflanzen handle, welche, bei geringer Wasserdurchströmung und dadurch gehemmter Salzaufnahme, eines Pilzes zur Nährstoffvermittlung bedürften.

Die Auffassung einer symbiontischen Verbindung zeigen gleicherweise die Arbeiten von Tubeuf (1903), Sarauw (1903), Möller (1903) und Rexhausen (1925).

Woronin (1885) dagegen stellte die Theorie auf, daß es sich bei der Erscheinung der Mykorrhiza nicht um eine Symbiose handle, sondern um einen parasitären Befall der Pflanze durch den Pilz. In gleichem Sinne lauten die Ergebnisse der Untersuchungen von Fuchs (1911), McDougall (1914), Demeter (1923), Masui (1928) und Melin (1921 bis 1925), der umfassende Arbeiten über physiologische Zusammenhänge

zwischen Pflanze und Pilz in Reinkultur ausgeführt hat. Ernährungsphysiologisch kam er zu ähnlichen Resultaten wie Frank, auch er faßte den Pilz als stickstofflieferndes Organ auf, biologisch jedoch betrachtete er ihn als Parasiten, welcher von kräftigen Pflanzen unschädlich gemacht und verdaut werden könne, andererseits aber, bei starker Virulenz, die Wurzeln mehr oder weniger schädige. Melin wies auch die Beeinflussung der beiden Gleichgewichtspunkte nach — Virulenz des Pilzes — Gesundheit der Wurzel — durch Umweltfaktoren wie Bodenreaktion, Vorhandensein organischer Verbindungen im Boden und deren Löslichkeit durch die Wurzeln, Vorkommen von Stoffen, welche das Pilzwachstum hemmen.

M. C. Rayner (1927) publizierte eine umfassende Zusammenstellung über die das Problem der Wurzelpilze berührenden Fragen und die Arbeiten, welche darüber existieren. Darauf, sowie auf die zuvor zitierten und andere, im Literaturverzeichnis angeführte Arbeiten, stützen sich die folgenden Untersuchungen, ausgeführt mit den Wurzelpilzen von *Acer pseudoplatanus*, *Salix repens* und *Schoenus ferrugineus*.

Es handelt sich dabei um folgende Fragen:

1. Lassen sich aus den Wurzeln der genannten Pflanzen Pilze isolieren? Wenn ja, welche Ansprüche stellen sie an Nährstoffe und Temperatur? Lassen sich die isolierten Pilze bestimmen?

2. Wie verhalten sich die Keimlinge der untersuchten Pflanzen bei steriler Aufzucht? Wie, wenn Pilze vorhanden sind?

3. Gelingt die Synthese der Pflanzenkeimlinge mit einem der isolierten Pilze?

Die vorliegende Arbeit wurde vom Sommer 1930 bis Frühjahr 1935 im Institut für spezielle Botanik an der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich ausgeführt. Ich danke Herrn Prof. Dr. E. G ä u m a n n herzlichst für die Anregung zu der Arbeit, wie auch für das freundliche Interesse, welches er mir stets bewiesen hat.

## II. Vorversuche.

Da sämtliche Orchideenarten eine anscheinend obligate Mykorrhiza zeigen, (Arbeiten von Bernard [1909], Burgeff [1931], Ziegenspeck [1925]), machte ich zuerst den Versuch, verschiedene Orchideensamen zum Keimen zu bringen. Verwendet wurden einheimische Erdorchideen, deren Samen aus dem Institutsgarten stammten, sowie einige tropische Formen, die uns eine Gärtnerei freundlichst zur Verfügung stellte. Als Nährboden diente Malzagar, (1,7 % Agar, 4 % Malzextrakt nach Dr. Wander) oder Agar + Lösung B.

Lösung B =	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,0 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25 g	Glukose	22,0 g
	MgSO <sub>4</sub>	0,25 g	H <sub>2</sub> O	1000,0 g
	Fe <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0,05 g		

Es kam aber nur in zwei Fällen zur Samenvergrößerung und Borstenbildung (bei *Gymnadenia conopea* und *Orchis masculus*). In einem Fall (*Cattleya Trianae*) bildeten sich ein bis zwei kleine Blättchen sowie feine Saugwurzeln. Die Keimlinge wurden aber nur 1 bis 2 mm lang und starben dann ab. Auch durch Hinzuimpfen von isoliertem Pilzmaterial konnten sie nicht zur Weiterentwicklung gebracht werden. Infolgedessen wurden diese Vorversuche nicht weiter geführt.

Weitere Versuche gingen von der Erwägung aus, nach Möglichkeit wurzelpilzführende Pflanzen zu verwenden, die leicht keimen und deren Keimlinge rasch genug wachsen, um innerhalb kürzester Frist Synthesversuche mit ihnen ausführen zu können. Auf diese Weise kamen wir zu den drei in der Einleitung genannten Versuchspflanzen.

### III. Kultur der Versuchspflanzen und Synthesversuche.

#### A. *Salix repens*.

Da die Wurzeln von *Salix repens* von einem deutlich sichtbaren Pilzmantel umgeben sind und der Pilz sich leicht isolieren ließ, fixierte und schnitt ich einige Wurzeln. Zum Fixieren gebrauchte ich in allen Präparaten Juel I (Platinchlorid) oder Juel II (Zinkchlorid 2 g, Eisessig 2 ccm, Alkohol 50 % 100 ccm). Zum Färben benutzte ich Eisenalaun-Hämatoxylin oder Safranin-Baumwollblau, gelöst in Laktophenolalkohol.

Abb. 1 zeigt einen Querschnitt durch eine Weidenwurzel. Der Pilz dringt nur wenig tief ins Innere der Wurzel ein. Deutlich sichtbar sind die Pilzfäden nur in der Epidermis sowie außerhalb derselben, wo sie mehrschichtig übereinander liegen. Innerhalb der Epidermis folgt gleich eine Schicht großer, dickwandiger Zellen, angefüllt mit feinverteilten Körnchen, wahrscheinlich ist es koaguliertes Eiweiß. An einer Stelle sieht man das Eindringen des Pilzes in eine Epidermiszelle, doch hat es den Anschein, als sei die Zellwand noch nachträglich aufgesprungen.

Ich wollte nun den Versuch machen, durch Stecklinge in Wasserkultur pilzfreie Wurzeln zu erhalten. Stengelstücke von *Salix repens* wurden oberflächlich mit Calciumhypochloritlösung abgewaschen und in steriles Leitungswasser gebracht, mit dem Wattepfropfen festgeklemmt und im Kalthaus aufgestellt. Nach vier bis fünf Wochen waren überall kleine Blätter ausgetrieben, und lange Wasserwurzeln hatten sich gebildet (Mitte Januar). Die Adventivwurzeln sind sehr dünn und unterscheiden sich

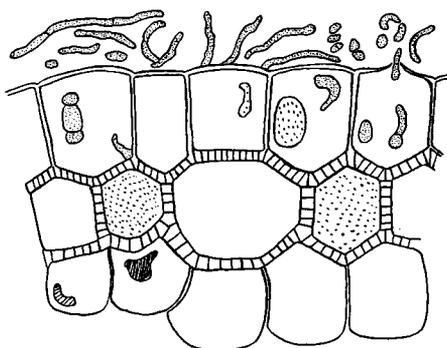


Abb. 1.  
*Salix repens*-Wurzel.  
Querschnitt  $\times 250$ .

anatomisch von den echten Wurzeln durch zahlreiche Luftkanäle, Fehlen der Wurzelhaube und weiterer Schutzvorrichtungen gegen mechanische Verletzungen, sowie auch durch eine wenig differenzierte und nicht verdickte Endodermis. Die so erhaltenen Stecklinge wurden in Richardsche Nährlösung mit niedrigem Zuckergehalt überführt.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,5 g	$(\text{NH}_4)\text{NO}_3$	10,0 g
$\text{MgSO}_4$	2,5 g	Glukose	0,5 g
$\text{KNO}_3$	4,0 g	$\text{H}_2\text{O}$	1000,0 g

Beim Umsetzen mußten die Wurzeln desinfiziert werden, da die Infektionsgefahr sonst zu groß gewesen wäre. Um die Stecklinge länger frisch zu halten, wurden sie unter Glasglocken mit befeuchteter Luft gestellt.

Mit den auf solche Weise erhaltenen Stecklingen wurden folgende Versuche gemacht:

1. Die Wurzelspitzen tauchten in Kulturen des isolierten Pilzes in flüssiger Nährlösung ein. Nach drei Tagen waren alle Blätter abgestorben und die Stengel schwarz geworden.

Kontrolle: Die Pflanzen, deren Wurzeln in Nährlösung ohne Pilz eintauchten, waren nach vier Tagen noch unverändert frisch.

Die giftige Wirkung der Pilzlösung hängt wahrscheinlich von Welkestoffen ab, welche durch den Stoffwechsel ausgeschieden werden (Großmann, 1934). Die Zusammensetzung dieses Toxins ist noch nicht bekannt.

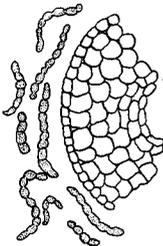


Abb. 2.  
Querschnitt  
durch infizierte  
Wasserwurzel  
von  
*Salix repens*.

2. Die Stecklinge wurden in Lösung Knop überführt.

Zusammensetzung:

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	1,2 g
$\text{MgSO}_4$	0,3 g
$\text{KNO}_3$	0,3 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,3 g
$\text{H}_2\text{O}$	1000,0 g

Bei der Hälfte der Kulturen wurde der Pilz hinzugeimpft. Nach 14 Tagen waren die meisten Wurzelspitzen von einem dichten, weißen Pilzmantel umgeben. Blätter und Stengel der infizierten Pflanzen, wie auch der pilzfreien Kontrollen, waren verdorrt. Mikrotomschnitte durch infizierte Wasserwurzeln (Abb. 2) zeigen jedoch, wie es sich nur um eine oberflächliche Verpilzung handelt, daß hingegen keine Hyphen ins Innere der Wurzel eingedrungen sind. Dieser Umstand, sowie die veränderte Anatomie der Wasserwurzel und die Hinfalligkeit der Stecklinge führten dazu, die Kultur derselben aufzugeben und zunächst einen Versuch mit *Salix*samen zu machen.

Die Samen reifen Ende Mai, keimen sofort und verlieren ihre Keimfähigkeit nach zwei bis drei Wochen. Sie sind ein bis zwei Millimeter lang, grün, in einen dichten Pelz von Flugaaren eingehüllt, die sich nicht benetzen lassen und ein Desinfizieren der Samen verunmöglichen. Durch Abschwemmen und Zentrifugieren ließen sich die Haare jedoch zum größten

Teil entfernen; hierauf konnten die Samen mit 1% Sublimatlösung desinfiziert werden.

Dann wurden sie in 400 ccm Erlenmeyerkolben gebracht, deren Boden 3—4 cm hoch mit feinem Quarzsand (Korngröße 2 mm) bedeckt war, getränkt mit Knopflösung + Zusatz einer Spur Eisenchlorid. Der Nährboden wurde während 40 Minuten bei 120° C sterilisiert, dann gab ich die Samen mit einer sterilen Pinzette hinein.

Von 160 derart beschickten Kolben blieben 60 ohne Keimung, entweder waren die Samen taub oder zu alt, oder das Sublimat hatte die Keimfähigkeit zerstört. In 100 Kolben begannen schon nach zwei Tagen die meisten Samen zu keimen. Nach sechs Wochen waren die Keimlinge etwa 2 cm hoch und hatten außer den Kotylen 1—2 kleine Blätter. Nach

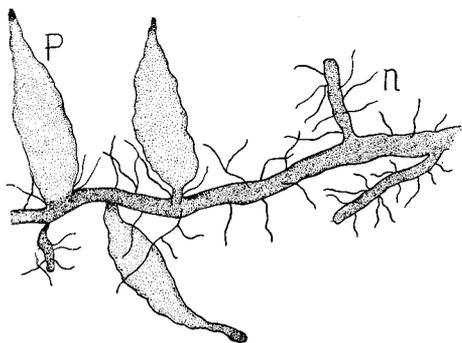


Abb. 3 a.

Wurzel von *Schoenus ferrugineus* ( $\times 7$ ).  
P = Pilzwurzel, n = normale Wurzel.

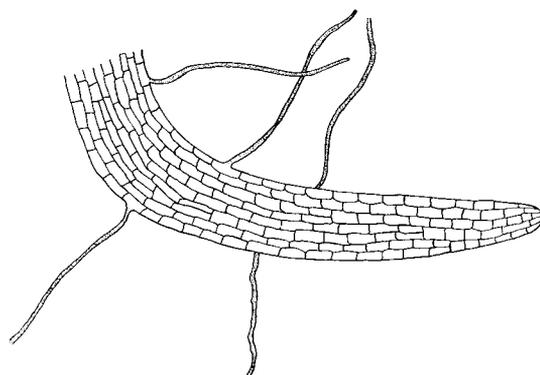


Abb. 3 b.

Normale Seitenwurzel  
von *Schoenus ferrugineus*.

Ablauf von weiteren sechs Wochen schienen sie kaum gewachsen zu sein, waren sehr zart und deshalb zum Versetzen in ein flüssiges Nährmedium und zur Synthese ungeeignet. Möglicherweise ist es der Mangel an CO<sub>2</sub> in den mit Watte verschlossenen Kolben, welcher das Wachstum derart hindert; noch wahrscheinlicher liegt aber eine natürliche Hemmung vor, in der Weise, daß auch in der Natur die Keimlinge in diesem ersten Stadium überwintern und erst im folgenden Frühjahr weiterwachsen.

Ich beschränkte mich deshalb auf die Untersuchung des isolierten Pilzes, ohne mit Weidensamen weitere Syntheseversuche zu machen.

### B. *Schoenus ferrugineus*.

In der Arbeit von Stahl (1900) stehen die *Cyperaceen* unter den Pflanzenfamilien, bei denen keine Fälle von Mykorrhiza vorgefunden wurden. Stahl sieht die Ursache hierzu in der starken Wasserdurchströmung der Pflanze. Auch Schlicht, der schon 1888 eine lange Liste von wurzel-

pilzföhrenden Pflanzenarten aufgestellt hatte, fñhrt darin kein Glied der Familie der *Cyperaceen* an, und Rippel (1931) stellt fest, daß wohl drei Viertel aller mitteleuropäischen Pflanzen verpilzt seien, mit sicherer Ausnahme der Glieder der *Cruciferen*, der *Cyperaceen* und der submersen Pflanzen.

Umso erstaunlicher erscheint es, daß wir an Stocken der rostigen Kopfbinse (*Schoenus ferrugineus*), die Herr Dr. W. Koch im Glattal gesammelt hatte, zwischen den normalen zahlreiche außerordentlich verdickte Wurzeln fanden (Abb. 3 a). Auch später an der Limmat gesammeltes Material bestätigte das regelmäßige Vorkommen der Anschwellungen.

Diese sind an jungen Wurzeln fast weiß, werden später gelb-braun und zuletzt beinahe schwarz. Sie sind  $\pm 4$  mm lang, im unteren Drittel

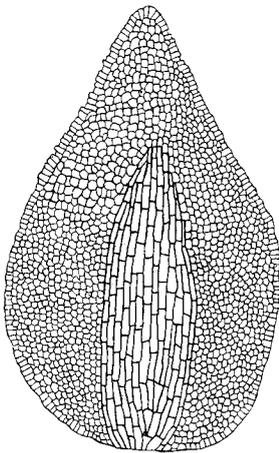


Abb. 4 a.  
Längsschnitt.  
Pilzsack  
von *Schoenus*.

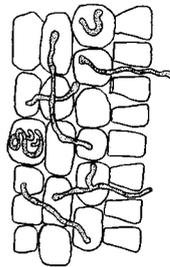


Abb. 4 b.  
Randzellen eines  
*Schoenus*-Pilzsackes  
mit Hyphen.

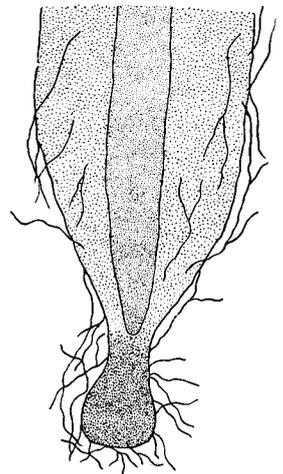


Abb. 4 c.  
lterer Pilzsack  
von außen.  
Spitze abgestorben.

1 bis 1,5 mm breit und spitzen sich gegen vorne zu. Die Spitze ist häufig dunkel verfärbt. Sie tragen keine Wurzelhaare, sind an jungen Wurzeln prall, später schrumpft ihre Oberfläche etwas ein. Die normalen Seitenwurzeln gleicher Ordnung (Abb. 3 b) sind 2 bis 3 mm lang,  $\pm 2,5$  mm breit, werden an der Spitze nicht schmäler und sind an jungen Wurzeln weiß, an älteren braun. Sie tragen, mit Ausnahme des vorderen Viertels, reichlich Wurzelhaare.

An Handschnitten der Anschwellungen (Abb. 4 a) sehen wir in der Mitte einen dunkeln Streifen aus fest aneinandergefgten, länglichen Zellen. Er besteht aus 8 bis 12 Längs-Zellreihen und entspricht in Breite und Bau der normalen Wurzel. Daran schließt sich ein helles Gewebe aus parenchymatischen Zellen an, 15 bis 25 Reihen breit, die Zellen sind

klein und abgerundet. Nur diejenigen der äußersten Schicht sind radial verlängert und etwas vergrößert (Abb. 4 b).

Die Anschwellungen sind regelmäßig verpilzt. Abb. 4 b zeigt das Eindringen der Hyphen zwischen die Epidermiszellen, Abb. 4 c das untere Ende eines älteren Säckchens, reichlich von Pilzhypfen umspinnen. Abb. 5 a und b stellen Stücke von Mikrotomschnitten durch Pilzsäcke dar. Hier sind die Hyphen in kleineren Zellgruppen des Parenchyms angehäuft und meist quer oder ein wenig schräg geschnitten.

Die Isolierung des Pilzes und seine Eigenschaften werden in einem späteren Abschnitt besprochen, zu Syntheseversuchen konnte der Pilz nicht benutzt werden. Es läßt sich daher noch nicht sagen, ob die Verdickung durch einen spezifischen Reiz des Pilzes entsteht.

Nach den Beschreibungen von Melin (1923) und Masui (1931) entstehen die Knollen der Koniferen-Mykorrhiza durch den Pilzmantel,

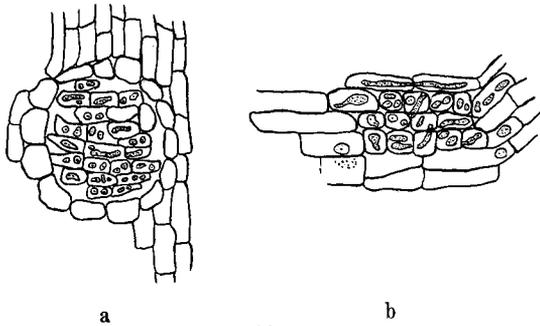


Abb. 5.

Schnitte durch ein Pilzsäckchen von *Schoenus ferrugineus* ( $\times 70$ ).

dessen Zellen ein Pseudoparenchym bilden, während der Bau der Wurzel im Innern unverändert ist.

Die Säcke von *Schoenus* dagegen sind echte Tumorbildungen, wie sie meines Wissens in der Mykorrhiza-Literatur noch nicht beschrieben worden sind.

Die Samen von *Schoenus* wurden Ende Juni gesammelt, aus den Spelzen herausgeschält und eine halbe Stunde in schwacher Chlorkalklösung desinfiziert. Als Nährmedien dienten:

1. Malzagar in schräger Schicht.
2. Ein Gemisch von fein gemahlenem Sphagnum und Polypodium, getränkt mit Leitungswasser.
3. Dasselbe, getränkt mit einer Nährlösung.

In allen drei Fällen waren teils sterile Samen allein ausgesät, teils kleine Stücke des Myzels des isolierten Pilzes dazu geimpft worden, ein Teil der Kulturen wurde während einer Woche im Kühlkeller bei  $\pm -1^{\circ}\text{C}$  aufgestellt. Nirgends konnte eine Keimung beobachtet werden. Ich übergab

daher die Samen Herrn Dr. Koblet (Versuchsanstalt Oerlikon), welchem ich für seine Bemühung bestens danke. Er setzte die Samen sechs Tage lang trockener Kälte aus, hielt sie danach sehr feucht und erzielte durch diese Maßregeln einen Keimling aus dem zahlreichen Material. Dieser wurde etwa 3 cm lang, wuchs nicht weiter und war sehr zart gebaut, so daß auch in diesem Falle nicht an Syntheseversuche gedacht werden konnte.

Die eine Keimung, welche erreicht wurde, zeigt aber doch, daß es sich nicht um ein absolutes Keimungshindernis handeln kann, sondern

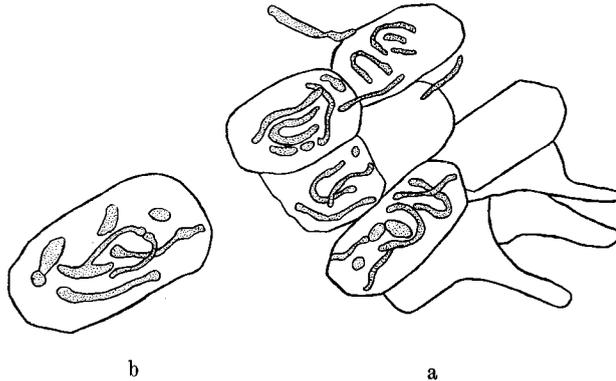


Abb. 6.  
 Handschnitt einer frischen Wurzel von *Acer platanoides*  
 (Safranin-Baumwollblau).  
 a)  $\times 125$ . b) Eine Zelle mit Myk. ( $\times 165$ ).

daß offenbar längere Ruhezeit und Einwirkung der Winterkälte dazu notwendig sind. In der Arbeit von Kinzel (1913) werden die Keimungsbedingungen von *Schoenus* nicht erwähnt.

### C. *Acer pseudoplatanus* und andere Acerarten.

#### a) Keimungsversuche mit verschiedenen Acerarten.

An Handschnitten junger, noch unverzweigter Wurzeln von einjährigen *Acer platanoides* (Abb. 6) bemerkte ich, daß die Zellen mit zahlreichen, verschlungenen Pilzfäden angefüllt waren. Auch Mikrotomquerschnitte von *Acer pseudoplatanus* (Abb. 7) zeigten beinahe alle Zellen der Rindenschicht durchsetzt von Hyphen. Außerhalb der Epidermis fand ich nur wenige Fäden, konnte auch leider in keinem Präparat eine Stelle finden, wo der Pilz ins Innere der Wurzel eindringt. In dem Längsschnitt (Abb. 8) weist an einem Punkt die Zellwand am Durchbruch des Pilzes eine Verdickung auf, wie sie der von Burgeff beschriebenen Buchsenbildung entspricht.

An manchen Stellen (Abb. 7) sind die Hyphenschlingen in den Zellen nicht deutlich zu erkennen. Es ist aber schwierig zu entscheiden, ob es sich um Pilzverdauung handelt oder um Schrumpfungsvorgänge bei der

Fixierung. Auch dunklere Farbklumpen, besonders in den äußeren Zellen, können ebensogut koaguliertes Eiweiß sein wie sonstige Zelleinschlüsse oder Ueberreste verdauter Hyphen.

Unterschiede zwischen Pilzwirts- und Pilz-Verdauungszellen waren nicht zu erkennen.

Es gelang auch, den Pilz zu isolieren, obschon Frank ausdrücklich festgestellt hatte, daß sich bei Ahorn keine Mykorrhizen vorfinden. Zu den ersten Syntheseversuchen gebrauchte ich einjährige Keimpflanzen von

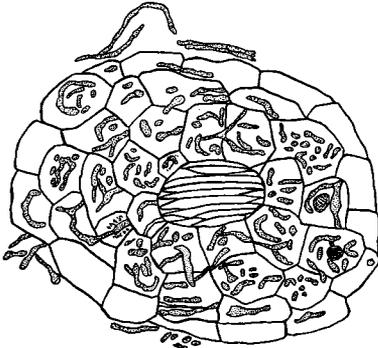


Abb. 7.  
*Acer pseudoplatanus.*  
3 jährige Wurzel (Querschnitt).  
× 35.

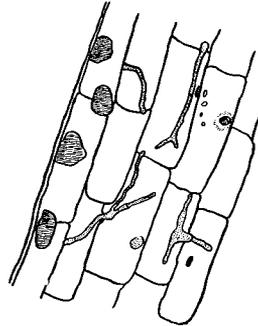
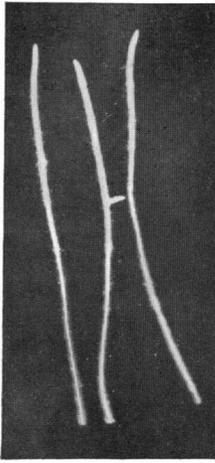
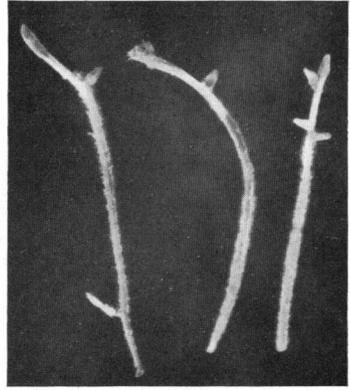


Abb. 8.  
*Acer pseudoplatanus.*  
3 jährige Wurzel (Längsschnitt),  
in den Randzellen dunkle Farbflecken.  
(Protoplasma?) (× 85).

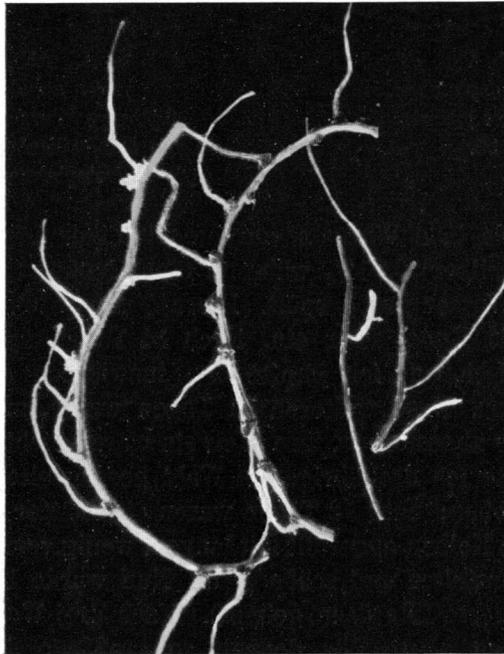
*Acer pseudoplatanus.* Die Wurzeln wurden mit einer Lösung von Uspulun (Chlorphenolquecksilber) 0,25% während einer halben Stunde desinfiziert und in sterilem Wasser gut gespült. Hierauf setzte ich 15 Pflänzchen in Reagensgläser mit Knopflösung ein. Nach 14 Tagen waren die meisten Pflanzen noch frisch, und ich impfte den inzwischen aus den Wurzeln isolierten Pilz dazu. Nach weiteren 11 Tagen waren, mit Ausnahme von drei Kulturen, alle abgestorben, ihre Wurzeln waren nicht mehr gewachsen. Ferner verwendete ich dreijährige, im Wald gesammelte Ahornpflänzchen. Desinfektion wie oben; nach 13 Tagen waren die Blätter etwas gewachsen, nach 27 Tagen die Kolben angefüllt mit langen, wenig verzweigten Wurzeln, die Blätter voll entfaltet und schön grün. Nun wurde bei der Hälfte der Kulturen der isolierte Pilz dazu geimpft. Nach drei Wochen, am 20. Mai, waren die Pflanzen ohne Pilz doppelt so groß wie die mit Pilz, von letzteren überhaupt nur noch drei am Leben. Am 9. Juni hatten die Pflanzen ohne Pilz zehn bis zwölf Blätter, die mit Pilz deren zwei bis fünf. Die Wurzeln der letzteren zeigten deutlich die korallenartigen Verzweigungen der Mykorrhiza (Abb. 9). Diese Ergebnisse lassen auf eine stark pathologische Wirkung der Infektion schließen. Da uns zur Impfung ganz junge, möglichst steril herangezogene Pflanzen erwünscht er-



a



b



c

phot. Prof. Rüst.

Abb. 9.

Wasserwurzel von *Acer pseudoplatanus*.

- a) Ungeimpft. b) Geimpft mit dem aus *Salix* isolierten Pilz.  
c) Geimpft mit dem aus *Acer* isolierten Pilz.

schiene, machten wir den Versuch, die Samen von *Acer pseudoplatanus*, *Acer platanoides*, *Acer negundo*, *Acer tataricum*, *Acer polymorphum*, *Acer saccharinum* und *Acer dasycarpum* keimen zu lassen. Sämtliche Samen müssen eine Ruhezeit an kühlem Ort durchmachen und keimen erst im zeitigen Frühjahr (ab Februar). Das Stratifizieren der Samen, wie es von Gärtnern ausgeübt wird (d. h. das Aufbewahren der Samen in Schichten zwischen Sand und Moos), um sie erst nachher zu desinfizieren, bewährte sich nicht. Viele Samen waren hernach angefault oder sie hatten schon begonnen zu keimen, so daß die Desinfektionsmittel die zarten Wurzeln schädigten. Auch das Behandeln mit Uspulun war nicht wirksam, da das Abspülen mit sterilem Wasser die notwendige Nachwirkung des Mittels hinderte. Die beste Erfahrung machte ich mit folgendem Vorgehen: Im Herbst (Oktober bis November) Sammeln der Samen, möglichst direkt vom Baum, Entfernen der Flügel, oberflächliche Reinigung in lauwarmem Wasser, welches gleichzeitig die Fruchtschale etwas aufweicht, Schälen, Sterilisieren in Sublimatlösung 1 % drei bis vier Minuten, Nachspülen in sterilem Wasser und Überführen von fünf bis sechs Stück in 400er Erlenmeyerkolben mit Quarzsand und Knopflösung. Der Sand muß gut feucht sein, ohne daß jedoch die Flüssigkeit übersteht.

Diese Kolben standen während des ganzen Winters im Kühlraum bei  $\pm 0^{\circ}\text{C}$ . Im Februar begannen die Samen zu keimen, blieben aber im Kühlen und Dunkeln bis Ende März. Nun waren die Wurzeln 4 bis 5 cm lang, die Kolylen entfaltet und die erste Knospe ein Stück weit herausgewachsen. Die verschiedenen Sorten von Ahornsamen keimten nicht alle gleich gut, auch zeigte es sich, daß man nicht wohl daran tat, gekaufte Samen zu verwenden, deren Alter man nicht kannte. Ich beschränkte mich daher für weitere Aussaaten auf selbstgesammeltes Material von *Acer pseudoplatanus*.

Die Keimungsprotokolle der anderen Arten sollen jedoch, wenn auch kurz, angeführt werden. In sämtlichen Fällen wurden die Keimlinge, sobald sie genügend erstarkt waren, aus den Kolben herausgenommen, im Impfkasten einzeln in Knopflösung versetzt und die Berührungsstelle zwischen Glas und Wattepfropf mit Watte umwickelt. Die Wurzeln blieben auf diese Art steril, während die Blätter sich frei entfalten und assimilieren konnten, da die Kulturen nun an ein Nordfenster gestellt wurden.

*Acer polymorphum*: keine Keimung.

*Acer tataricum*: einige vereinzelte Keimungen.

*Acer negundo* (stratifizierte Samen):

23. April, gesät.

12. Mai, in Kolben mit Knopflösung versetzt.

19. Juli, geimpft.

3 Exemplare Kontrolle.

4 Exemplare mit Pilz aus *Acer pseudoplatanus*.

3 Exemplare mit Pilz aus *Salix repens*.

Alle Pflanzen gleichmäßig, mit langgestreckten Trieben, 14 bis 16 Blättern, stark verzweigten Wurzeln.

Anfang September, Laubfall, Triebe gesund, Wurzeln unverändert. Folgendes Frühjahr, kein Blattausschlag, Stämmchen abgestorben.

Alle Kulturen gleichmäßig, keine Infektion.

*Acer saccharinum* (stratifizierte Samen):

6. Mai, gesät.

23. Mai, in Knopflösung versetzt.

19. Juli, geimpft, je drei Exemplare wie bei *Acer negundo*.

Die Pflanzen blieben alle sehr kurz, dunkelgrün, mit etwa sechs Blättern, spärliche, wenig verzweigte Wurzeln.

Anfang September, Laubfall, Wurzeln unverändert.

Folgendes Frühjahr, alle Kulturen abgestorben. Keine Infektion.

*Acer dasycarpum*: 20. Juni, gesät.

10. Juli, in Knop versetzt.

22. August, geimpft, Samen rasch und gut keimend, aber schwierig steril zu erhalten, da sie fettig sind. Keine Infektion, die Hälfte der Pflanzen gut entwickelt, der Rest verkümmert, stark chlorotisch.

*Acer pseudoplatanus*: gesät im Oktober, im Kühlraum überwintert und gekeimt.

26. Mai, 23 Exemplare in Knopflösung überführt.

6 Exemplare zur Kontrolle.

10 Exemplare geimpft mit Pilz aus *Acer pseudoplatanus*.

7 Exemplare geimpft mit Pilz aus *Salix repens*.

Alle mit 4 bis 6 Blättern, jedoch von verschiedener Größe.

9. Juni, die Kontrollpflanzen haben kurze Triebe, die Blätter sind gleichmäßig grün. Geimpfte Pflanzen haben gestreckte Triebe, die Blätter sind klein, rötlich angelaufen.

20. Juni, die Pflanzen sind 20 bis 30 cm lang, haben 8 bis 12 Blätter; alle sind etwas rot gefärbt, die Wurzeln sind zum Teil vom Pilz angegriffen.

20. Juli, die neuentwickelten Blätter sind klein, bleich und etwas kraus, an den Wurzeln der geimpften Pflanzen (beider Pilzsorten) entwickelten sich rosettenartige Knöllchen und kleine verdickte Seitenwurzeln.

Anfang September, Laubfall.

Kontrollen mit normalen Wurzeln, sehen kräftiger aus als die geimpften.

Die Anzucht von sterilen Keimlingen ist also bei den meisten *Acer*-arten möglich, wenn auch schwierig, da immer ein großer Teil der Samen überhaupt nicht keimfähig ist. Die Samen sind auch häufig nicht steril; besonders nach feuchtem Herbstwetter sind viele mit Pilzen infiziert, welche der Desinfektion widerstehen und auch bei  $-1^{\circ}\text{C}$  noch üppig wachsen. Zu intensive Desinfektion zerstört im übrigen die Keimfähigkeit des Samens. Aus diesen Gründen standen nur wenige Exemplare jeder Art zur Verfügung. Eine Bildung von Mykorrhizen wurde nur bei *Acer pseudoplatanus* erreicht, und zwar durch zwei Pilze, die sich wohl äußerlich sehr ähnlich sahen, aber aus Pflanzen zweier Phanerogamenfamilien isoliert worden waren.

b) Einwirkung differenzierter Nährlösungen auf die Keimlinge.

Im folgenden Herbst säte ich nochmals etwa 2000 Samen von *Acer pseudoplatanus* in der oben beschriebenen Weise aus. Durch Infektionen

der Samen und Schwarzwerden der jungen Wurzelspitzen wurde jedoch der Abgang so groß, daß im Frühjahr nur noch etwa 100 zu weiteren Versuchen geeignete Keimlinge zur Verfügung standen.

Diese mußten zunächst in Knopflösung noch etwas erstarken und wurden erst nach Entfaltung von zwei bis vier Blättern in differenzierte Nährlösungen versetzt.

Hier variiert der Gehalt von Kalium, Stickstoff, Kalzium und Phosphor von normal (n) auf Halbnormal (n/2), Doppelnormal (2n) und Vierfachnormal (4n). Die als Normal (n) bezeichnete Lösung enthält pro Liter H<sub>2</sub>O:

0,21 g Ca, 0,20 g K, 0,18 g N, 0,14 g P,

was den Mengen der gewöhnlichen Knopflösung entspricht.

Ferner wurden einige Kulturen angelegt mit Knopflösung und Lösungen, worin der Reihe nach Ca, K, N und P weggelassen wurde, = 0 Ca, 0 K, 0 N, 0 P (Tabelle 1).

Tabelle 1.

## Zusammensetzung der differenzierten Nährlösungen für Acerkeimlinge.

Bei jeder Lösung H<sub>2</sub>O 1000,0 g, MgSO<sub>4</sub> 0,3 g, FeCl<sub>3</sub> Spur.

Ferner:

Bezeichnung der Lösung	KNO <sub>3</sub> g	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> g	(NH <sub>4</sub> )NO <sub>3</sub> g	(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> g	CaNO <sub>3</sub> ·4H <sub>2</sub> O g	CaHPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> g
n. . . . .	—	0,45	0,52	—	—	0,88	—
K n/2 . . .	—	0,23	0,52	—	—	0,88	—
K 2n . . .	—	0,90	0,52	—	—	0,88	—
K 4n . . .	—	1,80	0,52	—	—	0,88	—
N n/2 . . .	—	0,45	0,26	—	—	0,88	—
N 2n . . .	—	0,45	1,04	—	—	0,88	—
N 4n . . .	—	0,45	2,08	—	—	0,88	—
Ca n/2 . . .	—	0,45	—	0,12	0,62	—	—
Ca 2n . . .	—	0,45	—	0,50	2,48	—	—
Ca 4n . . .	—	0,45	—	1,00	4,96	—	—
P n 2 . . .	—	0,45	0,23	—	0,60	0,44	—
P 2n . . .	—	0,45	0,43	0,25	—	0,88	—
P 4n . . .	—	0,45	0,49	0,75	—	0,88	—
Knop . . .	0,30	—	—	—	1,20	—	0,30
0 Ca . . .	0,30	—	0,40	—	—	—	0,30
0 K . . .	—	—	—	0,30	1,20	—	—
0 N . . .	—	—	—	—	—	—	0,90
0 P . . .	0,60	—	—	—	1,00	—	—

Es wurden pro Nährlösung fünf bis sechs Keimlinge angesetzt, wovon je zwei mit dem Pilz von *Acer* geimpft wurden. Trotzdem das Myzel an nicht zu kleinen Agarstücken hing, wuchs der Pilz in der zuckerfreien Lösung gar nicht heraus, in keinem Fall fand eine Infektion statt.

Die Daten der auf diese Weise behandelten Kulturen sind:

Aussaat im Oktober 1933.

Versetzen in Knopflösung im März 1934.

Tabelle 2.  
Wachstum der Ackerkeimlinge in differenzierten Nährlösungen.

Lösung nach Tabelle 1	Anzahl der Kulturen	Blattzahl am 4. Juli	Blattzahl Ende September	Blattfläche je Pflanze cm <sup>2</sup>	Trockengewicht der Blätter mg	Wurzellänge cm	Stammlänge cm
n . . . . .	4	4,5 ± 1,0	3,5 ± 0,5	20,8 ± 3,4	(54,2 ± 9,3)	12,0 ± 1,5	12,5 ± 0,9
K n/2 . . . . .	5	4,8 ± 0,5	4,4 ± 0,6	17,7 ± 2,3	(50,6 ± 7,9)	11,6 ± 2,2	9,4 ± 0,2
K 2n . . . . .	4	5,5 ± 1,5	3,5 ± 1,5	16,3 ± 3,1	(49,5 ± 12,8)	12,0 ± 0,9	9,5 ± 0,9
K 4n . . . . .	6	5,0 ± 0,6	3,2 ± 0,5	15,8 ± 4,6	(34,8 ± 13,5)	9,8 ± 1,9	10,8 ± 0,5
N n/2 . . . . .	4	4,4 ± 0,4	5,2 ± 0,7	31,1 ± 3,1	(102,7 ± 8,1)	12,7 ± 2,8	12,0 ± 0,6
N 2n . . . . .	3	5,3 ± 0,7	6,0 ± 1,1	14,6 ± 2,2	(82,6 ± 5,2)	10,7 ± 1,4	11,3 ± 1,2
N 4n . . . . .	4	3,5 ± 0,5	3,5 ± 0,5	22,2 ± 2,2	(61,4 ± 5,2)	6,2 ± 2,0	10,8 ± 0,9
Ca n/2 . . . . .	4	6,0 ± 1,2	10,8 ± 2,7	65,8 ± 22,3	(112,7 ± 31,4)	27,8 ± 4,1	14,8 ± 1,0
Ca 2n . . . . .	5	4,0 ± 0,6	3,6 ± 0,6	23,7 ± 1,5	(82,8 ± 3,7)	5,0 ± 0,2	11,4 ± 0,2
Ca 4n . . . . .	5	6,0 ± 0,6	5,2 ± 0,9	23,5 ± 2,3	(72,4 ± 8,9)	8,4 ± 1,0	12,4 ± 1,0
P n/2 . . . . .	6	5,2 ± 0,8	4,5 ± 0,3	27,0 ± 9,8	(90,3 ± 6,8)	8,7 ± 1,5	11,5 ± 0,6
P 2n . . . . .	4	4,5 ± 1,0	4,0 ± 0,7	27,0 ± 3,5	(88,5 ± 31,1)	6,0 ± 1,1	11,5 ± 0,3
P 4n . . . . .	4	3,5 ± 0,5	4,0 ± 0,5	20,7 ± 3,5	(94,0 ± 11,0)	5,8 ± 1,2	13,0 ± 1,1
Knop . . . . .	4	7,0 ± 2,4	5,5 ± 0,9	38,2 ± 8,4	(107,8 ± 2,1)	19,5 ± 4,1	18,0 ± 0,7
0 Ca . . . . .	4	7,0 ± 1,3	7,8 ± 1,7	55,4 ± 20,8	(145,5 ± 50,8)	16,8 ± 9,3	13,2 ± 0,9
0 K . . . . .	3	7,3 ± 0,7	9,0 ± 0,4	84,2 ± 31,7	(211,7 ± 59,2)	17,7 ± 2,9	18,0 ± 1,2
0 P . . . . .	4	4,2 ± 0,6	3,8 ± 0,7	22,7 ± 3,0	(60,8 ± 8,8)	28,2 ± 4,6	11,2 ± 0,6
0 P . . . . .	4	5,0 ± 1,3	7,2 ± 2,1	57,7 ± 27,8	(87,2 ± 32,6)	13,0 ± 3,3	12,8 ± 1,1

Versetzen in die differenzierten Lösungen, 10. Juni 1934.

Verarbeiten der Kulturen im September 1934.

Die Kolbenstanden in einem Saatbeet mit Glasdeckel und Schattierung. Mitte Juli wurde das verbrauchte Wasser durch steriles, destilliertes ersetzt.

Den Einfluß auf das Wachstum zeigt Tabelle 2.

Die Blattflächen wurden mit dem Planimeter von G. Coradi gemessen, das Trockengewicht bestimmte ich nach vier Stunden bei 104° im tarierten Wägegglas. Die eingeklammerten Werte für die Trockengewichte sind errechnet aus dem Faktor 25,8 % des Frischgewichtes — dem Mittel der gewogenen Differenzen zwischen Frischgewicht und Trockengewicht. — Die Stammlänge ist gemessen vom Wurzelansatz bis zur Endknospe, die Wurzellänge vom Wurzelansatz bis zur Wurzelspitze.

Wie die Unterschiede zwischen den beiden Blattzahl-Kolonnen zeigen, fielen während der Monate Juli und August vereinzelt Blätter ab, dadurch ist in der Mehrzahl der Fälle die Menge der gemessenen und gewogenen Blätter kleiner als die der wirklich gebildeten. Neue Blätter, die noch im August entstanden, waren klein, meist etwas chlorotisch und häufig schlecht geformt. Ein großer Teil der Blätter war auf der Unterseite mit Eiern und Larven einer Mottenschildlaus (*Aleyrodes*-Art) besetzt, die den Kulturen aber noch keinen sichtbaren Schaden getan hatten und vor dem Wägen entfernt wurden.

Variation von Kalium: Bei zuerst gleichmäßiger Blattzahl zunehmender Blattverlust bei gesteigertem K, geringe Abnahme der Blattfläche, stärkere Gewichtsabnahme, Schwankung der Länge gering, die zuletzt gebildeten Blätter klein und gelb oder rötlich gefärbt.

Variation von Stickstoff: Kulturen mit N n/2 zeigten besseres Wachstum als die mit N n, bei gesteigertem N Abnahme von Fläche und Gewicht. Wurzeln schlecht ausgebildet, besonders bei N 4n gar keine Wurzelfasern, die Blätter mit wenigen Ausnahmen schön grün, mit sehr langen Blattstielen.

Variation von Kalzium: Hier zeigte sich der Nachteil von zu starken Gaben eines einzelnen Nährstoffes besonders deutlich. Ca n/2 hatte außergewöhnliche Blattzunahme, Maximum aller Kulturen an Blattfläche und Trockengewicht, sehr lange Wurzelfasern. Bei Ca 4n waren sämtliche Blätter und die oberen Stammteile verdorrt, ein Teil der Blätter schon abgefallen, die Wurzeln kurz. Anfang Juli waren diese Unterschiede noch nicht zu sehen.

Variation von Phosphor: Blattzahl wenig geändert, Flächenzunahme gegenüber P n gering, innerhalb der Fehlergrenze liegend, Gewichtszunahme bei P n/2, 2n, 4n etwa 70 % gegenüber P n. Wurzeln kurz.

Die eigentliche Knopplösung erwies sich viel günstiger für das Wachstum, als die von mir zusammengestellte n-Lösung. Blattfläche, -zahl, -trockengewicht gleichmäßig doppelt so groß, mit viel kräftigeren Wurzeln bei annähernd gleicher Stammlänge. Eine nochmalige Verdopplung von Fläche und Gewicht und besonders große Pflanzen ergaben die Kulturen ohne Kali, eine Erscheinung, die bei der geringen Anzahl der Kulturen nicht unter-

sucht werden konnte und daher ohne Erklärung registriert sei. Den erwarteten Rückgang zeigten nur die Kulturen ohne Stickstoff, diese ergaben Zahlen, die immer noch den Werten der sogenannten n-Lösung entsprachen bei besonders lang und kräftig entwickelten Wurzelfasern.

Die Tabelle zeigt deutlich den Einfluß der verschiedenen Nährlösungen. Die mittleren Fehler sind zum Teil groß, da die Pflanzen natürlich von Anfang an nicht in gleicher Weise entwickelt und gleich kräftig waren. Diese Fehler könnten nur durch eine sehr hohe Anzahl von Versuchspflanzen korrigiert werden, ein Versuch, der aus dem Rahmen dieser Arbeit herausfallen würde.

### c) Topfkulturen.

Da in den flüssigen Nährmedien die Pilze nicht wuchsen, wählte ich ein Dutzend Pflanzen aus, um sie in Töpfen in steriler Erde weiter zu ziehen. Zur Sterilisation trinkt man die Erde mit 2% Formalinlösung und läßt sie 48 Stunden stehen. Das Formalin wird bei 60° C im Thermostaten verdampft, die Erde mit sterilem Wasser angefeuchtet und zerkleinert. Die leeren Töpfe wurden während zwei Stunden bei 140° sterilisiert. Sieben Töpfe wurden mit dem Pilz geimpft, fünf blieben ohne diesen. Die Kulturen standen in einer Infektionskabine und wurden regelmäßig mit sterilisiertem-destilliertem Wasser begossen. Die Luft hielt man feucht. Am 4. Juli versetzte ich die Pflanzen in die sterile Erde, Ende September wurden auch diese Pflanzen untersucht. Sie zeigten alle viel stärkeres Wachstum als die in den flüssigen Kulturen. Die Blattrockengewichte betragen ungefähr 0,5 g bei ziemlich großen Schwankungen der einzelnen Pflanzen. Die Mittelwerte sind, mit Ausnahme der Stammlänge, durchwegs für die geimpften Pflanzen größer als für die ungeimpften, immerhin liegen die Differenzen innerhalb der Fehlergrenze. Wahrscheinlich würde erst eine mehrjährige Kultur ein typisches Bild ergeben. Die Wurzeln der geimpften Pflanzen waren dichter und buschiger als die der ungeimpften.

Von jeder Kultur fixierte ich einige Wurzeln und legte kleine Wurzelstücke auf Malzagar aus.

Die Verarbeitung der Pflanzen ergab folgende Werte (Tabelle 3):

Tabelle 3.  
Wachstum der Acerkeimlinge bei Kultur in steriler Erde.

	Blattzahl Mitte Juli	Blattzahl Ende September	Blatt- fläche je Pflanze cm <sup>2</sup>	Trocken- gewicht der Blätter mg	Wurzel- länge cm	Stamm- länge cm
Ohne Pilz . . . . .	5,6 ± 1,2	11,4 ± 1,6	125,4 ± 17,6	460 ± 54	18,0 ± 2,3	16,0 ± 0,9
Mit Pilz . . . . .	6,0 ± 0,9	13,6 ± 1,9	148,8 ± 14,8	508 ± 56	18,1 ± 1,7	13,0 ± 1,0

Durch Sterilisieren der Erde waren ohne Zweifel alle Keime von Bodenpilzen zerstört worden; daß solche in der geschlossenen Infektionskabine wieder eindringen konnten, ist nicht anzunehmen, dagegen ließ sich eine nachträgliche Infektion mit Schimmelpilzen aus der Luft nicht vermeiden. Deshalb mußten die ausgelegten Wurzelstücke sorgfältig mit Sublimatlösung desinfiziert werden, was eine so weitgehende Schädigung zur Folge hatte, daß leider kein Pilz mehr auswuchs. Die meisten Kulturen blieben steril, einige weniger sorgfältig desinfizierte zeigten Infektion mit *Penicillium*.

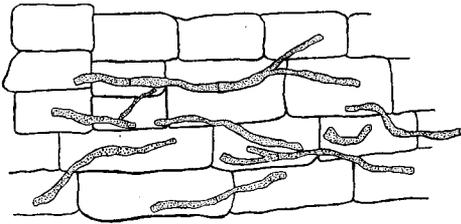


Abb. 10.  
Wurzelschnitt von *Acer*  
aus Topfkultur.  
×100.

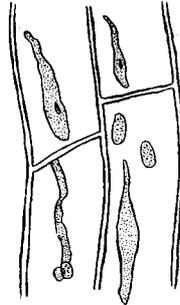


Abb. 11.  
Einzelne Randzellen  
einer *Acer*wurzel aus Topfkultur.  
×300.

Von den fixierten Wurzelstücken wurden Handschnitte hergestellt, mit Safranin-Baumwollblau-Laktophenolalkohol gefärbt. Ich fand Pilzhyphen in fünf geimpften Wurzeln, bei zwei geimpften und allen ungeimpften jedoch keine. (Abb. 10 und 11).

Bei drei pilzlosen Kulturen konnte ich keine Stärke feststellen, alle andern enthielten reichlich Stärke, besonders in den Zellen des Zentralzylinders.

#### IV. Die Wurzelpilze.

##### A. Isolierung und Nährmedien.

Zur Isolierung der Pilze verwendete ich die Methode von Bernard: Man reinigt unter der Wasserleitung kleine Wurzelstücke von anhaftendem Schmutz, desinfiziert kurz in Sublimatlösung (1‰) und spült in sterilisiertem Wasser nach. Dann zerschneidet man die Wurzel mit sterilisierten Instrumenten und gibt die so präparierten Stücke auf Malzagar (schräge Fläche in Reagensgläsern). Die gesamten Manipulationen geschehen im Impfkasten, der mit Formaldehyddämpfen regelmäßig sterilisiert wird. Objektträger als Unterlage, Skalpell und Pinzette wurden stets von neuem in Alkohol getaucht und abgeflammt. Ein großer Teil der angelegten Kulturen blieb jeweils steril, sei es, weil Stücke ohne Myzel verwendet wurden, sei es, daß die Desinfektion zu gründlich war. Infektionen mit Schimmelpilzen oder Bakterien waren ziemlich selten.

In einigen Fällen wuchs bei jeder Isolation ein Pilz aus dem Wurzelstück heraus, welcher in allen Parallelkulturen gleich aussah, aber nicht bestimmt werden konnte, da er keine Fruchtkörper bildete. Man muß diese Pilze deshalb zu den *Fungi imperfecti* rechnen.

Ich nannte sie nach dem Beispiel von Melin *Mycelium radialis* (M. R.) *Aceris pseudoplatani*, bzw. *Salicis repentis* oder *Schoeni ferruginei*. Alle drei Pilze zeigen im Habitus große Ähnlichkeit. Sie haben weißes Luftmyzel, das auf der Unterlage rasch braun wird. Die Hyphen sind überall septiert (Abb. 12 a bis c), beim *Acer*- und *Schoenus*pilz sind sie 5 bis 6  $\mu$  breit, beim *Salix*pilz nur 2 bis 3  $\mu$ . M. R. *Aceris* enthält reichlich Öl als Nahrungsreserve, die beiden andern haben nur vereinzelte Tropfen. M. R. *Salicis* und *Schoeni* schnüren an den Hyphenenden Konidien ab, die manchmal ganze Ketten bilden.

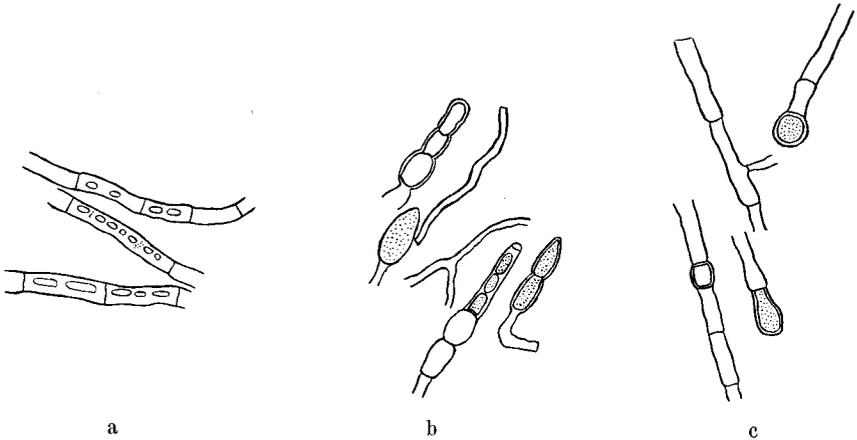


Abb. 12.

Hyphen und Konidien von:  
 a) *M. R. Aceris* b) *M. R. Salicis* c) *M. R. Schoeni*.  
 $\times 300$ .

Zum Isolieren und Aufbewahren der Pilze bewährte sich Malzagar als Unterlage, sämtliche Pilzkulturen wuchsen gut darauf.

Um die Temperaturansprüche zu prüfen, wurden die Pilze in eine zuckerhaltige Knopflösung abgeimpft. Als günstig für das Wachstum bewährte sich ein Zusatz von 4% Rohrzucker.

#### B. Temperaturansprüche der Pilze.

Beim Impfen wurden möglichst kleine Myzelstücke verwendet und je zehn Kolben in die Thermostaten gestellt ( $0^{\circ}$  bis  $36^{\circ}$ , in Abständen von je  $3^{\circ}$ , dargestellt in Tabelle 4).

Die Versuche dauerten für *M. R. Aceris* 18 Tage, für *M. R. Salicis* 21 Tage, für *M. R. Schoeni* 12 Tage. In der Tabelle sind alle Werte auf die Versuchsdauer von 18 Tagen umgerechnet.

Tabelle 4.  
Zuwachs der Pilze in flüssiger Knopflösung in 18 Tagen.

Temperatur °C	1. <i>M. R. Aceris</i> mg	2 <i>M. R. Salicis</i> mg	3. <i>M. R. Schoeni</i> mg
0	23,6 ± 0,42	26,7 ± 2,2	kein Wachstum
3	17,5 ± 2,6	16,9 ± 2,0	25,2 ± 2,2
6	35,1 ± 3,4	37,8 ± 3,9	26,1 ± 2,1
9	49,5 ± 4,5	58,4 ± 5,5	52,5 ± 2,8
12	71,3 ± 6,1	142,1 ± 18,1	106,5 ± 11,7
15	93,0 ± 7,5	235,0 ± 30,9	205,9 ± 14,7
18	132,5 ± 6,1	395,1 ± 21,0	356,7 ± 24,4
21	197,6 ± 24,0	425,1 ± 38,6	605,7 ± 48,9
24	194,3 ± 10,0	521,5 ± 27,3	756,0 ± 52,5
27	73,2 ± 15,3	416,3 ± 27,3	616,2 ± 36,1
30	14,7 ± 1,8	285,4 ± 19,2	kein Wachstum
33	Spur	247,9 ± 15,1	kein Wachstum
36	Spur	146,2 ± 11,7	kein Wachstum

Tabelle 4 zeigt, daß es sich bei den isolierten Pilzen, trotz äußerer Ähnlichkeit, um verschiedene Stämme handeln muß (Abb. 13). Der Pilz

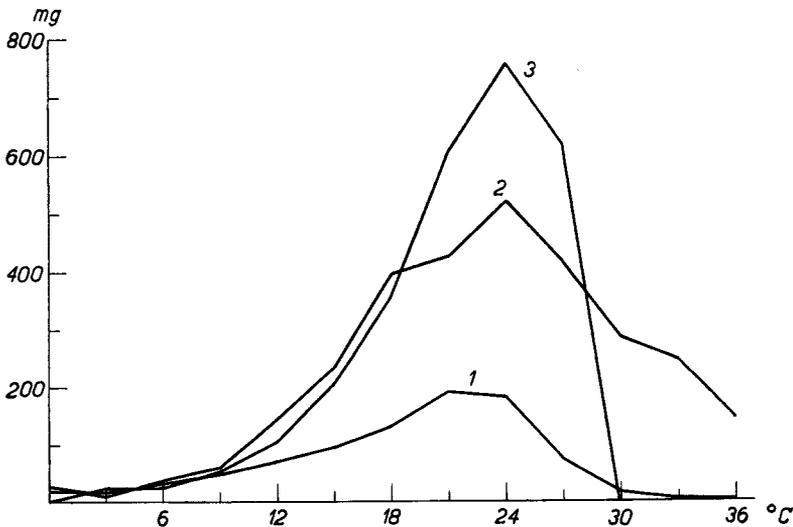


Abb. 13.  
Einfluß der Temperatur auf das quantitative Myzelwachstum.  
1 = *M. R. Aceris*. 2 = *M. R. Salicis*. 3 = *M. R. Schoeni*.

von *Schoenus* weist viel stärkeres Wachstum in engeren Temperaturgrenzen auf. Am wenigsten Myzel bildet der Pilz von *Acer*, dessen Optimum bei 21° liegt, während die Optima der beiden andern Formen bei 24° liegen. Bei 21° wächst beim *Salix*pilz doppelt soviel Myzel wie bei dem von *Acer*, bei dem von *Schoenus* dreimal so viel. Bei den Temperaturen bis 9° sind die Unterschiede zwischen den drei Formen klein, bei Temperaturen über

27° wächst einzig der *Salix*pilz, die beiden andern Kurven fallen sehr steil ab.

Eine zweite Versuchsreihe prüfte das Myzelwachstum auf festem Nährboden bei verschiedenen Temperaturen (Tabelle 5). Zu diesem Versuch wurden Kolleschalen verwendet, gefüllt mit 150 ccm Malzagar, welcher eine etwa  $\frac{1}{2}$  cm dicke Schicht bildet.

Tabelle 5.  
Zuwachs der Pilze auf Malzagar (Kolleschalen) in 18 Tagen.

Temperatur ° C	1. <i>M. R. Aceris</i> mm	2. <i>M. R. Salicis</i> mm	3. <i>M. R. Schoeni</i> mm
0	kein Wachstum	kein Wachstum	kein Wachstum
3	18,6 ± 1,1	Spuren	kein Wachstum
6	30,4 ± 0,9	25,2 ± 1,3	Spuren
9	49,0 ± 3,2	62,6 ± 2,4	21,6 ± 0,4
12	87,5 ± 1,2	92,1 ± 2,7	28,8 ± 0,5
15	96,4 ± 1,8	120,9 ± 4,1	63,0 ± 4,1
18	113,9 ± 1,5	164,6 ± 8,4	105,3 ± 5,4
21	116,2 ± 2,5	203,1 ± 4,4	131,4 ± 5,8
24	92,4 ± 12,4	221,1 ± 4,6	126,0 ± 6,1
27	verunreinigt	223,7 ± 2,4	39,6 ± 2,2
30	kein Wachstum	216,0 ± 3,3	kein Wachstum
33	kein Wachstum	100,3 ± 7,4	kein Wachstum
36	kein Wachstum	Spuren	kein Wachstum

Die Schalen haben einen Durchmesser von 170 mm. Impft man ein kleines Myzelstück, möglichst in deren Mitte, so breitet sich der Pilz strahlenförmig aus und kann von der Unterseite der Schale aus gemessen werden, wenn man diese gegen das Licht hält. Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte aus zehn Kulturen, jeder Einzeldurchmesser ist das Mittel des größten und des kleinsten Durchmessers, weil die Kreise natürlich

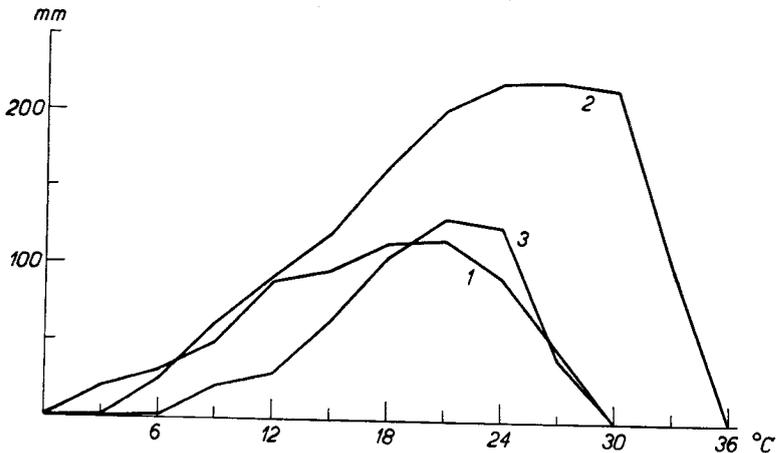


Abb. 14.

Einfluß der Temperatur auf das lineare Myzelwachstum.  
1 = *M. R. Aceris*. 2 = *M. R. Salicis*. 3 = *M. R. Schoeni*.

nicht ganz regelmäßig sind. Da auch hier das *M. R. Aceris* am langsamsten wuchs, wurden die Werte der anderen Pilze, bei welchen der Versuch früher, nach 14 Tagen, abgebrochen werden mußte, auf eine Versuchsdauer von 18 Tagen umgerechnet. (Abb. 14.)

Übereinstimmend mit Tabelle 4 zeigt *M. R. Salicis* das stärkste Wachstum. Ebenso liegt das Optimum, wie bei den flüssigen Kulturen, für *M. R. Aceris* bei 21° C, für *M. R. Salicis* bei 24° C, für den dritten Pilz wieder bei 21° C, was eine kleine Verschiebung gegenüber den flüssigen Kulturen bedeutet. Auch bei dieser Art der Untersuchung ist der *Schoenus*pilz am meisten in seinem Wachstumsbereich beschränkt (von 9 bis 27° C), der *Salix*pilz am weitesten ausgedehnt (von 3 bis 33° C). Der Abfall nach dem Optimum ist bei dem *Salix*pilz bis 33° C flach, dann allerdings sehr plötzlich. Beim *Schoenus*pilz ist er schon von 24° C an sehr steil.

### C. Änderung der H-Ionen-Reaktion durch den Pilz.

Als dritte Untersuchungsreihe der drei isolierten Pilze wurde die Beeinflussung der H-Ionen-Konzentration der Lösung durch das Wachstum der Pilze geprüft. Als Nährmedium verwendete ich wiederum Knoplösung mit Zusatz von 4% Rohrzucker, doch wurden die Kolben zu dieser Versuchsreihe besonders sorgfältig gereinigt: sie standen zwei Tage mit Leitungswasser gefüllt, wurden zweimal mit destilliertem Wasser gespült und, Öffnung nach unten, getrocknet. Die Kulturen standen in einem dunkeln Raum, bei  $\pm 25^{\circ}$  C. Ich führte die Messung der Reaktion alle zwei bis drei Tage an acht Kulturen mit der Chinhydron-Elektrode durch. Der Versuch dauerte zwei Monate. (Tabelle 6.)

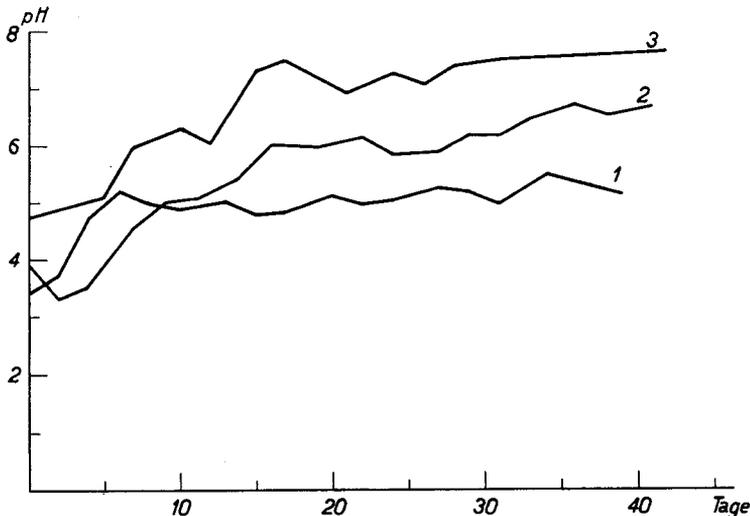


Abb. 15.

Einfluß des Pilzwachstums auf die H-Ionen-Konzentration.

1 = *M. R. Aceris*. 2 = *M. R. Salicis*. 3 = *M. R. Schoeni*.

Tabelle 6.  
Veränderung des pH der Nährlösung durch die Pilze.

Zahl der Messungen	1.	2.	3.
	<i>M. R. Aceris</i> pH	<i>M. R. Salicis</i> pH	<i>M. R. Schoeni</i> pH
frische Lösung	3,75 ± 0,02	3,45 ± 0,06	5,69 ± 0,02
ster. Lösung	3,65 ± 0,04	4,81 ± 0,04	5,70 ± 0,02
geimpft 1.	3,38 ± 0,03	3,92 ± 0,05	4,74 ± 0,01
2.	3,75 ± 0,24	3,32 ± 0,04	4,95 ± 0,02
3.	4,80 ± 0,38	3,54 ± 0,09	5,15 ± 0,03
4.	5,25 ± 0,22	4,61 ± 0,24	6,01 ± 0,12
5.	5,02 ± 0,33	4,99 ± 0,28	6,36 ± 0,04
6.	4,87 ± 0,12	5,06 ± 0,31	6,03 ± 0,05
7.	5,05 ± 0,20	5,38 ± 0,22	7,34 ± 0,02
8.	4,80 ± 0,14	6,00 ± 0,05	7,49 ± 0,14
9.	4,78 ± 0,12	5,95 ± 0,18	6,97 ± 0,04
10.	5,09 ± 0,18	6,13 ± 0,06	7,24 ± 0,06
11.	4,96 ± 0,14	5,82 ± 0,06	7,12 ± 0,08
12.	5,02 ± 0,09	5,87 ± 0,08	7,39 ± 0,03
13.	5,23 ± 0,21	6,16 ± 0,10	7,48 ± 0,05
14.	5,18 ± 0,12	6,38 ± 0,06	7,48 ± 0,02
15.	4,98 ± 0,09	6,37 ± 0,09	7,57 ± 0,04
16.	5,46 ± 0,19	6,45 ± 0,09	7,63 ± 0,06
17.	5,28 ± 0,09	6,71 ± 0,06	—
18.	5,13 ± 0,07	6,52 ± 0,07	—
19.	5,16 ± 0,14	6,70 ± 0,03	—

Die Werte in Tabelle 6 und Abb. 15 zeigen bei allen Pilzen eine Verschiebung des pH gegen die alkalische Seite. In der Kurve sind die pH-Werte der ungeimpften Lösungen nicht eingetragen. Die Veränderung ist nicht gleichmäßig, sondern kleinen Schwankungen unterworfen. Bei dem *Salix*pilz wird die vorher stark saure Lösung (pH 3,92), beinahe neutral (pH 6,70), beim *Schoenus*pilz deutlich alkalisch (pH 7,63). Der Versuch mußte hier vorzeitig abgebrochen werden, da die Werte über pH 8 hinausgingen, Messungen, die mit der Chinhydron-Elektrode nicht mehr genau ausgeführt werden können. Im Anfang wachsen die Pilze sehr rasch, nach zwei Tagen sind schon zahlreiche Myzelflocken vorhanden, nach zehn bis zwölf Tagen haben sich feste Myzeldecken gebildet, die bald dunkelbraun werden. Die anfangs wasserhellen Lösungen werden gelb und zuletzt tiefbraun. Nach zwei Monaten treten keine Veränderungen in der Azidität mehr auf. Jedenfalls sind die Nährstoffe inzwischen aufgebraucht, und das Myzel ist in seinen Stoffwechselprodukten zugrunde gegangen.

#### D. Beeinflussung des Pilzwachstums durch Phosphatide.

Cranner (1922) weist nach, daß in allen Pflanzen Phosphatide enthalten sind, und daß sie in ihre Umgebung diffundieren. Melin (1924) betrachtet diese Fette, die Phosphor und Stickstoff enthalten, als ökologischen Bodenfaktor. Nachdem das Wachstum mancher Bakterien durch Wurzel-

ausscheidungen begünstigt wird, untersuchte er, ob die Phosphatide auch die Mykorrhizen beeinflussten. Er fand, daß das Myzel, direkt auf den Wurzelhals gebracht, rascher wachse als in Reinkultur. Er gewann aus den Samen und Keimlingen von Fichten und Kiefern Phosphatide und konnte durch ihren Zusatz zu den Nährlösungen das Wachstum der verschiedenen Wurzelpilze stark beschleunigen. Auch der Stoffwechsel wurde durch ihren Einfluß verändert. Dabei handelt es sich nicht um einen Nährstoff, sondern um ein Stimulans, dessen Optimum schon bei geringer Quantität erreicht wird. Melin nimmt an, daß die Sporen der Pilze nur bei Vorhandensein von Phosphatiden keimen können und wohl daher die Schwierigkeiten der Pilzsporenceimung in Reinkultur herrühren.

Wie Winterstein (1932) ausführt (Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse), kristallisieren die Phosphatide sehr schlecht, sie sind meist schmierig, zersetzen sich leicht und sind in Äther, Benzol oder Chloroform löslich. Ihr Nachweis geschieht, nach Casanova, am einfachsten dadurch, daß man den Extrakt in einem der Lösungsmittel einengt, mit einigen Tropfen einer 10%igen Ammonmolybdatlösung versetzt und mit konzentrierter  $H_2SO_4$  unterschichtet. Bei Vorhandensein von Phosphatiden bildet sich eine kirschrote Zone, die bald grüngelb und dann tiefblau wird. Eine noch empfindlichere Reaktion, die sich auch für quantitativen Nachweis eignet, ist die von Zinzadze. Der Extrakt wird auf dem Sandbad getrocknet, mit einem Salpeter-Sodagemisch verbrannt, der weiße Rückstand mit  $H_2O$  und ein paar Tropfen  $H_2SO_4$  aufgenommen und mit wenig  $\beta$ -Dinitrophenol versetzt, mit  $(NH_4)OH$  bis zum Farbumschlag neutralisiert, das Reagens (Molybdänblau) zugefügt und erwärmt. Etwa vorhandenes  $P_2O_5$  färbt die Flüssigkeit dunkelblau.

Es sollte nun untersucht werden, ob man auch aus Ahornsamen Phosphatide gewinnen könnte und ob sie das Pilzwachstum beeinflussten. Ich schälte zunächst schon seit einigen Monaten aufbewahrte Samen. Sie wurden fein gemahlen und kalt in 95% Alkohol extrahiert. Die Lösung wurde abfiltriert, der Alkohol bei Zimmertemperatur verdunstet, der Rückstand in Chloroform gelöst, wieder filtriert und eingetrocknet. Es blieb ein dunkelgrüner, schmieriger, ziemlich fetter Rückstand. Die oben beschriebene Reaktion, nach Zinzadze, fiel negativ aus, diejenige nach Casanova zeigte deutlich einen roten Ring in der Berührungszone.

Da nur wenig Extrakt zur Verfügung stand, impfte ich zu nur zehn Kolben Pilzkultur je eine Platinöse, zu fünf Kulturen je drei Ösen voll Extrakt, zehn weitere Kontrollkolben enthielten nur Pilz. Nach 28 Tagen wurden die Kulturen filtriert, sorgfältig ausgewaschen, bei  $103^{\circ}$  getrocknet und gewogen. Die Mittelwerte der Wägungen ergaben:

<i>M. R. Aceris</i> allein . . .	mg	$799 \pm 47$	(1)
+ 1 Öse Extrakt . . .	mg	$763 \pm 53$	(2)
+ 3 Ösen Extrakt . . .	mg	$1179 \pm 170$	(3)

Dies deutet darauf hin, daß der Zusatz von drei Ösen Extrakt das Wachstum stark fördert. Das Ergebnis darf allerdings nicht als gesichert betrachtet werden, wenn man die Regel beachtet, daß  $D \geq 3 \cdot \sqrt{m_1^2 + m_2^2}$  sein soll ( $D$  = Differenz zweier Mittelwerte,  $m$  = mittlere Abweichungen).

Es ist dann  $D(1)(2) 36 < 212$ , und  $D(2)(3) 396 < 534$ .

Bei einer Wiederholung des Versuchs wurden die ganz frischen Samen entflügelt, im Thermostaten bei  $60^\circ \text{C}$  getrocknet, in der Holzmühle fein gemahlen und zu je 5 g in einem Filter im Soxleth mit Alkohol während vier bis fünf Tagen extrahiert. Die gelbgrüne Lösung wurde eingeeengt, filtriert, der Rückstand mit Chloroform nochmals extrahiert und wieder eingeeengt. Auch nach dieser Methode ergab sich ein grüner, schmieriger Rückstand, die Färbung nach Casanova erschien weniger deutlich als die des kalten Extrakts.

Pilzwachstumsversuche wurden ausgeführt mit *M. R. Aceris* und *M. R. Salicis* in Gaben von ein, drei und fünf Ösen in je zehn Parallelversuchen. Die Kulturen standen 14 Tage im Dunkel bei  $\pm 20^\circ \text{C}$ . (Tabelle 7.)

Tabelle 7.  
Pilzwachstum bei Anwesenheit von Phosphatid-Extrakt.

	<i>M. R. Aceris</i>	<i>M. R. Salicis</i>
	mg	mg
Kontrolle . . . . .	231 $\pm$ 6	286 $\pm$ 22
+ 1 Öse Extrakt . . . . .	225 $\pm$ 10	177 $\pm$ 6
+ 3 Ösen Extrakt . . . . .	237 $\pm$ 6	189 $\pm$ 5
+ 5 Ösen Extrakt . . . . .	247 $\pm$ 9	185 $\pm$ 6

Bei diesem Versuch werden also die Kulturen des *Acerpilzes* nicht beeinflußt, die Differenzen sind sehr klein, innerhalb der Fehlergrenze liegend, schwankend, während der *Salixpilz* durch den Zusatz von Extrakt ausgesprochen geschädigt wurde. Der Unterschied zeigte sich schon nach wenigen Tagen, in den Kontrollkulturen bildete sich bereits eine dichte, sich bräunende Myzeldecke, während die andern einen feinen weißen, fast glasigen Pilz enthielten. Ob die Reste des Chloroforms oder der Extrakt selbst so giftig wirkten, konnte ich nicht feststellen. Auf jeden Fall scheint die kalte Extraktion günstiger zu sein als die im Soxleth; doch dauert sie sehr lange, wenn man größere Mengen Extrakt braucht.

#### E. Die Stickstoffversorgung der Pilze.

Bei allen Fragen nach der Bedeutung der Wurzelpilze taucht immer wieder das Problem der Stickstoffversorgung auf. Nämlich: sind die Wurzeln der Gefäßpflanzen befähigt, die im Humus enthaltenen komplizierten Eiweißverbindungen abzubauen? Enthält der Boden, vor allem der Rohhumusboden, genügend Nitrate für die N-Versorgung der hier lebenden Pflanzen? Ist die Hyphenverdauung unbedingt notwendig zur

N-Beschaffung oder bedeutet sie nur eine Abwehrmaßnahme gegen den eindringenden Parasiten und dient nicht zur eigentlichen Ernährung? Ferner legt die Ähnlichkeit zwischen den Mykorrhizen und den Wurzelbakterien der Leguminosen, sowie den Knötchen von *Alnus* und *Elaeagnus* die Frage nahe, ob auch die Wurzelpilze die Fähigkeit besitzen, Luft-N zu assimilieren. Es existieren hierüber eine ganze Reihe sich stark widersprechender Arbeiten. Aber auch bei den Autoren, die einen Gewinn von Luft-N in ihren Versuchen feststellten, handelt es sich um derartig kleine Mengen, daß diese ebensogut aus den verschiedenen Fehlerquellen herkommen können.

Assimilation von Luft-Stickstoff bei verschiedenen Pilzen stellten fest: Ternetz (1907) bei Wurzelpilzen von Ericaceen; z. B. gewinnt die Autorin 2,8 mg N auf 75 mg Myzeltrockengewicht, ein anderes Mal 15,8 mg N auf 87 mg Myzel, und zwar ist jeweils mehr N in der Lösung enthalten als im Myzel.

Ferner Schober (1930) für *Aspergillus*, aber nur in Fällen, in denen eine leicht oxydierbare Kohlenstoffquelle zur Verfügung stand. Er erhielt in 48 Tagen 180 mg Myzel mit 4 mg N-Gewinn. Wolff (1933) erzielte bei Wurzelpilzen von Orchideen einen N-Gewinn von 0,24 bis 0,84 mg je Kultur. Eine Ablehnung der Luft-N-Bindung finden wir bei Melin (1925), der es wichtig findet, daß die Pilze Stickstoff in ihnen zusagender Form bekommen, nämlich  $\text{NH}_4$ -Salze, Harnstoff, Nukleinsäure, während Salpeter bei mehr als 0,1% giftig wirkt. Auch Schröder (1932) mit *Aspergillus niger*, Holländer (1932) mit Orchideenpilzen und Francke (1934) mit *Monotropa*-Mykorrhiza konnten bei keinem der von ihnen untersuchten Pilze einen Gewinn von Luft-N feststellen, da die gefundenen Werte viel zu gering waren, um für Pilz oder Pflanze irgendwelche Bedeutung zu haben.

#### a) Kultur in stickstoffhaltiger Lösung.

Um das Material zur Stickstofffrage zu erweitern, machte ich mit den Pilzen *M. R. Aceris* und *M. R. Salicis* eine Reihe von Analysen über die Verwendung verschiedener Stickstoffquellen. Der Versuch wurde mit fünf Lösungen durchgeführt (S. 482); ich bestimmte das Myzeltrockengewicht, den N-Gehalt der ungeimpften, den der geimpften Lösung sowie den des Myzels und berechnete das Verhältnis des Myzel-N zum Gesamt-N in Prozenten (Tabelle 8).

Zum Aufschließen gebrauchte ich das Gemisch: 10 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 1 g  $\text{CuSO}_4$  krist., 0,75 g  $\text{Hg}_2(\text{SO}_4)_2$ , 20 ccm  $\text{H}_2\text{SO}_4$  konz. Als Vorlage diente 1/10 n  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , zurücktitriert mit 1/10 n NaOH, als Indikator bei einem Teil der Analysen Methylorange, später verwendete ich auf Empfehlung von Dr. Pallmann den Indikator von Kolthoff (Methylenblau 0,1%,

Methylrot 0,2%, Alkohol absol., Umschlagspunkt bei pH 5,4), der empfindlicher und deutlicher ist.

Die Kulturen standen im Dunkeln bei  $\pm 22^\circ \text{C}$ . Die Kolben wurden vor Gebrauch sorgfältig gereinigt, wie es bei dem pH-Versuch bereits beschrieben ist. Die verwendeten Salze waren alle „reinst, pro analysi“ und wurden noch qualitativ auf das Vorhandensein von N geprüft. (Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse.)

Die Untersuchungen führte ich mit folgenden Nährlösungen durch:

1. $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . . . . .	1,0 g	2. $\text{K}_2\text{SO}_4$ . . . . .	1,0 g
$\text{CaCl}_2$ . . . . .	1,0 g	$(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ . . . . .	2,0 g
$\text{MgSO}_4$ . . . . .	0,5 g	$\text{CaCl}_2$ . . . . .	1,0 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . . . . .	1,0 g	$\text{MgSO}_4$ . . . . .	0,5 g
$\text{FeSO}_4$ . . . . .	Spur	$\text{FeSO}_4$ . . . . .	Spur
Glukose . . . . .	10,0 g	Glukose . . . . .	10,0 g
$\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	1000,0 g	$\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	1000,0 g
3. $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . . . . .	1,0 g	4. $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . . . . .	1,0 g
$\text{CaCl}_2$ . . . . .	1,0 g	$\text{CaCl}_2$ . . . . .	1,0 g
$\text{MgSO}_4$ . . . . .	0,5 g	$\text{MgSO}_4$ . . . . .	0,5 g
Asparagin . . . . .	0,25 g	$\text{NH}_4\text{Cl}$ . . . . .	1,0 g
$\text{FeSO}_4$ . . . . .	Spur	$\text{FeSO}_4$ . . . . .	Spur
Glukose . . . . .	10,0 g	Glukose . . . . .	10,0 g
$\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	1000,0 g	$\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	1000,0 g
		5. $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . . . . .	2,0 g
		$\text{CaCl}_2$ . . . . .	1,0 g
		$\text{MgSO}_4$ . . . . .	0,5 g
		$\text{NH}_4\text{Cl}$ . . . . .	2,0 g
		$\text{FeSO}_4$ . . . . .	Spur
		Glukose . . . . .	20,0 g
		$\text{H}_2\text{O}$ . . . . .	1000,0 g

Tabelle 8.

## Analysen der Pilzkulturen in N-baltiger Lösung.

Nährlösung Nummer	Pilz	Ver- suchs- dauer	Myzel- trocken- gewicht	N-Gehalt theor.	N-Analyse ungeimpft	N-Analyse geimpft	N-Gehalt- Myzel	Myzel-N Gesamt-N
		Tage	mg	mg	mg	mg	mg	%
1	<i>M. R. Aceris</i>	30	221	21,20	20,96	20,39	15,62	74,63
2	<i>M. R. Aceris</i>	28	215	24,43	24,35	23,37	14,03	60,03
3	<i>M. R. Salicis</i>	20	300	5,31	5,08	5,24	4,77	93,89
4	<i>M. R. Salicis</i>	23	270	26,19	26,35	25,21	13,37	50,74
5	<i>M. R. Salicis</i>	23	307	52,38	51,52	50,53	17,80	34,55

Die Mittelwerte der Analysen sind zusammengestellt in Tabelle 8. Als N-Quellen dienten Ammonsalze sowie Asparagin. Von den Ammonverbindungen wurde das Sulfat am besten, das Chlorid am schlechtesten aufgenommen. Auffallend ist der Unterschied zwischen Lösung 4 und 5.

Es wurde mehr Myzel gebildet, da mehr Kohlehydrat geboten wurde. Die Steigerung des  $\text{NH}_4\text{Cl}$  von 1 auf 2 g war aber wirkungslos, im Gegenteil, nur 34 % des gebotenen N wurde ins Myzel aufgenommen, gegenüber 50 % bei geringerem N-Gehalt. Weitaus am besten wurde das in geringer Menge beigegefügte Asparagin absorbiert, nämlich fast 94 %. Größere Asparaginnmengen wurden nicht so vollkommen aufgebraucht, bei einem weiteren Versuch mit 1 g Asparagin in 1 l Lösung als N-Quelle wurden nur 65,5 % des vorhandenen N im Myzel gefunden.

Die Myzelbildung war aber in allen Lösungen ziemlich gleichmäßig, deutlich auch hier wieder das viel langsamere Wachstum des *Acer*-Pilzes, der in längerer Zeit bedeutend weniger Myzel bildete als der *Salix*-Pilz.

Der Zuckerverbrauch wurde nicht gemessen, doch war bei Abbruch des Versuchs der gebotene Zucker noch nicht verbraucht, was sich durch die starke Verkohlung und das lebhaftere Aufschäumen während des Aufschließens zeigte.

#### b) Kultur in N-freier Lösung.

Um auch die Frage der Aufnahme von Luft-Stickstoff zu prüfen, wurde eine Anzahl Kulturen in N-freier Lösung angelegt.

Nährlösung:	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,0 g	Rohrzucker	40,0 g
	$\text{CaCl}_2$	1,0 g	$\text{FeSO}_4, \text{NaCl}$	Spur
	$\text{MgSO}_4$	0,5 g	$\text{H}_2\text{O}$	1000,0 g

Die Kolben wurden für diesen Versuch erst während vier Tagen mit Leitungswasser, dann ebensolange mit destilliertem Wasser gefüllt. Für die Nährlösung wurde das übliche destillierte Wasser des Instituts nochmals mit einem Zusatz von  $\text{KMnO}_4$  destilliert. Die Chemikalien wurden, wie im vorigen Abschnitt, auf ihren N-Gehalt geprüft.

Die Versuche machte ich mit:

- 10 Kolben ohne Pilz, zur Kontrolle.
- 10 Kolben *M. R. Aceris*.
- 10 Kolben *M. R. Salicis*.
- 5 Kolben *M. R. Aceris* + 0,1 g  $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ .
- 5 Kolben *M. R. Salicis* + 0,1 g  $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ .

Ein Teil der Kulturen wurde, nur mit Watteverschluß, im Kulturraum ( $\pm 22^\circ \text{C}$ ) aufgestellt, der Rest im selben Raum zur Durchlüftung an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Die Luft passierte zuerst eine Waschflasche mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , dann zwei Flaschen mit sterilisiertem  $\text{H}_2\text{O}$ . Hierauf folgten die Kulturkolben, deren Gummizapfen und Glasröhrchen erst ausgekocht und dann in einem Besteckkasten im Dampftopf sterilisiert worden waren.

Die gewöhnlichen und die durchlüfteten Kulturen wuchsen zu braunen Pilzklümpchen heran im Gewicht von 20 bis 32 mg. Zu beachten ist, daß bei Myzelimpfung immer kleine Agarstücke mitgeimpft werden; diese mögen als N-Quelle für solch kleine Pilzmengen vollkommen genügen,

wenn man bedenkt, daß im Versuch 3 in N-haltiger Lösung (Tabelle 8) 0,25 g Asparagin (5,3 mg N in 100 ccm Lösung) in 20 Tagen 300 mg Myzel ergaben.

Die Kolben mit dem Zusatz von Ammonitrat zeigten schon nach einer Woche eine zusammenhängende Pilzdecke. Nach 43 Tagen betrug das Trockengewicht bei *M. R. Salicis* 1212 mg, bei *M. R. Aceris* 696 mg, doch waren beide Myzelien offenbar schon seit einiger Zeit abgestorben.

Diese Kulturen wurden mit Phenolschwefelsäure und Natriumthiosulfatlösung aufgeschlossen (Wiegner, 1926), die Titration wie auf Seite 481 beschrieben durchgeführt. Ich bestimmte wieder das Trockengewicht des Myzels, den N-Gehalt von Lösung + Myzel, vom Myzel allein und das Verhältnis N-Gehalt Myzel: Gesamt-N in Prozent (Tabelle 9).

Der Versuch dauerte 43 Tage bei  $\pm 22^{\circ}$  C.

Tabelle 9.  
Stickstoffanalysen von Pilzkulturen.

Art der Kultur	Trocken-	N-Gehalt	N-Gehalt	N-Myzel
	gewicht	Lös.+Myzel	Myzel	Gesamt-N
	mg	mg	mg	%
Kontrolle . . . . .		(0,677)	—	—
<i>M. R. Salicis</i> . . . . .	24,8	0,513	0,219	42,7
<i>M. R. Aceris</i> . . . . .	32,5	0,896	0,192	21,4
<i>M. R. Salicis</i> durchlüftet . . . . .	20,0	0,539	0,029	5,3
<i>M. R. Salicis</i> + 35 mg N . . . . .	1212,1	33,879	31,650	93,3
<i>M. R. Aceris</i> + 35 mg N . . . . .	696,1	34,530	28,720	83,2

Die Analysen wurden mit der gewöhnlichen Kjeldahlmethode durchgeführt, die für so wenig Substanz zu grob ist, daher ist auch die (eingeklammerte) Zahl für die Kontrollösung zu hoch. Die dargestellten Werte zeigen aber trotzdem, daß es sich schwerlich um gebundenen Luftstickstoff handeln kann, sondern, daß für die Bildung von so geringen Myzelmengen der in Agar und Glas stets enthaltene Stickstoff genügt. Auch die Durchlüftung der Kulturen (ein bis zwei Luftblase je Sekunde) übte auf die Menge des gebildeten Myzels keinen Einfluß aus, und auch der Stickstoffverbrauch erhöhte sich nicht.

Das Ergebnis erscheint, besonders mit den Werten der N-haltigen Kulturen verglichen, so eindeutig, daß weitere Analysen mit Mikrokjeldahl nicht mehr ausgeführt wurden.

## V. Zusammenfassung.

1. Wasserwurzeln (Stecklinge) von *Salix repens* verpilzen nur oberflächlich.
2. Die Samen von *Salix repens* keimen rasch, die weitere Entwicklung der Keimlinge geht aber sehr langsam vor sich. Sie sind daher für Syntheseversuche ungeeignet.

3. Die Wurzeln von *Schoenus ferrugineus* zeigen zwischen normalen Wurzeln verdickte Säckchen, die Myzel enthalten und sich in ihrem Bau als echte Tumore erweisen. Die Samen keimen spärlich, es konnte nur ein Keimling erzielt werden.
4. Die Samen verschiedener Ahorn-Arten keimen gut nach längerer Ruhezeit in der Kälte. Zu umfassenderen Versuchen eignet sich am besten *Acer pseudoplatanus*, obwohl auch hier ein großer Teil der Samen nicht keimfähig ist. Kulturen in differenzierten Nährlösungen zeigen starke Beeinflussung des Wachstums durch verschiedene Nährsalze. In flüssiger Kultur wurde keine Infektion durch Wurzelpilze erzielt. Bei einer solchen in sterilisierter Erde enthielten fünf von sieben Versuchspflanzen Pilzhyphen in Hand schnitten. Aus oberflächlich sterilisierten Wurzelstücken konnte der Pilz nicht zurückgewonnen werden.
5. Die Pilze wurden aus kleinen Wurzelstücken der Versuchspflanzen durch Auslegen auf Malzagar gewonnen. Sie konnten nicht bestimmt werden und wurden deshalb *Mycelium Radicis* genannt. Sie sind im Habitus sehr ähnlich, weichen aber im mikroskopischen Bild und in den Temperatursprüchen voneinander ab. Die Temperatur-Optima liegen bei 21 und 24° C, *M. R. Aceris* wächst am langsamsten, *M. R. Salicis* doppelt so schnell. Die Kurve von *M. R. Schoeni* ist am steilsten, dieser Pilz ist am empfindlichsten gegenüber hohen und tiefen Temperaturen. Bei allen drei Stämmen wird während des Wachstums die H-Ionen-Konzentration der Nährlösung gegen die alkalische Seite hin verschoben, nach etwa zwei Monaten ist diese (100 cem Knop + 4 % Rohrzucker) aufgebraucht.
6. Bei der Untersuchung über die Einwirkung der Phosphatide auf das Pilzwachstum beeinflussten kalt hergestellte Extrakte im günstigen Sinn, heiß im Soxleth extrahierte Stoffe ließen den *Acer*-pilz unbeeinflusst und schädigten den *Salix*-pilz. Das Vorhandensein von Phosphatiden konnte nicht einwandfrei nachgewiesen werden.
7. Pilzkulturen in flüssiger Nährlösung mit verschiedenen Ammonverbindungen und Asparagin als N-Quelle ergaben, daß diese Salze nicht gleich gut ausgenutzt werden. Kulturen in N-freier Lösung lieferten so wenig Myzel — annähernd gleichviel mit und ohne Durchlüftung —, daß eine Assimilation von Luft-N unwahrscheinlich ist.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Versuche ziehe ich folgende Schlüsse:

In der Rindenschicht von *Acer pseudoplatanus* und *Acer platanoides*, in den Epidermiszellen von *Salix* und den besonderen Pilzsäcken von *Schoenus ferrugineus* finden sich regelmäßige Pilzhyphen. Schwächere Pflanzen,

z. B. Wasserkulturen, werden durch den Pilz zum Absterben gebracht. Kräftige, in Erde wurzelnde Pflanzen weisen bei einjähriger Kulturdauer keine Differenz zwischen verpilzten und unverpilzten Formen auf. Der Pilz ist zur Keimung des Samens nicht notwendig. Diese Ergebnisse sprechen für die Theorie, daß es sich bei der Erscheinung der Wurzelpilze in den untersuchten Fällen um einen unter Umständen tragbaren Parasitismus handle.

### Literaturverzeichnis.

- Bernard, Noel, 1909. L'Evolution dans la Symbiose. Ann. d. Sciences Nat., 9.  
 Burgeff, H., 1931. Über Saprophytismus und Symbiose. Jena.  
 Büsgen, M., 1927. Bau und Leben unserer Waldbäume. Jena. 383 ff.  
 Cranner, H., 1922. Zur Biochemie und Physiologie der Grenzschichten lebender Pflanzenzellen. Meld. Norges Landbrukshoiskole.  
 Demeter, K., 1923. Über „Plasmoptysen“-Mykorrhiza. Flora, 16.  
 Dougall, Mc., 1914. On the Mycorrhizas of Forest Trees. Americ. Journ. of Botany.  
 Fischer, E. und Gäumann, E., 1929. Biologie der pflanzenbewohnenden parasitischen Pilze. Jena.  
 Francke, H. L., 1934. Beiträge zur Kenntnis der Mykorrhiza von *Monotropia hypopytis* L. Flora, 29.  
 Frank, B., 1885. Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. Berichte der Deutschen Botan. Gesellschaft, 3, 128.  
 Frank, B., 1885. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 3, 6, 9, 10.  
 Freisleben, R., 1934. Zur Frage der Mykotrophie in der Gattung *Vaccinium* L. Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik, 80.  
 Fuchs, A. und Ziegenspeck, H., 1925. Bau und Form der Wurzeln der einheimischen Orchideen in Hinblick auf ihre Aufgaben. Botanisches Archiv, 12.  
 Fuchs, J., 1911. Über die Beziehung von Agariceen und andern humusbewohnenden Pilzen zur Mykorrhizabildung der Waldbäume. Bibl. Botanica, 76.  
 Großmann, H., 1934. Über die Welkewirkung des Flachses. Phytop. Zeitschrift, 7.  
 Hesselmann, H., 1927. Studien über die Entwicklung der Nadelbaumpflanzen in Rohhumus. Med. frøn Statens Skogsförsökanstalt, 23.  
 Holländer, S., 1932. Ernährungsphysiologische Untersuchungen an Wurzelpilzen saprophytisch lebender Orchideen. Würzburg.  
 Jaccard, P. Mycorrhices endotrophes chez *Aesculus Hippocastanum* et *Pavia* et leur signification. Proc. verb. Soc. vaud de natur, avril 1911, p. I—II.  
 Jahn, E., 1934. Die peritrophe Mykorrhiza. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 52.  
 Kienitz-Gerloff, 1903. Über die Symbiose von Pflanzenwurzeln mit Pilzen. Nat. Wochenschrift, 19.  
 Kinzel, W., 1913. Frost und Licht als beeinflussende Kräfte der Samenkeimung. Stuttgart.  
 Klein, 1932. Handbuch der Pflanzenanalyse I.  
 Klein, G. und Kisser, J., 1924. Die sterile Kultur der höheren Pflanzen. Botanische Abhandlungen, 2.  
 Kotte, W., 1924. Methoden zur Bestimmung der Aufnahme organischer Stoffe durch die höhere Pflanze. Handbuch biol. Arb. meth.  
 Masui, K., 1928. A study of the ectotrophic mycorrhiza of woody plants. Mem. Coll. Sci. Kyoto Imp. Univ.  
 Melin, Elias, 1921. Mykorrhizenpilze von *Pinus silvestris* und *Picea abies*. Svensk Bot. Tidskrift, 15.

- Melin, Elias, 1922. Untersuchungen über die Larix-Mykorrhiza und Synthese der Mykorrhiza in Reinkultur. Svensk Bot. Tidskrift, **16**.
- Melin, Elias, 1923. Experimentelle Untersuchungen über die Birken- und Espenmykorrhiza und ihre Pilzsymbiose. Svensk Bot. Tidskrift, **17**.
- Melin, Elias, 1924. Die Phosphatide als ökologischer Faktor im Boden. Svensk Bot. Tidskrift, **18**.
- Melin, Elias, 1924. Über den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Virulenz der Wurzelpilze von Fichte und Kiefer. Botaniska Notiser.
- Melin, Elias, 1924. Zur Kenntnis der Mykorrhizenpilze von *Pinus montana*. Botaniska Notiser.
- Melin, Elias, 1925. Untersuchungen über die Bedeutung der Baummykorrhiza. Jena.
- Melin, Elias, 1931. Die Mykorrhiza der Waldbäume und ihre Bedeutung. Boschlow Tijdschrift, **4**.
- Möller, A., 1902 und 1903. Über die Wurzelbildung der ein- bis zweijährigen Kiefer im märkischen Sandboden. Zeitschrift für Forst- und Jagdwesen, **34** und **35**.
- Neumann, G., 1934. Über die Mykorrhiza in der Gattung *Gentiana*. Zentralblatt für Bakteriologie, **89**, S. 433.
- v. d. Pijl, L., 1934. Mykorrhiza von *Burmannia* und *Epirhizanthus* und die Fortpflanzung ihres Endophyten. Rec. Trav. Bot. Néerlandais, **31**.
- Rayner, M. C., 1927. Mycorrhiza. New Phytol. Reprint., **15**.
- Rayner, M. C., 1929. The Biology of Fungus Infection in the Genus *Vaccinium*. Ann. of Bot., **43**.
- Rayner, M. C., 1929. The multiple Mycorrh. of Trees. Forestry, Journ. Soc. Forest. Gr. B., **3**.
- Rexhausen, L., 1925. Über die Bedeutung der ektotrophen Mykorrhiza für die höheren Pflanzen. Beiträge zur Biologie der Pflanzen, **14**.
- Rippel, A., 1931. Niedere Pflanzen. Handbuch der Bodenlehre, **7**.
- Roberg, M., 1934. Über den Erreger der Wurzelknöllchen von *Alnus* und den Elaeagnaceen *Elaeagnus* und *Hippophaë*. Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik, **79**.
- Sarauw, G., 1903. Sur les Mycorrh. des arbres forest. et sur le sens de la symbiose des racines. Revue mycol.
- Schlicht, A., 1888. Über neue Fälle von Symbiose der Pflanzenwurzeln mit Pilzen. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, **6**.
- Schober, R., 1930. Luftstickstoffassimilation und Säurebildung bei *Aspergillus niger*. Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik, **72**.
- Schröder, M., 1932. Zur Frage der Assimilation des Luftstickstoffs durch *Aspergillus niger*. Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik, **75**.
- Schröder, M., 1932. Die Assimilation des Luftstickstoffs durch einige Bakterien. Zentralblatt für Bakteriologie, **85**, Abt. II.
- Stahl, E., 1900. Über den Sinn der Mykorrhizenbildung. Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik, **34**.
- Ternetz, Ch., 1907. Über die Assimilation des atmosphärischen Stickstoffs durch die Pilze. Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik, **44**.
- v. Tubeuf, C., 1903. Zur Kenntnis des Pfeifengrases (*Molinia coerulea*). Nat.-wiss. Zeitschrift für Land- und Forstwirtschaft, **1**, Heft 6.
- Wiegner, 1926. Anleitung zum quantitativen agrikulturchemischen Praktikum. Berlin.
- Winterstein, H. E., 1932. Phosphatide. Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse, S. 677, **1**.
- Wolff, H., 1933. Zur Assimilation atmosphärischen Stickstoffs. Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik, **77**.
- Woronin, M., 1885. Über die Pilzwurzel von B. Frank. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft, **3**.

### **Curriculum vitae.**

Ich, Sophie Renner, bin geboren am 5. Dezember 1896 in Perosa, (Italien). 1900 übersiedelten wir nach Zürich, wo ich Primar-, Sekundarschule und Gymnasialabteilung der Töchterschule besuchte und 1916 das Maturitätsexamen bestand. 1916—20 studierte ich an der Abteilung für Naturwissenschaften der Eidgenössischen Technischen Hochschule und schloß das Studium mit dem Diplom in zoologisch-botanischer Richtung ab. 1920—22 unterrichtete ich am Töchterinstitut Fetan (Engadin), 1923—26 an verschiedenen Privatschulen in Zürich, 1926—30 als interne Lehrerin am Landerziehungsheim in Gaienhofen (Untersee). 1930—34 war ich Hilfslehrerin und Vikarin an der Töchterschule Zürich, Abt. I und II, und arbeitete daneben, da ich meistens nicht voll beschäftigt war, an der vorliegenden Promotionsarbeit.