

Prom. Nr. 2561

B.

Diss ETH

UNTERSUCHUNG  
ÜBER DEN ESCHENKREBS

---

VON DER  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN  
HOCHSCHULE IN ZÜRICH  
ZUR ERLANGUNG  
DER WÜRDE EINES DOKTORS  
DER NATURWISSENSCHAFTEN  
GENEHMIGTE  
PROMOTIONSARBEIT

VORGELEGT VON  
ALFRED RIGGENBACH  
DIPL. NATURWISS. E. T. H.  
VON ZÜRICH UND ZEGLINGEN (BL)

Referent: Herr Prof. Dr. E. Gäumann  
Korreferent: Herr Prof. Dr. A. Frey-Wyssling

1 9 5 6

---

Druck von A. W. Hayn's Erben, Berlin West



Veröffentlicht in »Phytopathologische Zeitschrift«, Band 27, Heft 1 (1956), S. 1 bis 40  
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg.

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

Direktor: Prof. Dr. E. Gäumann

## Untersuchung über den Eschenkrebs

Von

A. RIGGENBACH

Mit 41 Abbildungen

Inhalt: Einleitung und Problemstellung. — 1. Kapitel. Der Eschenkrebs. § 1. Geschichte und Literatur. § 2. Das Krankheitsbild. § 3. Andere Krankheiten mit ähnlichen Symptomen. A. Die Eschenrose. B. Klunker. C. Weitere Krankheiten. § 4. Das Untersuchungsmaterial. § 5. Das Krebsgewebe. A. Anatomischer Bau. B. Nachweis der Mikroorganismen in den kranken Geweben. § 6. Die Mikroorganismen. A. Isolierung und Bestimmung der Mikroorganismen. B. Die Verteilung der Mikroorganismen im Krebs. C. Die Mikroorganismen aus Krebsen verschiedener Fundorte. — 2. Kapitel. Die Mikroorganismen *in vitro*. § 1. Methoden. A. Chemikalien und Nährlösungen. B. pH-Messung C. Impfmateri al. D. Nachweis biologisch aktiver Stoffe. § 2. *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* (BROWN) DOWSON. A. Wachstum und Toxinbildung *in vitro*. B. Aufarbeitung der toxinhaltigen Kulturfiltrate. C. Wirkung des Toxins. § 3. *Fusarium lateritium* NEES. A. Allgemeines. B. Wachstum und Toxinbildung *in vitro*. § 4. *Pleospora herbarum* (PERSEON) RABENHORST. § 5. *Plenodomus Rabenhorstii* PREUSS. § 6. Die vier Mikroorganismen in Mischkultur. A. Mischkulturen zwischen *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* und einem Pilze. B. Mischkulturen zwischen *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* und mehreren Pilzen. C. Mischkulturen der Pilze. D. Besprechung der Ergebnisse. — 3. Kapitel. Die Infektionsversuche. § 1. Allgemeines. § 2. Methode. § 3. Ergebnisse. — Zusammenfassung. — Literaturverzeichnis.

### Einleitung und Problemstellung

Als Erreger des Eschenkrebses wird in der Literatur *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* (Brown) Dowson (z. B. van Vliet, 1931; Brown, 1932; Dowson, 1943) aufgeführt. Bei unseren Untersuchungen zeigte es sich jedoch, daß auch noch andere Mikroorganismen an seinem Zustandekommen beteiligt sind.

Als hauptsächlichste assoziierte Mikroorganismen konnten drei Pilze:

*Fusarium lateritium* Nees

*Pleospora herbarum* (Persoon) Rabenhorst

*Plenodomus Rabenhorstii* Preuss.

isoliert und identifiziert werden.

Die Arbeit soll einige Zusammenhänge zwischen einer pflanzlichen Primär- und Sekundärinfektion zu klären versuchen.

1. Welches sind die Erreger und die Begleitflora des Eschenkrebses?
2. Wie verhalten sich die einzelnen Mikroorganismen bei verschiedenen Umweltsbedingungen?
3. Wie gestalten sich Infektionen mit diesen Organismen?
4. Bestehen zwischen diesen Mikroorganismen bestimmte Beziehungen?

## 1. KAPITEL

### Der Eschenkrebs

#### § 1. Geschichte und Literatur

Zum erstenmal wird der Eschenkrebs durch SORAUER (1874) in seinem Atlas der Pflanzenkrankheiten erwähnt. 1893 widmet NOACK dieser Krankheit eine erste ernsthafte Studie. Er kommt dabei zum Schluß, daß der Eschenkrebs eine Bakterienkrankheit sei, da in Krebsquerschnitten Bakterien Schleim festgestellt wurde. Er glaubte, in diesen Bakterien den Erreger zu finden, eine Auffassung, die auch von SORAUER (1908) übernommen wurde. VUILLEMIN (1896) vergleicht in seiner Arbeit den Ölbaumkrebs mit dem Eschenkrebs. Er identifizierte als erster die Erreger — Bakterien — dieser beiden Pflanzenkrankheiten. VUILLEMIN war überzeugt, daß beide Krebse durch den gleichen Erreger, durch *Bacillus oleae* (Arcang) Trevis, hervorgerufen würden. Er gibt auch mutmaßliche Angaben über das Zustandekommen der Infektionen und weist auf eine eventuelle Mitwirkung von Insekten hin. *Bacillus oleae* (Arcang) Trevis ist synonym zu *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini*.

E. F. SMITH verneint 1905 die Identität des Ölbaumkrebs- und Eschenkrebs-Bakteriums und betrachtet sie als verschiedene Arten. In einer weiteren Arbeit (1913) behandelt er den Eschenkrebserreger als Varietät des Ölbaumkrebserregers. Während C. O. SMITH (1922) die beiden Erreger wieder als zwei verschiedene Arten trennt, sieht BROWN (1932) im Erreger des Eschenkrebses eine Varietät des Ölbaumkrebsbakteriums. Es gelangen ihm erfolgreiche Infektionsversuche an Eschen.

VAN VLIET (1931) behandelt vor allem die Morphologie des Eschenkrebses. Er unterscheidet drei Typen von Krebsen:

1. Warzenkrebs
2. eingesunkene Krebse
3. Übergangsformen von 1. und 2.

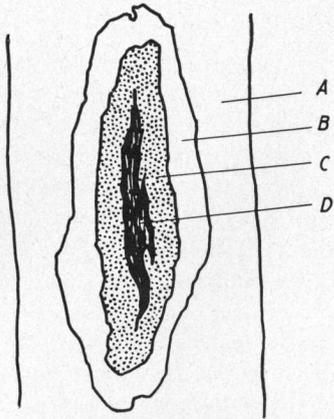


Abb. 1. Aufsicht eines Krebsgeschwürs der Esche (schematisch).  
Erklärung im Text

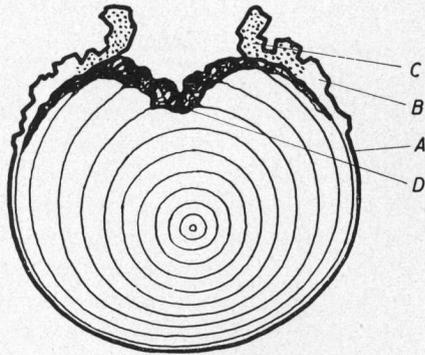


Abb. 2. Querschnitt eines Krebsgeschwürs der Esche (schematisch). Erklärung im Text

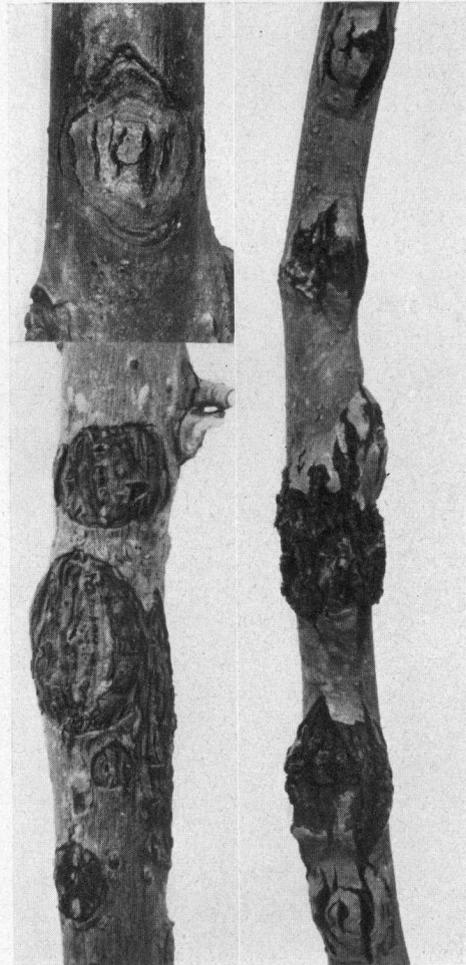


Abb. 3 (oben links). Eschenkrebs im Anfangsstadium. Der Krebs durchbricht erst an wenigen Stellen die Rinde. Fundort: „Im Aegerten“. Nat. GröÙe. Phot. Inst. ETH

Abb. 4 (unten links). Eschenkrebs an einem dreijährigen Stämmchen. Fundort: Buchenegg. 1,5fach vergrößert

Abb. 5 (rechts). Eschenkrebs an einem vierjährigen Stämmchen. Fundort: „Im Aegerten“. Nat. GröÙe. Phot. Inst. ETH

## § 2. Das Krankheitsbild

Als erstes äußerliches Anzeichen einer Krebserkrankung zeigt sich bei der europäischen Esche, *Fraxinus excelsior*, eine oft rötliche Verfärbung der Rinde. An Stämmen und Ästen erscheinen später rundliche, meist aber elliptische Flecke mit Längsachse in der Stammrichtung. Ihre Farbe ist heller als die der sie umgebenden Rinde. Diese hellen Stellen vergrößern sich, und zugleich erhebt sich das Zentrum über die Umgebung, um dann in einer oder mehreren Längsspalten von unterschiedlicher Breite aufzureißen. Bei weiterem Wachstum des Fleckes, das sowohl in der Richtung der Stammachse, als auch in die Breite erfolgt, erscheinen neue Längsrisse. Sie verbreitern sich, und schwarzes, verkorktes Gewebe dringt heraus. In ungleich großen Lücken, die durch Auflösung von Zellen entstanden sind, findet sich ein stark mit Bakterien durchsetzter Schleim. Rund um die wulstigen Ränder dieser offenen Wunden ist die aufgerissene Rinde gelblich bis rötlich verfärbt. Auf diese Weise entsteht ein Krebs, bei dem wir äußerlich vier Zonen unterscheiden (Abb. 1 und 2):

- A. Gesunde, unverfärbte Rinde über gesundem Holz.
- B. Verfärbung im Kambium und in den Rindengeweben, schwache Aufwölbung.
- C. Stark, zum Teil vom Holz losgelöste, aufgewölbte Rinde, beginnende Risse.
- D. Offener Spalt, Rinde fehlt, Holz schwarz.

Die photographischen Aufnahmen (Abb. 3 bis 7), welche die natürlichen Farbkontraste kaum zum Ausdruck bringen, zeigen diese Zonen nur undeutlich.



Abb. 6

Abb. 7

Abb. 6. Eschen-  
krebs an einem  
achtjährigen  
Stamm.  
Fundort:  
Steg im Tösstal.  
1,5fach vergr.

Abb. 7. Eschen-  
krebs an einem  
zwölfjährigen  
Stamm.  
Fundort:  
Hirzegg.  
1,5fach vergr.

### § 3. Andere Krankheiten mit ähnlichen Symptomen

#### A. Die Eschenrose

Eschenrose und Eschenkrebs wurden ihrer großen Ähnlichkeit wegen häufig miteinander in Beziehung gebracht.

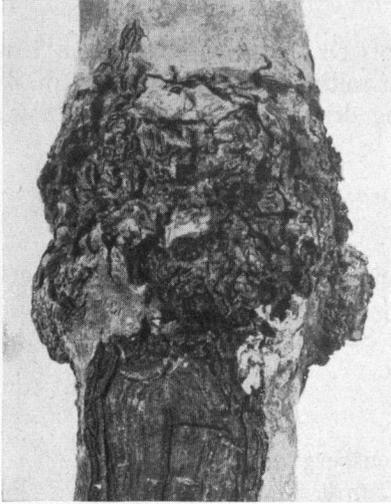


Abb. 8. Eschenrose an einem  
17jährigen Eschenstamm.  
Fundort: Teufen. Nat. Größe

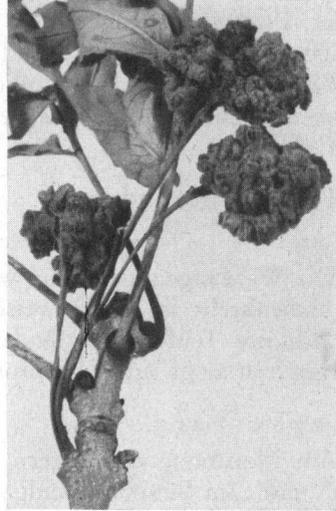


Abb. 9 Klunker. Durch die Eschengallmilbe deformierte Blütenstände.  
Fundort: Boncourt (Ajoie)  $\frac{2}{3}$  nat. Gr.

Die Eschenrosen (Abb. 8) entwickeln sich als Folge des Überwinterungsfraßes, nicht aber des Brutfraßes des Eschenbastkäfers, *Hylesinus fraxini* (FRANK, 1896; ESCHERICH, 1923; SCHNEIDER-ORELLI, 1947). Diese Rindenwucherungen, bei denen das Kambium nicht zerstört wird (EICHHOFF, 1881), erhielten 1868 von RATZBURG den euphemistischen Namen „Eschenrose“. Die ältere Literatur bezeichnet sie realer als „Käfergrind“.

#### B. Klunker

Die Eschengallmilbe, *Eriophyes fraxinivorus*, verwandelt die Blütenstände der Esche in blumenkohllartige Massen, Klunker (SCHNEIDER-ORELLI, 1947) (Abb. 9).

#### C. Weitere Krankheiten

Die Esche wird noch von vielen anderen tierischen Schädlingen, vor allem Milben, Läusen und Borkenkäfern befallen. Die entstehenden Schäden sind jedoch bei uns in der Regel unbedeutend und unauffällig.

Außer den Mikroorganismen des Eschenkrebses sind auf der europäischen Esche noch eine Vielzahl pflanzlicher Parasiten nachgewiesen (OUDEMANS, 1923). Sie verursachen aber weder größere Schäden noch absonderliche, eschenkrebsähnliche Mißbildungen.

#### § 4. Das Untersuchungsmaterial

Die für diese Untersuchungen benötigten krebskranken Eschen stammen aus dem Kanton Zürich. Die Namen der Standorte wurden dem Topographischen Atlas der Schweiz 1 : 25 000, die Hinweise auf den Boden der Geologischen Karte des Kantons Zürich und der Nachbargebiete, 1 : 150 000 (SUTER, 1939), entnommen.

Zu vielem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. H. LEIBUNDGUT am Institut für Waldbau der E. T. H. verpflichtet, der mich auf das Problem aufmerksam machte und mir auch bei der Beschaffung des zugrunde liegenden Materials behilflich war.

Die Fundorte sind:

##### 1. Teufen

Die Waldungen am Irchel weisen viele Eschenflächen in jedem Alter auf. Der Eschenkrebs ist stellenweise häufig, so im Junkertal, 550 m ü. M., beim Schlosse Teufen. Der Boden, obere Süßwassermolasse, ist gut. An den Waldrändern zeigt sich Eschenrosenbefall.

##### 2. Regensberg

Am Nordhang der Lägern bei Regensberg, in den Waldparzellen „Im Bann“ und „Im Süniker Weidgang“, 700 m ü. M., stehen viele stark krebskranke Eschen verschiedenen Alters. Das auf der Schattenseite der Längern liegende Gelände ist besonders in Muldenlagen feucht; stellenweise tritt die nackte Felsunterlage, Malm, zutage.

##### 3. Rümliang

Zwischen Oberglatt und Rümliang, in der Nähe der Grundwasserweiher und der Gießen des alten Glattlaufes, stehen vereinzelt Eschen. Einige dieser fünf- bis zwölfjährigen Bäume sind vom Eschenkrebs befallen. Die Krankheit tritt nur vereinzelt auf. Der Alluvialboden liegt 420 m ü. M.

##### 4. Bassersdorf

Im „Berg“ bei Bassersdorf, bei den „Römerweihern“ und in „Widem“, 500 m ü. M., stehen ältere Eschen mit Eschenrosenbefall, vor allem in den lichterem Waldpartien. In „Widem“ wächst auf nassem Moränenschutt der Würmeiszeit ein dichter Tannenforst, durchsetzt mit Eschenflächen. Sowohl diese angefliegenen, dichtstehenden, kümmerlichen Eschen als auch die schön wachsenden im benachbarten Flurbezirk „Längetsholz“ sind stark krebskrank.

##### 5. Katzenrüti

Krebskranke Eschen wachsen im Wald zwischen Regensberg und Watt, im „Oberem Hirscheeren“, 500 m ü. M. Die einzelnen Parzellen des Privatwaldes zeigen einen unterschiedlichen Baumbestand. Die angefliegenen Eschen sind sowohl im Alter als auch im Wuchs ganz verschieden. Der Boden, obere

Süßwassermolasse ohne Moränenbedeckung, ist sumpfig; an mehreren Stellen tritt Sickerwasser zutage.

An den krebskranken Eschen finden sich keine Eschenrosen, wohl aber an anderen, nicht krebskranken Eschen, die, ungefähr 100 m entfernt auf trockenem Boden stehend, den Waldrand bilden.

#### 6. Aegerten

Das Waldstück „Im Aegerten“ gehört zum Lehrrevier der ETH und liegt auf der Nordseite des Uetliberges, 775 m ü. M. Es bildet eine flache, nach Norden geöffnete Mulde mit sumpfigem Würmmoränenboden. Die Eschen sind nicht gepflanzt, sie wachsen frei, als Anflug, in einem Tannenschlag. Von einigen Säuberungen abgesehen, sind sie sich selbst überlassen.

#### 7. Mädikon

In der Nähe des Gutes Mädikon, am Nordhang des Albigrates, „Im Leiterli“, 740 m ü. M., stehen auf unterer Süßwassermolasse vereinzelt krebskranke Eschenbäumchen.

#### 8. Entlisberg

Dieser Standort krebskranker Eschen liegt am Entlisberg an einer nach Südwesten steil gegen die Sihl abfallenden Halde, 470 m ü. M. Der aus oberer Süßwassermolasse bestehende Hang weist viele Sickerwasseraustritte auf und ist zu Rutschungen geneigt. Neben den Eschen wachsen Fichten (*Picea abies*) und Eiben (*Taxus baccata*). In unmittelbarer Nähe stehende Eschen zeigen wohl starken Eschenrosenbefall, aber keinen Krebs.

#### 9. Buchenegg

Dieser Bestand von krebskranken Eschen liegt im „Großholz“ am Sträßchen von der vorderen Buchenegg zum Albispaß, 850 m ü. M. Der Boden, Moränenschutt der Rißeiszeit, ist nicht zu feucht. Die Eschen wachsen sehr dicht und sind sechs bis acht Jahre alt.

#### 10. Steg

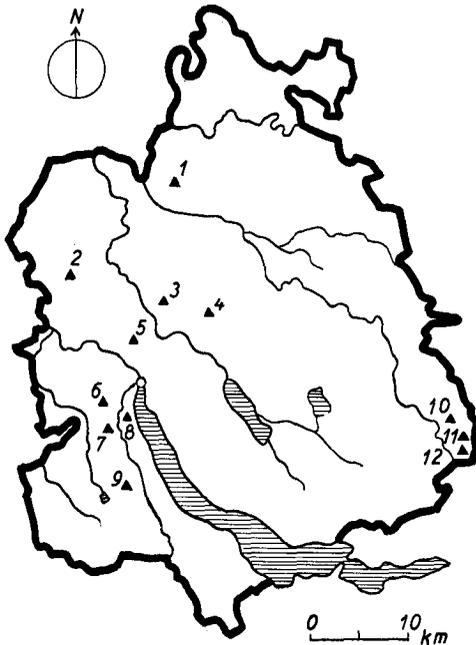
Eschenkrebskranke Eschen finden sich bei Steg im Tößtal im „Burgstall“, 870 m ü. M., am Weg zum Schnebelhorn. Die Eschen wachsen auf Nagelfluh. Der Krebsbefall ist mäßig.

#### 11. Hirzegg

Die Hirzegg, im Gebiete des Schnebelhorns, liegt 1100 m ü. M. Die erkrankten Eschen wachsen vereinzelt in sumpfigen Nagelfluhmulden. Vor allem ältere Bäume weisen an Stämmen und Ästen Krebsstellen auf.

#### 12. Schnebelhorn

Im Walde unterhalb des Gipfels des Schnebelhorns, 1250 m ü. M., stehen auf Nagelfluh krebskranke Eschen. Vorwiegend sind es ältere Bäume, die noch teilweise mit Eschenrosen behaftet sind.



Der Eschenkrebs findet sich somit an zahlreichen Stellen über große Teile des Kantons Zürich verbreitet (Abb. 10). Dabei werden besonders Eschen an schlechten Standorten (feuchte Böden, Dickungen usw.) häufig befallen.

Abb. 10.  
Übersicht der Fundstellen von Eschenkrebs im Kanton Zürich

- |               |                  |
|---------------|------------------|
| 1. Teufen     | 7. Mädikon       |
| 2. Regensberg | 8. Entlisberg    |
| 3. Rümlang    | 9. Buchenegg     |
| 4. Basserdorf | 10. Steg         |
| 5. Katzenrüti | 11. Hirzegg      |
| 6. Aegerten   | 12. Schnebelhorn |

## § 5. Das Krebsgewebe

### A. Anatomischer Bau

Zur mikroskopischen Untersuchung wurden die Krebsstücke drei bis vier Wochen in eine Glycerin-Alkohol-Lösung (1 Teil Äthylalkohol abs., 1 Teil Glycerin) eingelegt und mit dem Holzmikrotom geschnitten. Wird das Holz nur mit Wasser durchtränkt und gekocht, so trennt sich beim Schneiden die Rinde vom Holz, da das Kambium zerstört wird. Beim Durchtränken mit der Glycerin-Alkohol-Lösung ist dies selten der Fall. Die Schnitte können in 70 % Alkohol aufbewahrt werden.

Die mikroskopische Betrachtung des Krebsgewebes zeigt Veränderungen im Bau der Rindengewebe. Diese werden mehr parenchymatisch, das Sklerenchym verschwindet. Die sich im Verlaufe der Krankheit bildenden Korkschichten verlaufen ungefähr parallel zum Kambium. Korknachweis durch Färbung mit Gentiaviolett (SCHNEIDER-ZIMMERMANN, 1922; CIBA, 1940). VAN VLIET (1931) vermutet, daß die bei der Korkbildung auftretenden Spannungen zur Zerreißen der Gewebe und somit zur mechanischen Bildung von Höhlungen führen. Im Gegensatz dazu führt NOACK (1893) diese Lücken, die mit Bakterien angefüllt sind, auf die Tätigkeit der Bakterien zurück. Diese beiden Vorgänge schließen einander nicht aus; sie dürften gemeinsam zur Bildung der Höhlungen beitragen. Die Korkschichten werden wohl zum Abschluß des erkrankten Gewebes vom gesunden angelegt und stellen eine Abwehrreaktion des Wirtes dar (GÄUMANN, 1951).

Die Korkschichten vermögen jedoch die Ausbreitung der Krankheit lediglich zu verzögern, nicht aber zu verhindern.

In der Nähe des Krankheitsherdes verbreitern sich die Jahrringe.

## B. Der Nachweis der Mikroorganismen in den kranken Geweben

### 1. Nachweis der Bakterien

Durch Färbung der Schnitte mit Methylblau können in Zellen und Hohlräumen Bakterien nachgewiesen werden. Stark mit Bakterien durchsetzte Schleimmassen finden sich in allen Teilen der braun oder schwarz verfärbten Gewebepartien der Rinde und des Holzes. Die Bakterien dringen am weitesten im Kambium und in den direkt anliegenden Zellschichten der Rinde und des Holzes vor (Abb. 11).

### 2. Nachweis der Pilze

Die beste und sicherste Methode, Pilzhyphen im Holze festzustellen, ist die Färbung mit Baumwollblau (Methylwasserblau, BAVENDAMM 1936).

Methode: Es werden zwei Lösungen A und B benötigt:

Lösung A: Phenol	50 g	Lösung B: Lösung A
Milchsäure	50 g	mit 1 g
Glyzerin	50 ml	Baumwollblau.
Wasser dest.	100 ml	

Die Schnitte werden während 5 Min. mit der Lösung A durchtränkt und anschließend in der Lösung B gefärbt. Die Färbedauer richtet sich nach dem Objekt und beträgt 2—3 Min. Die überschüssige Farbe wird mit der Lösung A ausgewaschen. Bei erfolgreicher Färbung wird das Holzgewebe nur schwach, die Pilzhyphen dagegen leuchtend dunkelblau gefärbt. Mit der Baumwollblau-Färbung lassen sich, ausgenommen in den äußersten Partien (in Abb. 12 bei A), in allen Teilen des Krebsgewebes, auch in und zwischen

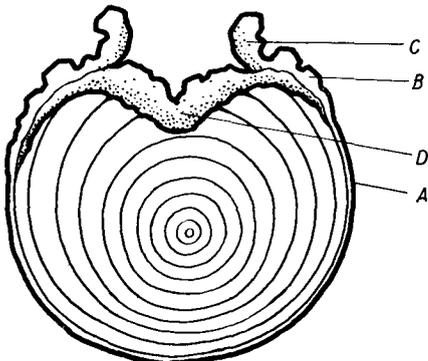


Abb. 11. Verteilung der Bakterien im Krebsgeschwür (schematisch). Die von Bakterien besiedelten Stellen sind punktiert

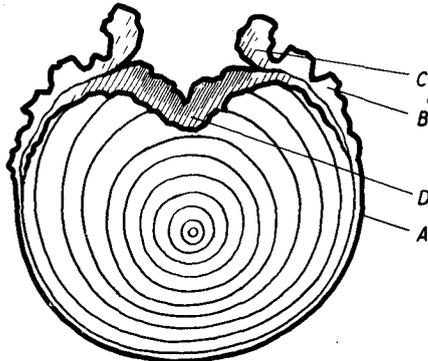


Abb. 12. Verteilung der Pilze im Krebsgeschwür (schematisch). Die von Pilzen besiedelten Stellen sind schraffiert

den Zellen des noch kaum verfärbten Holzes, Pilzhyphen nachweisen. Zwischen jungen und alten Krebsen besteht in der Durchdringung des Gewebes mit Pilzhyphen kein Unterschied. Praktisch finden sich in allen Partien, die Bakterien aufweisen, auch Pilzfäden. Ihre Dichte ist jedoch im Zentrum am größten und nimmt gegen den Rand des Krankheitsherdes ab.

## § 6. Die Mikroorganismen

### A. Isolierung und Bestimmung der Mikroorganismen

#### 1. Methode

Das Holzstück, aus dem die Mikroorganismen isoliert werden sollen, wird zur Entfernung aller äußerlich anhaftenden Keime mit einer 2‰ Sublimatlösung ( $\text{HgCl}_2$ ) behandelt. Im Impfkasten werden unter sterilen Bedingungen alle sichtbar verfärbten, braunschwarzen Stellen weggeschnitten. Das Holzstück wird nochmals kurz in die 2‰ Sublimatlösung getaucht und anschließend dreimal während 5 Min. in je 300 ml sterilem Wasser gewaschen. Aus dem Gewebe werden von verschiedenen Stellen 20 kleine Würfelchen,  $4 \times 4 \times 1$  mm, herausgeschnitten und je 4 auf eine Malzagarplatte gelegt, die in einem Wärmeschrank bei  $24^\circ \text{C}$  bebrütet wird. Von jedem Fundort werden mindestens zehn verschiedene Krebse, womöglich von mehreren Bäumen, untersucht.

4—5 Tage nach der Beimpfung der Platten beginnen die Mikroorganismen — Pilze und Bakterien — aus dem Holze heraus auf die Platten zu wachsen. Die Bakterien erscheinen um die Holzprobe herum auf der Agar-Oberfläche als feine, gelbe Punkte. Die Pilze bilden zuerst auf dem Holze einen feinen, weißen Myzel flaum, der später auf den Agar hinüberwächst.

#### 2. Bakterienreinkulturen

Die Bakterienkulturen wurden in Gelatineverdünnungsreihen hergestellt.

Methode: Von verschiedenen Bakterienkolonien eines Fundortes werden kleine Stücke ausgestochen und in sterilem Wasser suspendiert. Die Suspension wird durch sterile Watte filtriert und 1 ml in 9 ml flüssige Nährgelatine gegeben. Von diesen 10 ml wird 1 ml zu neuen 9 ml Nährgelatine pipettiert, und so werden 25 bis 30 Verdünnungsstufen hergestellt. Die Nährgelatine der einzelnen Stufen wird in Platten gegossen, die bei Zimmertemperatur im Dunkeln bebrütet werden.

In den letzten fünf bis zehn Verdünnungsstufen sind die Kolonien so weit voneinander entfernt, daß sie gut im Mikroskop betrachtet und isoliert werden können. Es zeigte sich, daß praktisch alle Kolonien gleich ausgebildet waren, sowohl in Form als auch in Farbe. Die Kolonien verflüssigen die Gelatine nicht. Sie sind rund, mit einem scharfen, leicht gekerbten Rande. Ihre Farbe ist weiß bis leicht gelblich. Einzelne dieser

Kolonien wurden für weitere Versuche auf Nähragar nach MEYER (1903) abgeimpft.

### 3. Pilzreinkulturen

Die Mehrzahl der Pilzreinkulturen konnte durch Überimpfen von wenig Myzel auf neue Malzagarplatten erhalten werden. Waren diese Kolonien mit Bakterien verunreinigt, so wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt.

**Methode:** Wenig abgeschabtes Myzel einer Kolonie wird in 10 ml sterilem Wasser suspendiert und 1 ml dieser Aufschwemmung für die Verdünnungsreihe verwendet. Jede Verdünnung wird für 30 Minuten auf eine Malzagarplatte gegossen. Die nach wenigen Tagen sichtbaren Kolonien werden auf neue Platten übertragen. Die Kulturen wurden auf Malz- oder Bierwürzeagar aufbewahrt. Auf Bierwürze wachsen die Kulturen üppiger und bilden, im Gegensatz zu den Malzagarkulturen, mehr Pigment.

Nach durchschnittlich zehn Tagen sind die Bakterien und Pilze auf allen Platten gut entwickelt. Solange sich die Kolonien nicht gegenseitig durchwachsen, können die einzelnen Mikroorganismen isoliert werden. Die Pilze unterscheiden sich durch verschieden gefärbte Myzelien. Hemmungen zwischen einzelnen Kolonien konnten keine beobachtet werden.

### 4. Die Bestimmung der Pilze

Zur Bestimmung der Myzelien und zur Gewinnung von Impfmateriale war es notwendig, Fruchtformen der Pilze zu erhalten.

Die Fruktifikation vieler Pilze kann durch Verschlechterung der Lebensbedingungen (GÄUMANN, 1949) gefördert werden. Die Pilze wurden auf verschiedenen Nährsubstraten gezogen, wie Malzagar, Reis, Weizenstroh und Eschensägemehl. Weizenstroh und Eschensägemehl wurden mit destilliertem Wasser, Brunnenwasser oder Knopscher Nährlösung, mit und ohne Zusatz von Hoagland A—Z (FREY-WYSSLING, 1949), aufgeschwemmt. Auf Weizenstroh, vor allem aber auf Eschensägemehl, ist das Wachstum schlecht; nach Monaten bildeten sich nur vereinzelt Konidienlager. Malzagar und Reis dagegen ermöglichen ein üppiges Myzelwachstum mit starker Konidienbildung.

**Filterpapiermethode:** Ein umgekehrter Faltenfilter wird mit der Nährlösung in einem Erlenmeyerkolben sterilisiert. Der Pilz wächst nicht im Nährmedium, sondern auf dem Filter. Als Nährlösung wurden:

Brunnenwasser  
Knop  
Knop + 1 ml/l Hoagland A—Z

verwendet. Die Zellulose des Filterpapiers diente als C-Quelle.

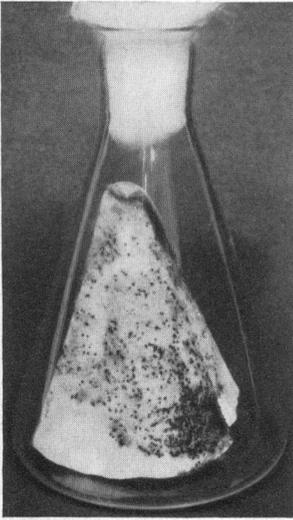


Abb. 13. Konidienlager einer Tageslichtkultur von *Pleospora herbarum* auf Filterpapier mit KNOPScher Nährlösung.  
 $\frac{2}{3}$  nat. Größe

Diese Methode ergab die besten Ergebnisse. Die Zahl der Konidienlager ist bei allen Pilzen in den Brunnenwasserkulturen am kleinsten. Auf Knop ohne Zusatz von Hoagland A—Z ist sie im allgemeinen, besonders bei *Pleospora herbarum* (Persoon) Rabenhorst, am größten. Bei allen Tageslichtkulturen ist die Zahl der Konidienlager größer als bei den Dunkelkulturen.

Zusammen mit Dr. E. MÜLLER konnten die Pilze an Hand der Konidienformen bestimmt werden.

Auf Bierwürzeagar wächst *Fusarium lateritium* Nees mit einem leuchtend roten Myzel, *Pleospora herbarum* (Persoon) Rabenhorst mit einem olivgrünen bis braunen Myzel und *Plenodomus Rabenhorstii* Preuß. mit einem schwarzgrünen bis schwarzen Myzel.

Die übrigen, nur vereinzelt auftretenden Mikroorganismen wurden nicht näher bestimmt. Für die weiteren Versuche wurden nur die Mikroorganismen gewählt, die wirklich immer und reichlich auftraten.

## B. Die Verteilung der Mikroorganismen im Krebse

Das Ergebnis der mikroskopischen Untersuchungen der gefärbten Schnitte kann durch Isolierung der Mikroorganismen aus den verschiedenen Zonen bestätigt werden. Mehrere Krebse wurden unter sterilen Bedingungen in Scheiben und diese wieder in Sektoren zerlegt. Die diesen Sektoren entnommenen möglichst kleinen Holzstücke wurden auf Malzagarplatten ausgelegt.

In Gewebestücken, die unter noch nicht verfärbter Rinde lagen (Abb. 11 und 12 Zone A), lassen sich so weder Bakterien noch Pilze feststellen. Aus dem Holze der Zone B, unter der verfärbten Rinde, wachsen meist nur Bakterien. Das Gewebe der Zonen C und D ist von Bakterien und von Pilzen durchwachsen. In der Zone D überwiegen die Pilze. Wird ein Sektor in die Tiefe differenziert, so ergibt sich: In dem Gewebe an der Grenze des Krankheitsherdens finden sich in einer schmalen Zone nur Bakterien; gegen das Krebszentrum zu steigt die Zahl der Pilzkolonien.

Zusammenfassend kann gesagt werden: An der Grenze zwischen gesundem und krankem Gewebe lassen sich meist nur Bakterien feststellen. Im Krebsgewebe finden sich Bakterien und Pilze.

### C. Die Mikroorganismen aus Krebsen verschiedener Fundorte

Nach den in den vorhergehenden Abschnitten beschriebenen Methoden wurde aus Krebsen aller Fundorte die Mikroflora isoliert und bestimmt. Das überraschende Ergebnis ist in Tabelle 1 zusammengestellt.

Aus allen Krebsen sämtlicher Fundorte lassen sich neben *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* nicht beliebige, zufällige Pilze und Bakterien, sondern immer die drei gleichen Pilze (*Fusarium lateritium*, *Pleospora herbarum* und *Plenodomus Rabenhorstii*) isolieren. Der Anteil der einzelnen Pilze an der Erkrankung schwankt von Fundort zu Fundort. Das eine Mal ist *Fusarium lateritium* am häufigsten (z. B. Hirzegg, Schnebelhorn), das andere Mal überwiegt *Plenodomus Rabenhorstii* (z. B. Regensberg). *Pleospora herbarum* ist meist am schwächsten vertreten. In einem Gebiet mit einer Längenerstreckung von 45 km, von Regensberg bis zum Schnebelhorn und mit einer Höhendifferenz von 880 m, ist somit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* immer von der gleichen Mikroorganismengesellschaft, Mikroassoziation, begleitet. Dabei sind offenbar *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* als der Primärerreger, die drei Pilze als die Sekundärparasiten anzusehen.

Die Beziehungen zwischen diesen vier Mikroorganismen *in vivo* und *in vitro* sollen in den folgenden Kapiteln untersucht werden.

Tabelle 1

Übersicht der Mikroorganismen der verschiedenen Fundorte

Fundorte:	K	H	Anzahl der Holzproben (in %; H = 100 %) mit Kolonien von:				
			<i>Pseudomonas savastanoi</i>	<i>Fusarium lateritium</i>	<i>Pleospora herbarum</i>	<i>Plenodomus Rabenhorstii</i>	unbestimmte Pilze
Regensberg	15	300	98	55	26	91	12
Rümlang	10	200	88	48	36	41	7
Bassersdorf	10	200	98	88	70	55	4
Katzenrüti	15	300	92	80	55	57	13
Aegerten	20	400	95	76	69	57	6
Mädikon	10	200	89	75	60	73	12
Entlisberg	10	200	88	71	75	65	9
Bucheneegg	10	200	90	66	48	43	5
Steg	10	200	93	98	52	26	8
Hirzegg	10	200	88	93	56	36	4
Schnebelhorn	10	200	93	82	39	29	6

K = Zahl der untersuchten Krebse. H = Zahl der untersuchten Holzproben

Eschenrose und Klunker, die nach den gleichen Methoden untersucht wurden, haben dagegen nur wenige und ganz andere Mikroorganismen.

## 2. KAPITEL

Die Mikroorganismen *in vitro*

## § 1. Methoden

## A. Chemikalien und Nährlösungen

Die Nährlösungen wurden mit Substanzen der Qualität „reinst“ hergestellt.

1. Nährlösung nach Czapek (THOM, 1930):  
 $\text{NaNO}_3$  3,0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,5 g, KCl 0,5 g,  
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,01 g, Saccharose 30,0 g,  $\text{H}_2\text{O}$  dest. 1000 ml.
2. Nährlösung nach Fries I (FRIES, 1938):  
 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1,0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0 g, KCl 0,5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,5 g,  $\text{FeCl}_3$   
 (1%ige Lösung) 10 Tropfen, Glukose 10 g,  $\text{H}_2\text{O}$  dest. 1000 ml.
3. Nährlösung nach Fries II (FRIES, 1938):  
 $\text{NH}_4$ -Tartrat 5,0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,5 g,  $\text{FeCl}_3$  (1%ige  
 Lösung) 10 Tropfen, Glukose 20 g,  $\text{H}_2\text{O}$  dest. 1000 ml.
4. Nährlösung nach Fries III (FRIES, 1938):  
 $\text{NH}_4$ -Tartrat 5,0 g,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1,0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$   
 0,5 g, NaCl 0,1 g,  $\text{CaCl}_2$  0,1 g,  $\text{FeCl}_3$  (1%ige Lösung) 10 Tropfen,  
 Glukose 20 g,  $\text{H}_2\text{O}$  dest. 1000 ml.
5. Nährlösung nach Knop mit Glukose (FREY-WYSSLING, 1949;  
 FLÜCK, 1955):  
 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  1,0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,25 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,25 g, KCl 0,125 g,  
 $\text{FeCl}_3$  Spur, Glukose 20 g,  $\text{H}_2\text{O}$  dest. 1000 ml.
6. Nährlösung nach Raulin (THOM, 1930):  
 $\text{H}_2\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$  4,0 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$  4,0 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0,6 g,  $\text{K}_2\text{CO}_3$   
 0,6 g,  $\text{MgCO}_3$  0,4 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,25 g,  $\text{ZnSO}_4$  0,07 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$   
 0,07 g, K-Silikat 0,07 g, Saccharose 70,0 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1500 ml.
7. Nährlösung nach Richard 5 (Luz, 1934):  
 $\text{NH}_4\text{NO}_3$  10,0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5,0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  2,5 g,  $\text{FeCl}_3$  0,02 g,  
 Glukose 50,0 g,  $\text{H}_2\text{O}$  dest. 1000 ml.
8. Nährlösung nach Stapp I (STAPP, 1942):  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  1,0 g,  $\text{CaCl}_2$  0,5 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,0 g,  $\text{KNO}_3$  5,0 g,  
 Saccharose 20,0 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1000 ml.
9. Nährlösung nach Stapp II (STAPP, 1942):  
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  1,0 g,  $\text{CaCl}_2$  0,5 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,0 g, Asparagin 5,0 g,  
 Glukose 20,0 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1000 ml.
10. Nährlösung nach Weindling (BRIAN und HEMMING, 1945):  
 $(\text{NH}_4)_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$  2,0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2,0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  1,0 g,

$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,01 g, Dextrose 25,0 g,  $\text{H}_2\text{O}$  dest. 1000 ml, pH (mit  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 3,5.

#### 11. Nährlösung nach Woolley (WOOLLEY, 1952):

$\text{KNO}_3$  5,0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,8 g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,8 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,2 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0,1 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,02 g, Saccharose 10,0 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1000 ml.

### B. pH-Messung

Die Bestimmung der pH-Werte erfolgte elektrometrisch mit einem Glaselektrodengerät.

### C. Impfmateri al

#### 1. Bakterien

Als Impfmateri al wurde eine sieben Tage alte Nährbouillonkultur von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini*, die bei 24 ° C im Dunkeln inkubiert worden war, verwendet.

#### 2. Pilze

Durch Zugabe von 100 ml destilliertem sterile m Wasser zu einer Reiskultur wurde eine Konidien suspension hergestellt. Die Reiskultur war während zehn Tagen im Dunkeln bei 18 ° C und anschließend zehn Tage an einem Zimmerfenster inkubiert worden.

### D. Nachweis biologisch aktiver Stoffe

#### 1. Plattenteste

Als Mikroorganismen bei den üblichen Plattentesten (z. B. GROVE und RANDALL, 1955) wurden verwendet:

<i>Bacillus subtilis</i>	. . . . .	Stamm ETH 2016
<i>Escherichia coli</i>	. . . . .	Stamm ETH 2018
<i>Bacillus megatherium</i>	. . . . .	Stamm ETH 2040
<i>Candida vulgaris</i>	. . . . .	Stamm ETH 5897
<i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i>	. . . . .	Stamm ETH 5870

Herstellung des Extraktes. Das Kulturfiltrat wird zweimal mit der Hälfte seines Volumens mit Essigester kräftig ausgeschüttelt. Die beiden vereinigten Auszüge werden am Vakuum einer Wasserstrahlpumpe auf dem Wasserbad bei 50 ° C zur Trockene eingedampft und der Rückstand in destilliertem Wasser (1 ml/100 ml Kulturfiltrat) gelöst.

Der zum Extrahieren benötigte Essigester wurde zuerst mit Sodawasser gewaschen und eine Probe als Kontrolle zur Trockene eingedampft und wie angegeben getestet.

In gleicher Art und Weise wurde auch die nicht inkubierte Nährlösung als Kontrolle getestet.

## 2. *Ustilago*-Test

Der von KOBEL (1951) und KERN (1952) beschriebene Sporenkeimungstest mit Brandsporen von *Ustilago zaeae* (Beckm.) Ung. eignet sich in vielen Fällen zum Nachweis oder zur Aufarbeitung biologisch aktiver Stoffe in Kulturfiltraten. Die zu prüfende Lösung wird in einer Verdünnungsreihe mit Leitungswasser vermischt, eine Sporensuspension aus Brandsporen und Keimungsnährlösung zu den einzelnen Verdünnungsstufen gebracht und nach 16 bis 18 Stunden der Prozentsatz der gekeimten Sporen bestimmt. Als Einheitsgrenze wird die Konzentration definiert, die die Sporenkeimung um 50 % herabsetzt (LD<sub>50</sub>). Die LD<sub>50</sub> werden graphisch oder rechnerisch aus den Keimprozenten der Verdünnungsstufen bestimmt. Die Aktivität wird in *Ustilago*-Einheiten/ml (UE/ml) angegeben.

## 3. Welketest

Zur Charakterisierung und Symptomerkennung biologisch aktiver Stoffe wurden Welkeversuche bei künstlichem Licht, einer Temperatur von  $21 \pm 1^\circ \text{C}$  und einer Luftfeuchtigkeit von 60 bis 70 % mit sechs bis acht Wochen alten Tomatensprossen durchgeführt. Die Sprossen umfassen die obersten vier Blätter und haben ein Gewicht von 1 bis 2 g. Beschreibungen finden sich bei GÄUMANN, NAEF-ROTH und KOBEL (1952); ZÄHNER (1954) und LINSKENS (1955).

### § 2. *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* (Brown) Dowson

*Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* (DOWSON, 1943) ist eine Varietät des Ölbaumkrebserregers, *Pseudomonas savastanoi* (E. F. SMITH) STEVENSON (E. F. SMITH, 1905 und 1913; C. O. SMITH, 1922 und BROWN, 1932). Eine weitere Varietät von *Pseudomonas savastanoi* ist auch der Erreger des Oleanderkrebses, *Pseudomonas tonelliana* (Ferraries) Burkholder oder *Pseudomonas savastanoi* var. *nerii* C. O. SMITH (ELLIOT, 1951).

Synonym zu *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* (Brown) Dowson sind (Dowson, 1943; ELLIOT, 1951):

*Bacterium savastanoi* var. *fraxini* Brown

*Phytomonas savastanoi* var. *fraxini* (Brown) Magrou

*Agrobacterium savastanoi* var. *fraxini* (Brown) Starr und Weiss

*Pseudomonas fraxini* (Brown) Skoric.

Die Bakterien lassen sich mit Methylenblau („Ciba“) färben. Sie erscheinen als blaue Stäbchen, deren Größe 0,4 bis 0,8  $\mu$  in der Breite und 1,4 bis 3,4  $\mu$  in der Länge beträgt. Die Bakterien bewegen sich mit Hilfe von Geißeln, die durch eine Beizung mit Casares-Gillösung („Ciba“) und nachfolgender Färbung mit Karbol-Fuchsin Ziehl-Neelsen („Ciba“) gut nachgewiesen werden können (CIBA, 1940). Die einzelnen Geißeln lassen sich nicht deutlich unterscheiden, doch kann ihr gemeinsamer Ansatzpunkt, der Pol, an einem Ende des Stäbchens erkannt werden. In Kulturen treten die Bakterien einzeln auf, selten in Paaren oder gar in kurzen Ketten. Die Gelatine wird nicht verflüssigt. Auf Malzagar scheiden die Bakterien geringe

Mengen eines grün fluoreszierenden, im UV-Licht gut sichtbaren Pigments ins Nährsubstrat aus.

*Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* ist in Österreich, Jugoslawien, Deutschland, Italien, England (ELLIOT, 1951), Holland (VAN VLIET, 1931) und der Schweiz nachgewiesen. Als Wirtspflanzen sind bekannt:

die europäische Esche, *Fraxinus excelsior*,  
die amerikanische Esche, *Fraxinus americana*.

Infektionsversuche auf dem Ölbaum, *Olea europaea*, blieben ohne Erfolg (ELLIOT, 1951; OLIVEIRA, 1940; BROWN, 1932).

#### A. Wachstum und Toxinbildung in vitro

Für die Kulturversuche in vitro und die Infektionsversuche wurde ein aus einem Krebs der Fundstelle Bassersdorf isolierter Stamm von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* (Stamm ETH M 142) verwendet.

##### 1. Die Temperatur als Wachstumsfaktor

Die optimale Wachstumstemperatur liegt nach ELLIOT (1951) bei 23 bis 24° C, die höchst ertragbare bei 32° C und die Minimaltemperatur bei 5° C.

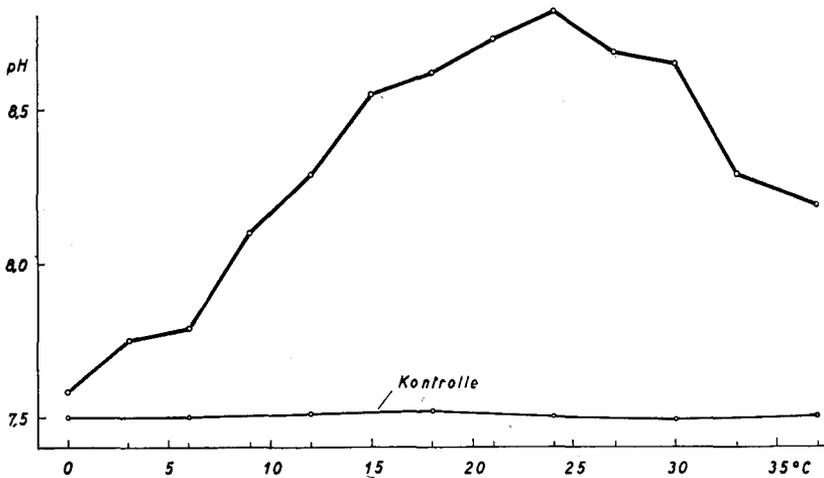


Abb. 14. *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini*. pH-Werte in Nährbouillon-Kulturen bei verschiedenen Temperaturen nach vier Wochen

Die Kurve in Abb. 14 wurde durch die Messung der mit der Lebenstätigkeit der Bakterien zusammenhängenden Veränderungen der pH-Werte der Kulturlösung erhalten.

Die auf diese Weise ermittelte optimale Wachstumstemperatur liegt ebenfalls bei 23 bis 24° C; bei 0°, 33° und 37° C ist das Wachstum dagegen nicht völlig unterbunden. Die Trübung der Nährlösung ist, besonders bei der Stufe 0° C, außerordentlich schwach. Der Unterschied gegenüber den Angaben von ELLIOT (1951) dürfte als Besonderheit des verwendeten Stammes erklärt werden.

## 2. Wachstum und Toxinbildung auf verschiedenen Nährlösungen

*Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* wurde auf den Nährlösungen (ohne Stapp II) der S. 14 kultiviert. Diese „Mineral“-Nährlösungen enthalten außer Zucker — Glukose oder Saccharose — und Weinsäure — als Säure oder Anion — keine weiteren organischen C- und, außer dem in  $\text{NO}_3^-$  oder  $\text{NH}_4^+$  gebundenen Stickstoff, keine weiteren N-Quellen.

Die Kulturen wurden während sechs Wochen bei 24° C gehalten. *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* wächst auf allen diesen Nährlösungen, mit Ausnahme der Nährlösung Stapp I, schlecht. Der pH-Wert wird überall, im Gegensatz zu den Nährbouillonkulturen, um weniges herabgesetzt. Im Kulturfiltrat aller Nährlösungen lassen sich keine *Ustilago*-aktiven Stoffe nachweisen; im Essigesterextrakt wird nur bei der Nährlösung Stapp I eine *subtilis*-Aktivität gefunden.

Tabelle 2

Wachstum, *subtilis*- und *Ustilago*-Aktivität von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf verschiedenen „Mineral“-Nährlösungen nach sechs Wochen bei 24° C

Nährlösung	pH		Wachstum	<i>Subtilis</i> - Aktivität des Kulturfiltrat- Extraktes Hemmhof $\varnothing$ in mm	<i>Ustilago</i> - Aktivität UE/ml Kulturfiltrat
	Anfang	Ende			
Czapek .....	3,5	3,7	spärlich	0 mm	0 UE/ml
Fries I .....	4,6	4,0	spärlich	0 mm	0 UE/ml
Fries I + KOH .....	6,0	3,8	spärlich	0 mm	0 UE/ml
Fries II .....	6,1	5,7	spärlich	0 mm	0 UE/ml
Fries III .....	4,6	4,0	spärlich	0 mm	0 UE/ml
Fries III + KOH .....	6,0	5,4	spärlich	0 mm	0 UE/ml
Knop mit Glukose ...	5,6	4,8	spärlich	0 mm	0 UE/ml
Raulin .....	5,6	4,0	spärlich	0 mm	0 UE/ml
Richard 5 .....	5,6	4,8	spärlich	0 mm	0 UE/ml
Stapp I .....	7,0	4,6	gut	17 mm	0 UE/ml
Weindling .....	5,6	3,5	spärlich	0 mm	0 UE/ml
Woolley .....	5,6	4,7	spärlich	0 mm	0 UE/ml

Unter gleichen Bedingungen wurde *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf einigen für Bakterien geeigneten Nährlösungen mit besonderen organischen Zusätzen gezüchtet. Diese in Tabelle 3 zusammengestellten Nährlösungen enthalten, neben genau definierten organischen Zusätzen, wie Asparagin, auch andere, in ihrer Zusammensetzung unbekannte, wie Pepton oder Fleischextrakt (Oxoid Lab Lemco).

In dieser Nährlösungsreihe ist das Wachstum von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* bedeutend besser als in der vorhergehenden. Die pH-Werte steigen in zwei Fällen, in den übrigen wird durch das Bakterium die Azidität erhöht. Das Kulturfiltrat zeigt keine *Ustilago*-Aktivität, doch der Extrakt des Kulturfiltrates enthält ein *subtilis*-aktives Agens.

Tabelle 3

Wachstum, *subtilis*- und *Ustilago*-Aktivität von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf verschiedenen Nährlösungen, die organische Zusätze enthalten. Kultur sechs Wochen bei 24° C

Nährlösung	N-Quellen	pH		Wachstum Oberflächen- haut vorhanden: + fehlt: —	<i>Subtilis</i> - Aktivität des Kulturfiltrat- Extraktes Hemmhof $\phi$ in mm	<i>Ustilago</i> - Aktivität UE/ml Kulturfiltrat
		Anfang	Ende			
Dame (DAME, 1938)	5 g Pepton 5 g Harnstoff	5,6	4,6	gut —	20 mm	0 UE/ml
Stalder (STALDER, 1951)	10 g Difco Yeast Extrakt	6,2	8,8	gut +	Spur	0 UE/ml
Stapp II (STAPP, 1942)	5 g Asparagin	7,0	3,4	gut —	22 mm	0 UE/ml
Mushin (KUNZ, 1952)	3 g Pepton	6,8	5,6	gut —	Spur	0 UE/ml
Nährbouillon (MEYER, 1903)	10 g Pepton 10 g Fleisch- extrakt	7,2	8,4	gut +	12 mm	0 UE/ml
Wotherspoon (WOTHERSPOON, 1931)	1 g Asparagin	6,7	3,5	gut —	Spur	0 UE/ml

Tabelle 4

Wachstum und Toxinbildung von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf modifizierten Nährlösungen nach Stapp II, nach acht Wochen bei 24° C

Nährlösung	pH		Wachstum	<i>Subtilis</i> -Aktivität des Kulturfiltrat- Extraktes Hemmhof $\phi$ in mm	<i>Ustilago</i> - Aktivität UE/ml Kulturfiltrat
	Anfang	Ende			
Stapp II + 5 g/l $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ..	6,5	5,8	schlecht	18 mm	0 UE/ml
Stapp II + 5 g/l $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ..	6,5	5,6	schlecht	14 mm	0 UE/ml
Stapp II (5 g/l Asparagin) ...	6,5	3,3	mittel	20 mm	0 UE/ml
Stapp II + 5 g Harnstoff ...	6,5	4,2	mittel	17 mm	0 UE/ml
Stapp II + 5 g/l Glykokoll .	6,5	3,5	gut	17 mm	0 UE/ml
Stapp II + 5 g/l Glutamins. .	6,5	4,9	gut	13 mm	0 UE/ml
Stapp II + 2 g/l Asparagin .					
+ 0,1 g/l Trypto. . .	6,5	3,3	gut	23 mm	0 UE/ml
Stapp II + 5 g/l Pepton . . .	6,5	3,3	gut	20 mm	0 UE/ml
Stapp II + 2 g/l Asparagin .					
+ 5 g/l Glutamins. .	6,5	3,4	gut	22 mm	0 UE/ml

*Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* bildet vor allem dann ein biologisch aktives Stoffwechselprodukt, wenn organisch gebundener Stickstoff vorhanden ist.

Die Nährlösung nach Stapp II wurde daher durch Zugabe verschiedener Stickstoffquellen modifiziert (Harnstoff,  $\text{NH}_2\text{CONH}_2$ ; Asparagin,  $\text{NH}_2\text{COCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ ; d,l-Tryptophan,  $\text{C}_8\text{H}_6\text{NCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ ; Glykokoll,  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$  und d,l-Glutaminsäure,  $\text{COOH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ ).

Die Kulturen wurden während acht Wochen bei  $24^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

Das Wachstum ist auf den Nährlösungen mit organisch gebundenem Stickstoff besser als auf denen, die ihn in Form von  $\text{NH}_4^+$  oder  $\text{NO}_3^-$  enthalten. Das zeigt sich sowohl visuell in der unterschiedlichen Trübung, als auch in der verschieden starken Veränderung der pH-Werte. Die organischen Stickstoffquellen stellen gleichzeitig noch zusätzliche Kohlenstoffquellen dar. Eine Kombination mehrerer C- und N-Quellen kann wahrscheinlich besser ausgenutzt werden als jede Komponente für sich (STEINBERG, 1934; GAMP, 1923; WOLF und WOLF, 1947).

Auf die Toxinbildung haben die einzelnen Zusätze verschiedene Wirkung. Am besten eignet sich eine Mischung von 2 g/l Asparagin + 0,1 g/l Tryptophan.

Zugabe von  $\text{TiSO}_4$ : Da STAPP (1942) durch Zugabe von  $\text{TiSO}_4$  die Virulenz von *Pseudomonas tumefaciens* stark steigern konnte, wurde versucht, mit  $\text{TiSO}_4$  auch die Toxinbildung von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* zu beeinflussen.

Stapp II ohne  $\text{TiSO}_4$  Hemmung 20 mm  $\phi$ ,

Stapp II mit 0,0001 %  $\text{TiSO}_4$  Hemmung 21 bis 22 mm  $\phi$ .

$\text{TiSO}_4$  übt auf die Toxinbildung einen günstigen Einfluß aus.

### 3. Die Abhängigkeit der Toxinbildung von der Zeit

*Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* wurde während acht Wochen bei  $24^\circ\text{C}$  auf der Nährlösung Stapp II inkubiert. Alle zwei Wochen wurden der pH-Wert und die *subtilis*-Aktivität bestimmt (Tabelle 5).

Tabelle 5

*Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini*. Abhängigkeit der Toxinbildung von der Zeit. Nährlösung Stapp II bei  $24^\circ\text{C}$

Zeit	pH	<i>Subtilis</i> -Aktivität des Kulturfiltrat- Extraktes Hemmhof $\phi$ in mm	Sedimentbildung
0 Wochen	6,5	0 mm	—
2 Wochen	5,5	0 mm	—
4 Wochen	4,2	10 mm	spärlich
6 Wochen	4,3	14 mm	mäßig
8 Wochen	4,2	20 mm	stark

Nach vier Wochen erreicht der pH-Wert seinen tiefsten Stand. Die merkliche Toxinbildung setzt in diesem Zeitpunkt ein und steigt langsam an. Da zugleich Sediment abgelagert wird, dürfte zwischen Toxinbildung und Autolyse der Bakterien ein Zusammenhang bestehen.

#### 4. Toxinproduktion bei verschiedenen Stämmen

Fünf Stämme von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* von verschiedenen Eschenkrebs-Standorten (Stamm ETH M 141 Regensburg, Stamm ETH M 142 Bassersdorf, Stamm ETH M 143 Schnebelhorn, Stamm ETH M 144 Mädikon und Stamm ETH M 145 Aegerten) wurden während acht Wochen bei 24° C auf Stapp II kultiviert und ihre Toxinproduktion verglichen.

Die Toxinproduktion ist nicht bei allen Stämmen gleich groß. Am aktivsten erwiesen sich Stamm ETH M 141 Regensburg und Stamm ETH M 142 Bassersdorf. Wie weit die Fähigkeit der einzelnen Stämme, Toxin zu bilden, durch die Kulturdauer auf künstlichen Nährböden beeinflusst wird, muß noch untersucht werden.

#### B. Aufarbeitung der toxinhaltigen Kulturlöslösungen

Mit Hilfe des *subtilis*-Plattentestes können die toxinhaltigen Kulturlösungen aufgearbeitet werden.

Das aktive Agens läßt sich durch verschiedene organische Lösungsmittel (Äther, Essigester [Äthylacetat], Chloroform und Benzol, nicht aber mit Petroläther) aus der Kulturlösung extrahieren. Am besten eignet sich Essigester, da keine störenden Emulsionen entstehen.

Die Kulturlösung (die Bakterien brauchen nicht abgetrennt zu werden) wird dreimal mit Essigester (einmal mit der Hälfte und zweimal mit je ein Viertel des zu extrahierenden Volumens) kräftig während längerer Zeit im Scheidetrichter ausgeschüttelt. Die vereinigten Essigesterauszüge werden auf dem Wasserbad bei 50° C am Vakuum zur Trockene eingedampft. Der Rückstand, der Rohextrakt, ist braun und zähflüssig.

Zur weiteren Reinigung wird der Rohextrakt in einen sauren, neutralen und basischen Anteil getrennt. Die gesamte Aktivität bleibt im farblosen Neutralteil. Die aktive Substanz ist ein Neutralstoff. Ob sie aus einer oder mehreren Komponenten besteht, kann nur eine weitere Untersuchung mit Hilfe der Säulen- und Papierchromatographie zeigen.

#### C. Wirkungen des Toxins

Das Agens hemmt nicht nur *Bacillus subtilis*, sondern auch *Escherichia coli*, *Bacillus megatherium*, *Candida vulgaris* und *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*, jedoch in verschiedenem Ausmaße. An Tomatensprossen erzeugt der Rohextrakt Welkeschäden. Der Stengel und die Blattstiele kollabieren, doch bleiben die Fiederblättchen voll turgeszent. Bei ihnen bilden sich die ersten Nekrosen längs der Mittelrippe.

Der hier beschriebene Welkestoff von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* ist ziemlich sicher verschieden von den Glukosanen des *Pseudomonas tumefaciens* (HODGSON et al., 1947), welche an Tomatenpflanzen grundsätzlich andere Welkesymptome auslösen.

Ob die aktive Substanz von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* in der krebserkrankten Esche gebildet wird, bleibt noch zu untersuchen.

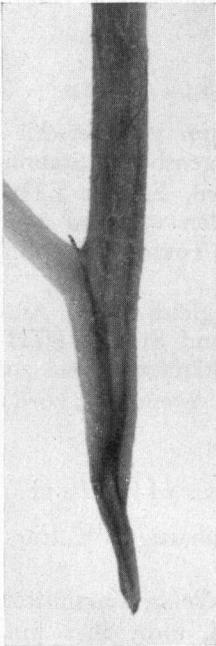


Abb. 15

Abb. 15. Welkesymptome am Stengel eines Tomatenprosses, ausgelöst mit dem Rohextrakt des Kulturfiltrates von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf Nährlösung Stapp II.

Leicht vergrößert

Abb. 16 (links). Symptome auf Tomatenblättern, ausgelöst mit dem Rohextrakt des Kulturfiltrates von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf Nährlösung Stapp II.  $\frac{2}{3}$  nat. Größe

Abb. 17 (rechts). Symptome auf Tomatenblättern, ausgelöst mit dem Rohextrakt des Kulturfiltrates von *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf Nährlösung Stapp II.  $\frac{2}{3}$  nat. Größe



Abb. 16



Abb. 17

§ 3. *Fusarium lateritium* Nees

## A. Allgemeines

*Fusarium lateritium* ist als Erreger von Knospenschäden, Fruchtfäule und Spitzendürre von Fruchtbäumen aller Art weit verbreitet. Ebenso tritt es an frostgeschädigten Pflanzen, unterirdischen Pflanzenteilen und vielfach zusammen mit Rindenfäule und *Nectria*-Krebs an verschiedenen Bäumen auf. *Fusarium lateritium* kommt in allen Weltteilen vor, besonders in der gemäßigten Zone.

Die Hauptfruchtform, *Gibberella baccata* (Wallr.) Sacc., ist auf vielen Bäumen nachgewiesen, so auch auf *Fraxinus excelsior* (WOLLENWEBER und REINKING, 1935; SACCARDO, 1898).

*Fusarium lateritium* (Stamm ETH M 146 Bassersdorf und Stamm ETH M 147 Aegerten) wächst auf Malzagar und im Malzwasser (mit Glaswolle als Myzelstütze) mit einem kirsch- bis purpurrotem Myzel. Das Luftmyzel ist weiß bis gelblich getönt. Auf geeigneten und dem Licht ausgesetzten Nährböden werden in ziemlich kompakten Schleimen, den Pionnotes, Konidien gebildet. Diese Nährböden wurden schon früher (Seite 11) näher beschrieben. Vorherrschend sind 5-septierte Konidien von der Größe  $45 \mu \times 3,2$  bis  $4,5 \mu$ . Der Durchschnitt auf 100 Messungen ergibt  $50 \mu \times 4,2 \mu$ . Neben diesen Quinqueseptaten kommen aber noch 3- bis 7-septierte vor. Die Konidien sind sichelförmig, ihre gerundeten Enden verzüngen sich.

B. Wachstum und Toxinbildung *in vitro*

Für diese Versuche wurde *Fusarium lateritium* Stamm ETH M 146 Bassersdorf verwendet.

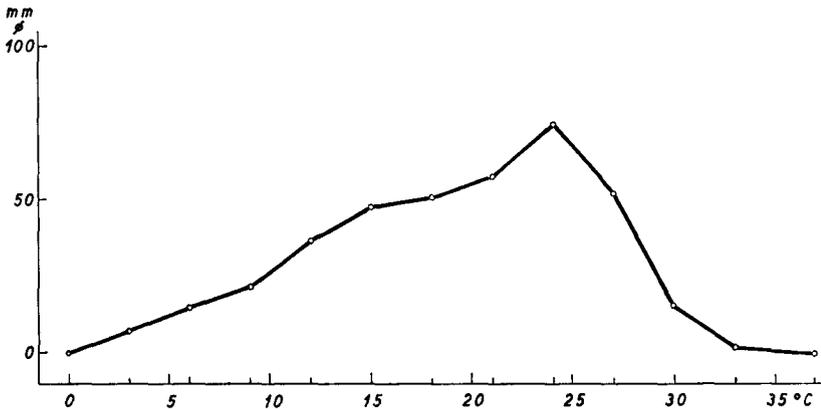


Abb. 18. Wachstum von *Fusarium lateritium* auf Malzagar. Mittlerer Durchmesser der Plattenkulturen bei verschiedenen Temperaturen nach zehn Tagen. Ordinate: Durchmesser in mm, Abszisse: Temperatur in °C

Der Zusammenhang zwischen Wachstum und Temperatur wurde bestimmt durch Messung des mittleren Durchmessers von je zehn Kolonien von

*Fusarium lateritium*, die bei verschiedenen Temperaturen von 0° bis 37° C, in Intervallen von 3° C, gewachsen waren (Abb. 18).

Das Wachstumsoptimum liegt, übereinstimmend mit den Angaben der Literatur (OUDEMANS, 1923), bei 23° bis 24° C. Auffallend ist das mit steigender Temperatur gleichmäßig zunehmende Wachstum sowie der starke Abfall bei Temperaturen über 24° C.

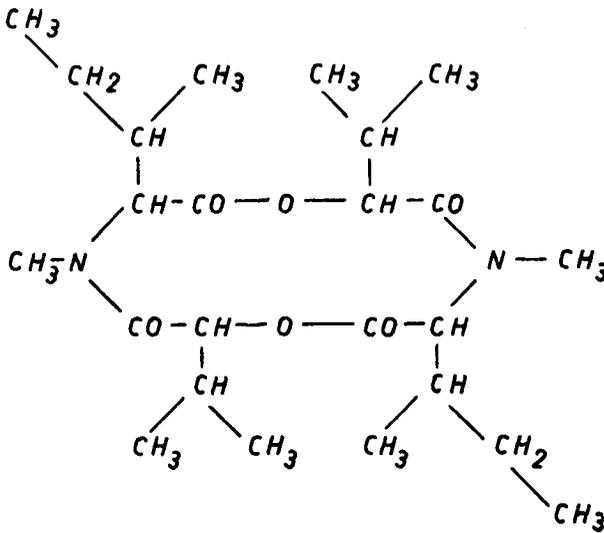
Die Gruppe der Fusarien ist schon mehrfach auf toxische Stoffwechselprodukte untersucht worden. Von verschiedenen Fusarien sind mehrere Antibiotika bekannt geworden (GÄUMANN et al., 1947; COOK et al., 1947; PLATTNER et al., 1948; GÄUMANN et al., 1950).

Isoliert wurden aus *Fusarium lateritium* Enniatin A, mit dem Lateritiin I identisch ist, und die verwandten Stoffe Lateritiin II und Fructigenin.

Das Filtrat von Richard-5-Kulturen zeigte keine *Ustilago*-, sein Extrakt nur eine schwache *subtilis*-Aktivität.

Entsprechend der Vorschrift von NAGER (1948) wurde in zwei Versuchen das Myzel von 200 Erlenmeyerkulturen auf Enniatin aufgearbeitet.

Die erhaltenen kristallinen Fraktionen zeigen die gleichen Eigenschaften wie die beschriebenen Enniatine. Sie wurden chemisch nicht mehr weiter untersucht. Die Konstitution der Enniatine wurde durch PLATTNER und NAGER (1948 a und 1948 b) aufgeklärt. Enniatin A,  $C_{24}H_{42}O_8N_2$  ist eine cyclische Verbindung mit zwölf Ringgliedern.



Formel von Enniatin A

#### § 4. *Pleospora herbarum* (Persoon) Rabenhorst

*Pleospora herbarum* wurde aus dem Eschenkrebs immer in der Nebenfruchtform *Stemphylium botryosum* Wallr. isoliert.

Der Pilz ist ein Ubiquist und tritt als Parasit und als Saprophyt in allen Klimaten der Erde auf (SACCARDO, 1898; RABENHORST, 1903; OUDEMANS, 1923; SIU, 1951).

Monographisch bearbeitete NEERGARD (1945) die Gattung *Stemphylium*, MÜLLER (1951) die schweizerischen Arten der Gattung *Pleospora*.

Die Abhängigkeit des Wachstums von der Temperatur wurde durch Bestimmung des mittleren Durchmessers von je zehn Kolonien auf Malzagarplatten nach zehn Tagen ermittelt. Das Ergebnis ist in Abb. 19 dargestellt.

Der Verlauf dieser Temperaturkurve ist ähnlich den von NEERGARD (1945) mit anderen *Pleospora*- (*Stemphylium*-) Stämmen erhaltenen.

Die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 21 ° und 24 ° C. Bei 0 ° und 37 ° C stellt *Pleospora herbarum* das Wachstum ein, ohne aber geschädigt zu werden. Die minimale Temperatur liegt ungefähr bei 3 ° C, die maximale bei 33 ° C. Auffallend ist der starke Wachstumsunterschied zwischen 24 ° und 27 ° C.

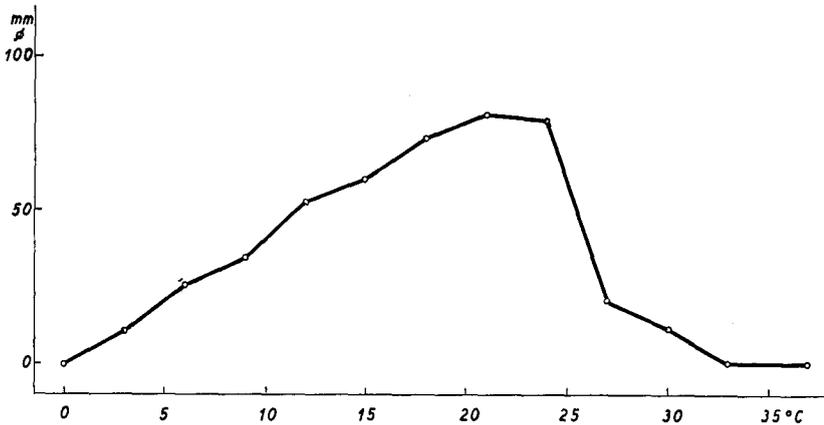


Abb. 19. Wachstum von *Pleospora herbarum* auf Malzagar. Mittlerer Durchmesser der Plattenkulturen bei verschiedenen Temperaturen nach zehn Tagen. Ordinate: Durchmesser in mm, Abszisse: Temperatur in ° C

An morphologischen Unterschieden zeigen sich bei den verschiedenen Temperaturen vor allem Veränderungen von Farbe und Luftmyzel:

- |  |  |
|--|--|
| 3 ° und 6 ° C: Myzel weiß              | Luftmyzel kurz, schwarz  |
| 9 ° bis 18 ° C: Myzel orange           | Luftmyzel sich stärker und langhaariger entwickelnd, zunehmend stärker gefärbt |
| 21 ° und 24 ° C: Myzel braun, olivgrün | Luftmyzel hanghaarig, braun, olivgrün  |
| 27 ° bis 33 ° C: Myzel schwarzbraun    | Luftmyzel kurzhaarig, spärlich   |

Die orangefarbenen Kulturen (bei Temperaturen von 9 ° bis 18 ° C) wechseln innerhalb kurzer Zeit ihre Farbe in braun, wenn sie höheren Temperaturen (über 24 ° C) ausgesetzt werden. Der Vorgang erfolgt auch umgekehrt.

*Pleospora herbarum* bildet auf verschiedenen Kulturlösungen ein biologisch aktives Stoffwechselprodukt. Dieses Toxin konnte mit Hilfe des *subtilis*-Tests aufgearbeitet und isoliert werden. Die näheren Bedingungen der Toxinbildung werden in einer in Vorbereitung befindlichen Arbeit (RIGGENBACH, 1956) beschrieben. Das Toxin wird dort Pleosporin genannt.

Pleosporin ist ein Welketoxin, das vor allem auf die Blätter, nicht aber auf den Stengel, von Tomatensprossen wirkt. Die am Blattrand liegenden Interkostalfelder werden zuerst geschädigt; später bilden sich, verteilt über das ganze Blatt, nekrotische Stellen. Die Nerven, vor allem die feinen, verfärben sich braunschwarz (Abb. 20 und 21).

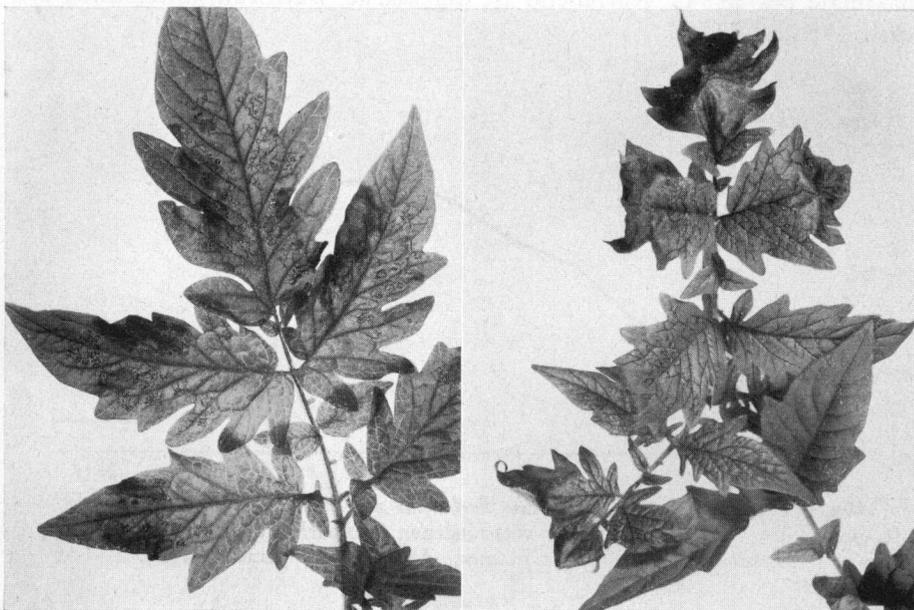


Abb. 20 (links). Welkesymptome auf Tomatenblättern, hervorgerufen durch Pleosporin.  
 $\frac{2}{3}$  nat. Größe

Abb. 21 (rechts). Welkesymptome auf Tomatenblättern, hervorgerufen durch Pleosporin.  
 $\frac{2}{3}$  nat. Größe

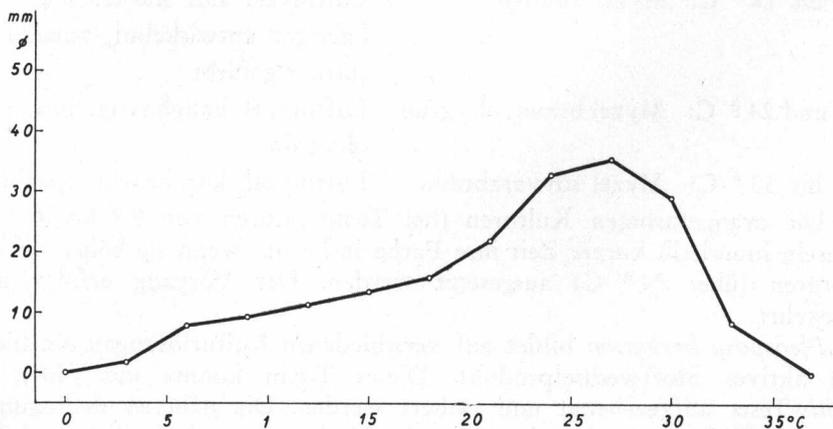


Abb. 22. Wachstum von *Plenodomus Rabenhorstii* auf Malzagar. Mittlerer Durchmesser der Plattenkulturen bei verschiedenen Temperaturen nach 25 Tagen.  
 Ordinate: Durchmesser in mm, Abszisse: Temperatur in °C

### § 5. *Plenodomus Rabenhorstii* Preuß.

Die Abhängigkeit des Wachstums von der Temperatur wurde nach der üblichen Methode abgeklärt. Da dieser Pilz viel langsamer als *Fusarium lateritium* und *Pleospora herbarum* wächst, konnten die Durchmesser der Kulturen nicht nach zehn, sondern erst nach 25 Tagen gemessen werden. Die optimale Temperatur liegt höher als bei den anderen Organismen (Abb. 22).

Auch auf flüssigen Nährlösungen ist das Wachstum schlecht; am besten eignet sich noch Richard 5.

*Ustilago*-aktive Stoffwechselprodukte waren in keinem Kulturfiltrat feststellbar, dagegen zeigte der Extrakt von Richard-5-Kulturen geringe Mengen eines *subtilis*-aktiven Stoffes.

### § 6. Die vier Mikroorganismen in Mischkultur

Näher beschrieben werden in diesem Abschnitt einige in das Gebiet von Antagonismus und Synergismus fallende Beziehungen zwischen den vier Mikroorganismen:

*Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* (Brown) Dowson

Stamm ETH M 141 Bassersdorf

*Fusarium lateritium* Nees

Stamm ETH M 146 Bassersdorf

*Pleospora herbarum* (Persoon) Rabenhorst

Stamm ETH M 149 Bassersdorf

*Plenodomus Rabenhorstii* Preuß.

Stamm ETH M 150 Bassersdorf

Angaben über Synergismen von Mikroorganismen finden sich z. B. bei BUCHANAN und FULMER (1930); GWYNE-VAUGHAN und BARNES (1937); JORDAN und BURROWS (1946); WOLF und WOLF (1947); SCHOPFER (1949); GÄUMANN (1951).

Die vier Mikroorganismen können auf 15 verschiedene Arten miteinander kombiniert werden. Dabei sind die Reinkulturen (die Kulturen der vier Mikroorganismen für sich allein), die als Kontrollen dienen, eingeschlossen.

Als Nährlösungen wurden Fries I und Richard 5 gewählt, weil *Pleospora herbarum* auf Fries I ein toxisches Stoffwechselprodukt bildet und Richard 5 für *Fusarium lateritium* und *Plenodomus Rabenhorstii* besonders günstig ist. Mit diesen Nährsubstraten sind die drei Pilze gegenüber *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* bevorzugt.

Die Mischkulturen wurden durch gleichzeitiges Impfen der Nährlösungen mit je 1 ml Sporen- oder Bakteriensuspension der gewählten Mikroorganismen erhalten.

Die Inkubation erfolgte in einem auf 20 ° C regulierten Kulturraum.

## A. Mischkulturen zwischen *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* und einem Pilz

### 1. Mischkultur mit *Pleospora herbarum*

In einem ersten Versuch wurde das Wachstum der Reinkultur mit dem der Mischkultur verglichen. Bestimmt wurden die pH-Werte und die Myzel- oder Bakterientrockengewichte. Als Nährlösung wurde Fries I mit 1% Glukose verwendet (Abb. 23 und 24).

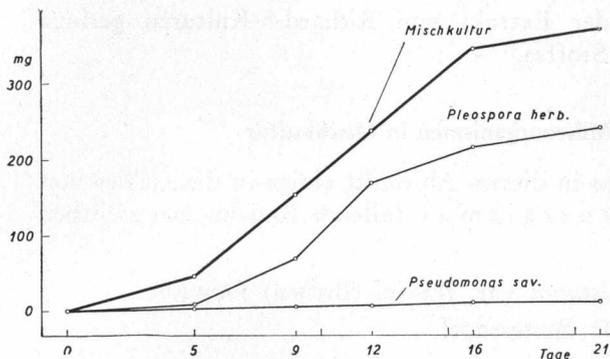


Abb. 23. Zeitliche Zunahme der Myzelgewichte von *Pleospora herbarum* in Rein- und Mischkultur mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf Nährlösung Fries I mit 1% Glukose bei 20° C.

Ordinate: Trockengewicht in mg, Abszisse: Kulturdauer in Tagen

Schon nach 24 Stunden zeigte die Mischkultur ein verstärktes Myzelwachstum. Sie hob sich durch eine starke Trübung deutlich von der Reinkultur ab. Dieses außerordentliche Wachstum blieb über die ganze Versuchszeit. Die Bakterien wachsen in der Reinkultur schlecht, besser dagegen in der Mischkultur. Hier stehen ihnen wohl besondere organische Verbindungen aus dem Stoffwechsel der Pilze zur Verfügung. Die pH-Werte der Rein- und auch der Mischkultur zeigten den gleichen Verlauf, die Unterschiede zwischen der *Pleospora*-Rein- und der Mischkultur sind klein.

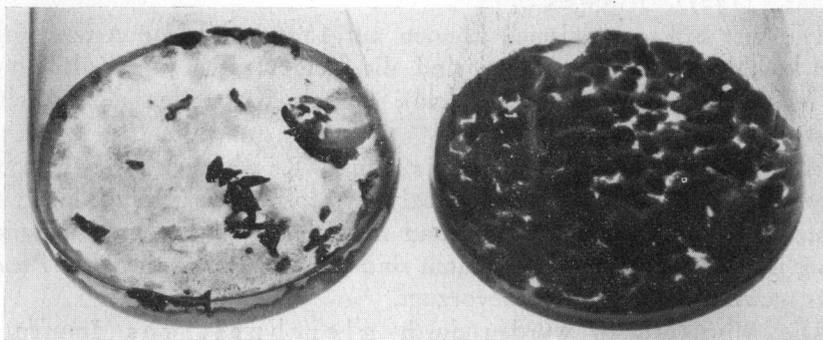


Abb. 24. Links Reinkultur von *Pleospora herbarum*, rechts die Mischkultur mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* nach 21 Tagen, auf Fries I mit 1% Glukose bei 20° C.  $\frac{1}{2}$  nat. Größe

Abb. 25. Zeitliche Zunahme der Myzelgewichte von *Pleospora herbarum* in Rein- und in Mischkultur mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf Nährlösung Fries I ohne Glukose mit 1% Pektin (60% verestert) bei 20° C. Ordinate: Trockengewicht in mg, Abszisse: Kulturdauer in Tagen

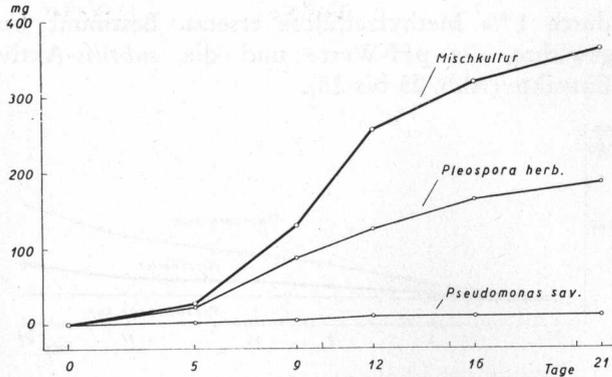


Tabelle 6

pH-Wert und *subtilis*-Aktivität von Rein- und Mischkulturen nach 21 Tagen auf Fries I mit 1% Glukose

Organismus	pH		<i>Subtilis</i> -Aktivität des Kulturfiltrat-Extraktes Hemmhof $\phi$ in mm
	Anfang	Ende	
<i>Pseudomonas savastanoi</i> var. <i>fraxini</i> ..	4,6	4,0	0 mm
<i>Pleospora herbarum</i> .....	4,6	2,2	20 mm
Mischkultur .....	4,6	2,4	0 mm

Trotz praktisch gleichem pH-Wert und größerem Myzelertrag und obgleich beide Organismen für die Bildung eines *subtilis*-aktiven Stoffes befähigt wären, ist kein toxisches Stoffwechselprodukt mehr nachweisbar.

Da in der Esche neben Glukose auch noch andere Stoffe wie Pektin und Zellulose vorhanden sind, wurde in der Nährlösung die Glukose durch 1% Pektin (60% mit Methylalkohol veresterte Polygalakturonsäure) und

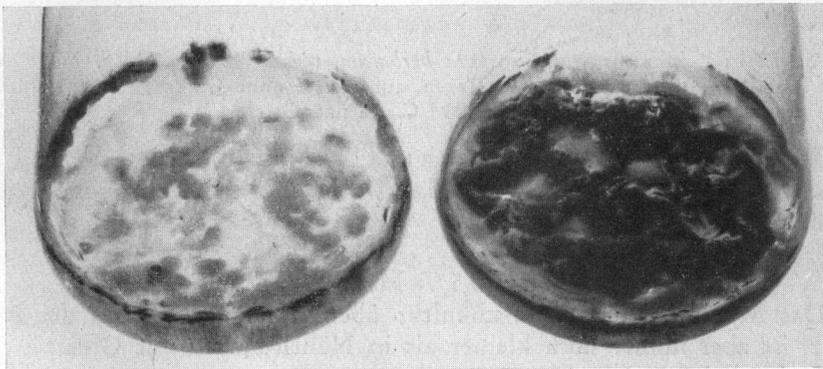


Abb. 26. Links Reinkultur von *Pleospora herbarum*, rechts die Mischkultur mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* nach 21 Tagen, auf Fries I ohne Glukose mit 1% Pektin bei 20° C. 1/2 nat. Größe

durch 1 % Methylzellulose ersetzt. Bestimmt wurden wieder die Myzelgewichte, die pH-Werte und die *subtilis*-Aktivitäten der Kulturfiltrat-Extrakte (Abb. 25 bis 28).

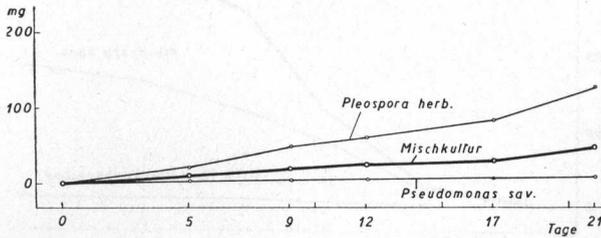


Abb. 27. Zeitliche Zunahme der Myzelgewichte von *Pleospora herbarum* in Rein- und Mischkultur mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf Nährlösung Fries I ohne Glukose mit 1 % Methylzellulose bei 20 ° C.

Ordinate: Trockengewicht in mg, Abszisse: Kulturdauer in Tagen

Wird die Glukose durch Pektin ersetzt, so bleibt der Verlauf der Myzelgewichte und der pH-Werte ungefähr gleich. Die Mischkultur weist kein *subtilis*-aktives Stoffwechselprodukt auf. Wird die Glukose dagegen durch Methylzellulose ersetzt, so ändert sich der Versuchsablauf. *Pleospora herbarum* hat Mühe, die Methylzellulose als Kohlenstoffquelle auszunützen. Das Wachstum der Mischkultur bleibt zurück, das Myzel bildet kleine, von Bakterien umgebene Körnchen. *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini*, das in der Reinkultur sehr schlecht wächst, schädigt oder zerstört das Myzel.

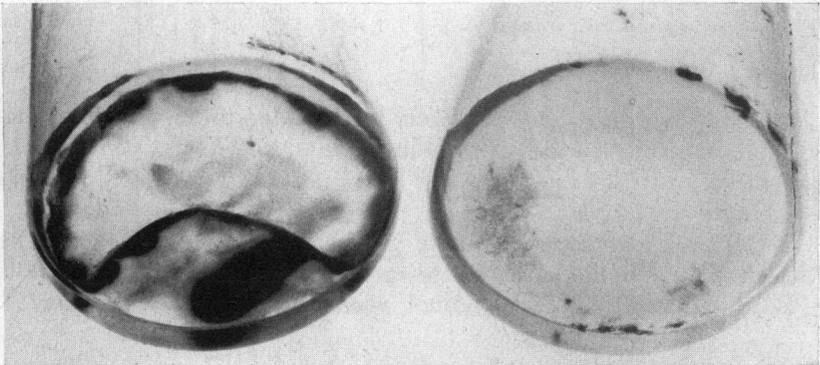


Abb. 28. Links Reinkultur von *Pleospora herbarum*, rechts die Mischkultur mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* nach 21 Tagen, auf Fries I ohne Glukose mit 1 % Methylzellulose bei 20 ° C.  $\frac{1}{2}$  nat. Größe

Wird die Methylzellulose nicht allein, sondern zusammen mit Glukose gegeben, so verändert sich das Wachstum. Die Nährlösung Fries I enthält nun:

- a) 1 % Glukose
- b) 0,5 % Glukose + 0,5 % Methylzellulose.

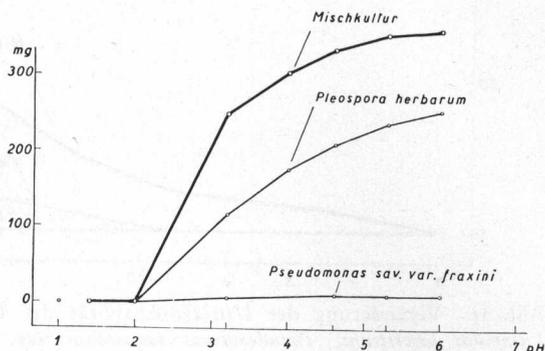
Das Myzelgewicht der Mischkultur übertrifft nun auch das der Reinkultur, ist aber immer noch kleiner als in Nährlösungen mit Glukose oder Pektin als alleinige C-Quellen.

Daß diese Wachstumsunterschiede zwischen der Rein- und der Mischkultur nicht vom Anfangs-pH der Nährlösung abhängig sind, zeigt Abb. 29.

Fries I (1 % Glukose) wurde mit KOH oder HCl auf pH-Werte zwischen 1 und 7 eingestellt. Höhere pH-Werte konnten nicht in den Versuch einbezogen werden, da die Glukose beim Sterilisieren karamelisiert und das pH auf 7 zurücksinkt.

Abb. 29. Abhängigkeit des Wachstums vom Anfangs-pH der Nährlösung Fries I (1 % Glukose). Myzelgewicht von *Pleospora herbarum* in Rein- und in Mischkultur mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* nach 21 Tagen.

Ordinate: Trockengewichte in mg,  
Abszisse: pH-Werte



Durch die Mischkultur mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* wird somit in bestimmten Medien das Wachstum von *Pleospora herbarum* stark gesteigert. In den Mischkulturen läßt sich kein toxisches Stoffwechselprodukt mehr nachweisen.

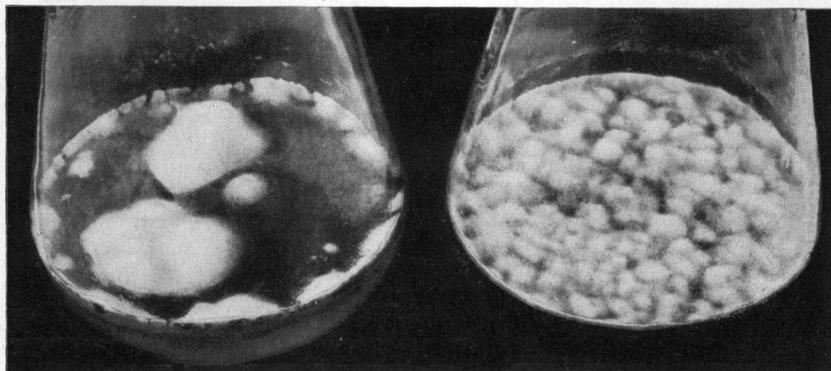


Abb. 30. Links *Fusarium lateritium* in Reinkultur, rechts in Mischkultur mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini*. Nährlösung Fries I (1 % Glukose).  $\frac{1}{2}$  nat. Größe

## 2. Mischkultur mit *Fusarium lateritium*

Bei diesen Versuchen kamen vor allem die Nährlösungen nach Fries I und Richard 5 zur Anwendung. Sowohl auf Fries I (1 % Glukose) als auch auf Richard 5 zeigt die Mischkultur ein verstärktes Wachstum (Abb. 30).

*Fusarium lateritium* bildet im Myzel den schwer wasserlöslichen toxischen Inhaltsstoff Enniatin. Das Kulturfiltrat wies im *Ustilago*-Test keine, sein Extrakt im *subtilis*-Test höchstens eine geringe Aktivität auf. In Mischkulturen mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* konnte im Kulturfiltrat aber plötzlich eine große *Ustilago*-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 31).

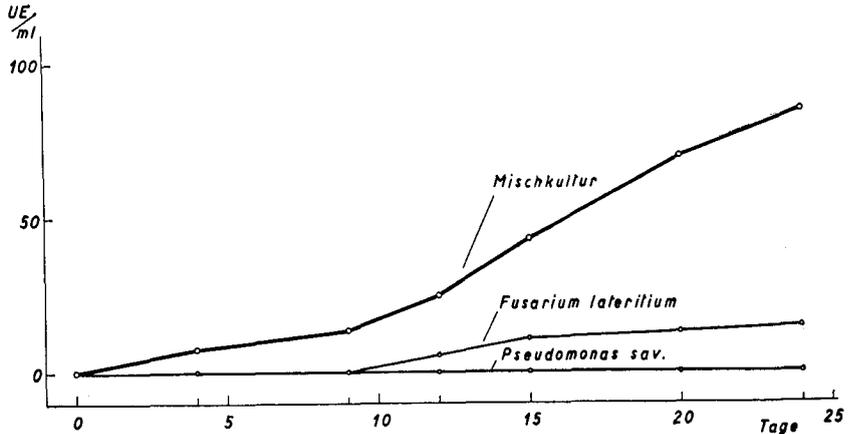


Abb. 31. Veränderung der *Ustilago*-Aktivität der Kulturfiltrate der Reinkulturen von *Fusarium lateritium*, *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* und ihrer Mischkultur auf Nährlösung Richard 5 bei 20° C.

Ordinate: UE/ml Kulturfiltrat. Abszisse: Kulturdauer in Tagen

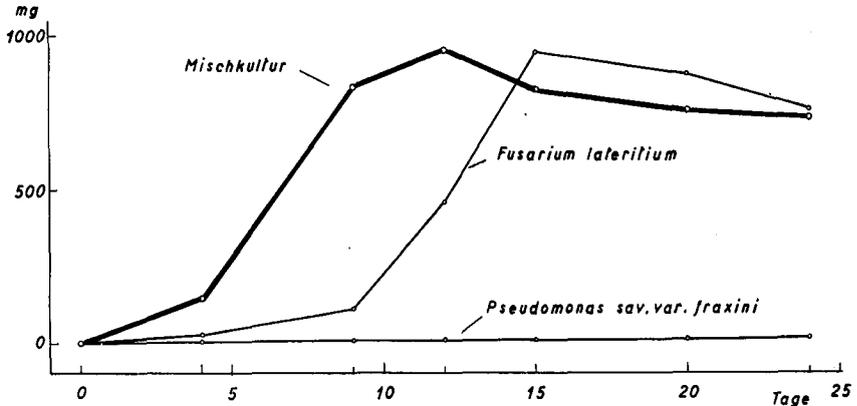


Abb. 32. Zeitliche Zunahme der Myzelgewichte von *Fusarium lateritium* in Rein- und in Mischkultur mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf Nährlösung Richard 5 bei 20° C.

Ordinate: Trockengewicht in mg, Abszisse: Kulturdauer in Tagen

Die Mischkultur zeigte eine mäßige bis starke Trübung durch Bakterien. Die pH-Werte der einzelnen Kulturen bei Versuchsende sind:

<i>Pseudomonas savastanoi</i> var. <i>fraxini</i>	pH 5,2
<i>Fusarium lateritium</i>	pH 6,8 (Anfangs-pH 5,6)
Mischkultur	pH 6,0

Die Myzelgewichte sind in Abb. 32 dargestellt.

Für das Auftreten dieser *Ustilago*-Aktivität gibt es verschiedene Möglichkeiten. Denkbar wäre, daß Enniatin durch *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* ab- oder in eine neue wasserlösliche Verbindung umgebaut wird. Dafür spricht der Umstand, daß das Bakterium in Nährlösungen (Nährbouillon oder Richard 5), denen vor dem Sterilisieren Enniatin zugesetzt wurde (10 mg/100 ml in Aceton gelöst), nicht gehemmt wird und daß diese Kulturen nachher eine geringe *Ustilago*-Aktivität aufweisen. Diese Ver-

suche bedürfen aber einer nochmaligen Überprüfung mit frisch isolierten Stämmen. In Versuchen mit alt isolierten geht die Aktivität verloren.

### 3. Mischkulturen mit *Plenodomus Rabenhorstii* Preuß.

In diesen Mischkulturen, die auf verschiedenen Nährlösungen durchgeführt wurden, zeigten sich zwischen Rein- und Mischkultur vor allem in der Morphologie (im Aussehen der Kulturen) Unterschiede. Die Myzelgewichte der Mischkultur sind gleich oder nur leicht höher als die der Reinkultur. *Subtilis-* oder *Ustilago-*aktive Stoffe lassen sich nicht feststellen. Als Beispieldiene Abb. 33.

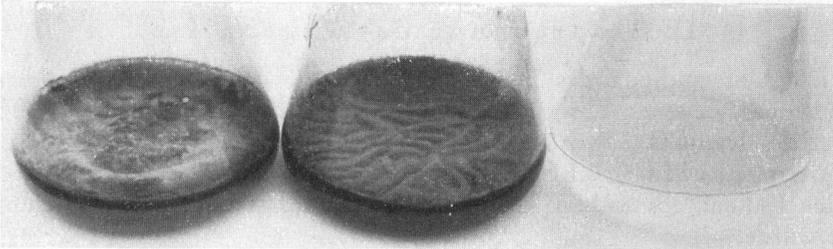


Abb. 33. Links *Plenodomus Rabenhorstii*, ganz rechts *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* in Reinkultur, in der Mitte die Mischkultur. Nährlösung Raulin. Nach 28 Tagen. Etwa  $\frac{1}{3}$  nat. Größe. Aufn.: Dr. CH. STOLL, Inst. für spez. Bot. ETH

### B. Mischkulturen zwischen *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* und mehreren Pilzen

Diese Versuche wurden auf Fries I mit verschiedenen C-Quellen (1 % Glukose; 1 % Pektin; 0,5 % Glukose + 0,5 % Pektin; 0,5 % Glukose + 0,5 Methylzellulose) durchgeführt. Sie zeigen in allen Kombinationen ein um 30 bis 100 % erhöhtes Myzelgewicht in der Mischkultur. Als Beispieldiene Abb. 34.

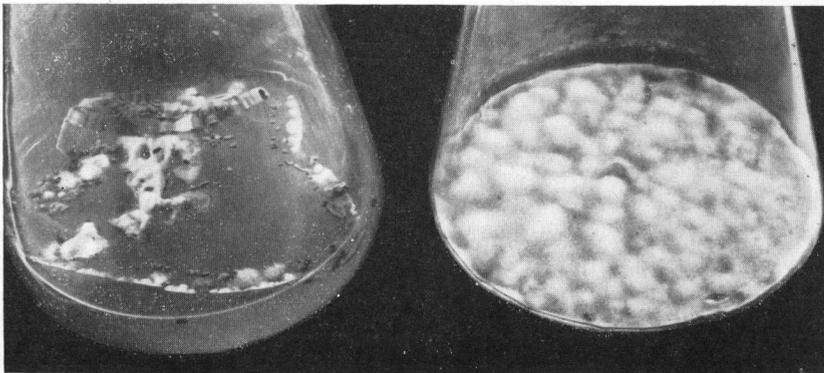


Abb. 34. Links Mischkultur von *Fusarium lateritium*, *Pleospora herbarum* und *Plenodomus Rabenhorstii*, rechts Mischkultur dieser drei Pilze mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* auf Nährlösung Fries I (1 % Glukose) nach 21 Tagen bei 20° C.  $\frac{1}{2}$  nat. Größe

Diese Steigerung des Myzelwachstums wird ausschließlich durch die Bakterien hervorgerufen und nicht durch Stoffe, die in der Bakterien-nährlösung vorhanden sind. Wird nur 1 ml einer sterilen Nährbouillonlösung zu den Kulturen pipettiert, so verändert sich das Wachstum gegenüber den unbehandelten Pilzreinkulturen nicht.

### C. Mischkulturen der Pilze

Die Mischkulturen der Pilze zeigen gegenüber den Reinkulturen nur wenige Veränderungen. Das Myzelgewicht steigt nicht. *Pleospora herbarum* bildet kein toxisches Stoffwechselprodukt.

### D. Besprechung der Ergebnisse

Die Untersuchung des Eschenkrebses zeigte, daß neben dem Primärerreger noch weitere Mikroorganismen an der Krankheit beteiligt sind. Im Gebiet des Kantons Zürich fand sich stets die gleiche Mikroorganismengesellschaft oder Mikroassoziation. Wie weit das für den Eschenkrebs anderer Gebiete zutrifft, ist eine Frage, die nicht untersucht wurde.

In den Mischkulturen übt *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* in verschiedenen Nährlösungen einen deutlich stimulierenden Einfluß auf das Wachstum der drei Pilze (*Fusarium lateritium*, *Pleospora herbarum* und *Plenodomus Rabenhorstii*) aus. Wird zu einer Mischkultur der drei Pilze das Bakterium hinzugefügt, wächst in erster Linie *Fusarium lateritium* wesentlich stärker. In Mischkulturen lassen sich entweder die biologisch aktiven Stoffwechselprodukte der Reinkulturen nicht mehr nachweisen, oder aber es finden sich neue, in den Reinkulturen unbekannte Toxine.

Worauf diese Unterschiede im Wachstum und in der Toxinbildung zurückzuführen sind (Wuchsstoffe, Enzymwirkungen usw.) bleibt noch zu untersuchen. Diese Versuche können auch nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse in der Natur übertragen werden.

## 3. KAPITEL

### Die Infektionsversuche

#### § 1. Allgemeines

BROWN (1932) führte erfolgreiche Infektionsversuche mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* durch. Die ersten Symptome der Erkrankung wurden nach einem Monat, deutlich ausgebildete Krankheitsbilder nach vier Monaten sichtbar.

Da in den hier untersuchten Krebsgeweben nicht nur *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* allein, sondern immer die gleiche Mikroflorengesellschaft auftrat, wurden auch die drei Pilze in die Infektionsversuche einbezogen und somit Einzel- und Mischinfektionen durchgeführt.

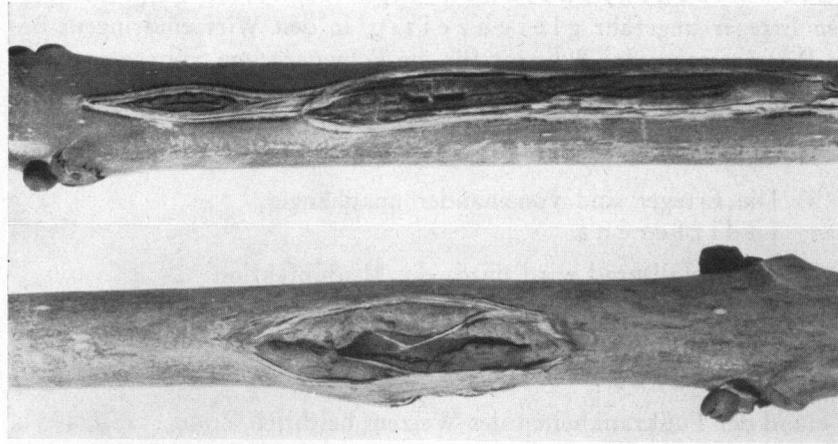


Abb. 40

Abb. 41

vier Monate nach der künstlichen Infektion mit *Fraxini* (Gewächshausbedingungen). Leicht vergrößert.

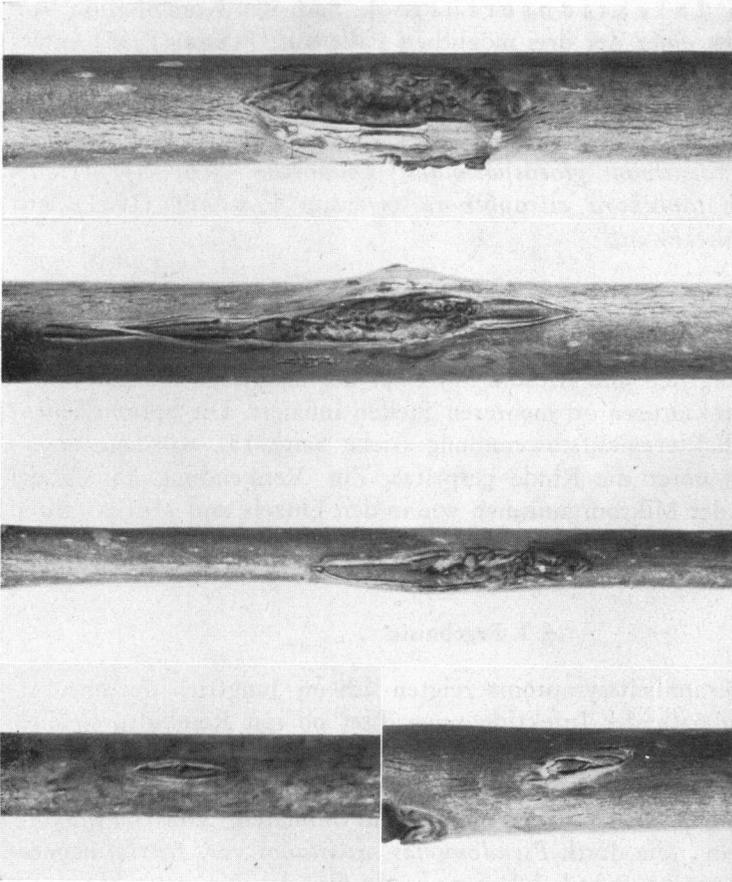


Abb. 35 (oben) u. 36

Abb. 37

Abb. 38

Abb. 39

Abb. 35. Wundstelle im Jungtrieb, vier Monate nach der Injektion der sterilen Nährbouillonlösung. Mit sterilem dest. Wasser entsteht die gleiche Verwundung. Leicht vergrößert. — Abb. 36. Krankheitsbild an einem Jungtrieb, vier Monate nach der künstlichen Infektion mit einer Sporensuspension von *Pseudomonas Rabenhorstii*. Die beiden anderen Pilze erzeugen ungeräth gleich große Verwundungen. Leicht vergrößert. — Abb. 37 und 38. Krankheitsbilder an verschiedenen Jungtrieben, vier Monate nach der künstlichen Infektion mit einer Bakterienaufschwemmung von *Pseudomonas savastanoi* var. *Fraxini* (Gewächshausbedingungen). Leicht vergrößert. — Abb. 39, 40 und 41. Krankheitsbilder an verschiedenen Jungtrieben, vier Monate nach der künstlichen Infektion mit einem Gemisch von *Fusarium lateritium*, *Pseudomonas Rabenhorstii* und *Pseudomonas savastanoi* var. *Fraxini* (Gewächshausbedingungen). Leicht vergrößert.

Echte Mischinfektionen liegen dann vor, wenn die verschiedenen Erreger ungefähr gleichzeitig in den Wirt eindringen. Bereitet ein Primärerreger das Substrat für die Folgeparasiten vor, so sprechen wir von einer Folgeinfektion. Beim parasitischen Erfolg von Mischkulturen mit verschiedenartigen Erregern sind drei Fälle (GÄUMANN, 1951) möglich:

- a) Die Erreger sind voneinander unabhängig, indifferent.
- b) Der Befallsgrad wird durch die Mischinfektion abgeschwächt.
- c) Der Befallsgrad wird durch die Mischinfektion verstärkt.

An Hand der Fußkrankheiten des Weizens beschrieb ZOGG (1950, 1951) den Einfluß der Mischinfektion verschiedener Erregerarten auf den Infektionserfolg. Je nach der Kombination von zwei Erregern tritt einer der drei möglichen Fälle auf. FLÜCK (1955) untersuchte im besonderen die Mischinfektion mit *Ophiobolus graminis* Sacc. und *Didymella exitialis* (Mor.) E. Müller. Durch Mischinfektion verschiedener Parasiten des Zitronenbaumes wie *Diplodia natalensis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Diaporthe citri*, *Sphaceloma fawcetti* und *Phytophthora citrophthora* erreichte FAWCETT (1931) eine Steigerung der Erkrankung.

## § 2. Methode

Drei- bis vierjährige Eschenbäumchen wurden im Frühjahr nach dem Austreiben im Jungtrieb und Altholz mit einer der möglichen Erregerkombinationen und Reinkulturen an mehreren Stellen infiziert. Die Sporensuspensionen und die Bakterienaufschwemmung (siehe Seite 15) wurden einzeln oder als Gemisch unter die Rinde gespritzt. Zur Verwendung kamen die gleichen Stämme der Mikroorganismen wie in den Einzel- und Mischkulturen *in vitro*. Die Infektionsversuche wurden im Gewächshaus an eingetopften Bäumchen ausgeführt.

## § 3. Ergebnisse

Die ersten Krankheitssymptome zeigten sich im Jungtrieb durchschnittlich zwei Monate nach der Infektion ungeachtet ob mit Reinkulturen oder Mischkulturen infiziert wurde. Im Altholz mußte mit einer Verzögerung von durchschnittlich einem Monat gerechnet werden. Deutlich sichtbar wurde das Krankheitsbild aber erst nach vier bis fünf Monaten. Die Gewebewucherungen, die durch *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* hervorgerufen wurden, waren viel kleiner als die, die mit einer Mischinfektion aller vier Erreger entstanden (Abb. 35 bis 41).

### Zusammenfassung

1. Im Gebiet des Kantons Zürich wird der Eschenkrebs morphologisch, anatomisch und parasitologisch untersucht.
2. Neben *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* (Brown) Dowson werden stets drei Pilze, *Fusarium lateritium* Nees, *Pleospora herbarum* (Persoon) Rabenhorst und *Plenodomus Rabenhorstii* Preuß. festgestellt.
3. *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* bildet in Reinkultur eine subtilis- und welkeaktive Substanz, die als Rohextrakt gewonnen werden kann.
4. Das Temperaturoptimum für *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini*, *Fusarium lateritium* und *Pleospora herbarum* liegt zwischen 21 bis 24 ° C. Einzig *Plenodomus Rabenhorstii* hat ein höheres Optimum bei 27 ° C. Sein Wachstum ist wesentlich langsamer als das der anderen zwei Pilze.
5. *Pleospora herbarum* bildet unter bestimmten Bedingungen ein toxisches, welkeaktives Stoffwechselprodukt, das Pleosporin genannt wird.
6. *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* bewirkt in Mischkulturen mit einem oder mehreren der drei Pilze eine deutliche Steigerung des Myzelwachstums.
7. In Pilzmischkulturen mit *Fusarium lateritium*, die zugleich mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* infiziert wurden, wird vor allem *Fusarium lateritium* gefördert.
8. In den Mischkulturen läßt sich Pleosporin nicht mehr nachweisen.
9. In Mischkulturen von *Fusarium lateritium* mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* findet sich im Kulturfiltrat ein *Ustilago*-aktiver Stoff, der den Reinkulturen fehlt.
10. Zwischen den vier Mikroorganismen können keine Hemmungen beobachtet werden.
11. Die an drei- bis vierjährigen Eschen ausgelösten Krebswunden sind bei der Infektion (Gewächshausbedingungen) mit allen vier beschriebenen Mikroorganismen größer als mit *Pseudomonas savastanoi* var. *fraxini* allein.

Meinem sehr verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. E. GÄUMANN, möchte ich für die großzügige Förderung dieser Arbeit meinen besten Dank aussprechen.

### Literaturverzeichnis

- BAVENDAMM, W., 1936: Erkennen, Nachweis und Kultur der holzverfärbenden und holzzeretzenden Pilze. ABDERHALDEN, Handb. biol. Arbeitsmeth. 12, 927—1134.
- BERGEYS Manual of Determinative Bacteriology, 6. Aufl. 1948, 438 S., herausg. v. BREED, R. S., MURREY, E. G. D. and PARKER HITCHENS, A. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.

- BRIAN, P. W., HEMMING, H. G., 1945: Gliotoxin, a fungistatic metabolic product of *Trichoderma viride*. Ann. Appl. Biol. 32, 3, 214—220.
- BROWN, N. A., 1932: Canker of ash trees produced by a variety of the olive tubercle organism *Bacterium savastanoi*. J. Agr. Res. 44, 701—722.
- BUCHANAN, R. E., and FULMER, E. I., 1930: Physiology and Biochemistry of Bacteria. Bd. 2, 1. Aufl., 709 S. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- CAMP, A. F., 1923: Citric acid as a source of carbon for certain Citrus-fruit-destroying fungi. Ann. Mo. Botan. Garden 10, 213—298.
- CIBA, 1940: Färbvorschriften für mikroskopische Farbstoffe. Bakteriologischer und Hämatologischer Teil. 36 S. Ciba, Basel.
- COOK, A. H., COX, S. F., FARMER, T. H., and LACEY, M. S., 1947: Production of Antibiotics by *Fusaria*. Nature 160, 31—32.
- DAME, F., 1938: *Pseudomonas tumefaciens* (Sm. et Towns.) Stev., der Erreger des Wurzelkropfes, in seiner Beziehung zur Wirtspflanze. Cbl. Bakt., 2. Abt. 98, 385—429.
- DOWSON, W. J., 1943: On the generic names *Pseudomonas*, *Xanthomonas* and *Bacterium* for certain bacterial plant pathogens. Transact. Brit. Myc. Soc. 26, 4—14.
- EICHHOFF, W., 1881: Die europäischen Borkenkäfer. 1. Aufl., 315 S. Springer, Berlin.
- ELLIOTT, CH., 1951: Manual of Bacterial Plant Pathogens. 2. Aufl., 186 S. Waltham, Mass.
- ESCHERICH, K., 1923: Die Forstinsekten Mitteleuropas. Bd. 2, 1. Aufl., 663 S. Paul Parey, Berlin.
- FAWCETT, H. S., 1931: The importance of investigations on the effects of known mixtures of microorganisms. Phytopathology 21, 545—550.
- FLÜCK, V., 1955: Untersuchungen über die Pathogenität von Erregergemischen bei Getreidefußkrankheiten. Phytopath. Z. 23, 177—208.
- FRANK, A. B., 1896: Die tierparasitären Krankheiten der Pflanzen. 2. Aufl., 263 S. Trewendt, Breslau.
- FREY-WYSSLING, A., 1949: Stoffwechsel der Pflanzen. 2. Aufl., 288 S. Büchergilde Gutenberg, Zürich.
- FRIES, N., 1938: Über die Bedeutung von Wuchsstoffen für das Wachstum. 1. Aufl., 188 S. Lundequistska, Uppsala.
- GÄUMANN, E., ROTH, ST., ETTLINGER, L., PLATTNER, PL. A., und NAGER, U., 1947: Enniatin, ein neues, gegen Mykobakterien wirksames Antibiotikum. Experienta 3, 202—203.
- —, — —, und — —, 1950: Zur Gewinnung von Enniatinen aus dem Myzel verschiedener Fusarien. Phytopath. Z. 16, 289—299.
- —, — —, und KOBEL, H., 1952: Über Fusarinsäure, ein zweites Welketoxin des *Fusarium lycopersici* Sacc. Phytopath. Z. 20, 1—38.
- —, 1949: Die Pilze, Grundzüge ihrer Entwicklungsgeschichte und Morphologie. 1. Aufl., 382 S. Birkhäuser, Basel.
- —, 1951: Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl., 681 S. Birkhäuser, Basel.
- GROVE, D. C., RANDALL, W. A., 1955: Assays Methods of antibiotics. 1. Aufl., 238 S. Medical Encyclopedia, New York.
- GWYNNE-VAUGHAN, H. C. I., BARNES, B., 1937: The Structure and Development of the Fungi. 2. Aufl., 499 S. The University Press, Cambridge.
- HODGSON, R., RIKER, A. J., and PETERSON, N. W., 1947: A Wilt-Inducing Toxic Substance from crown-gall bacteria. Phytopathology 37, 301—318.
- JORDAN, E. O., and BURROWS, W., 1946: Textbook of Bacteriology. 14. Aufl., 909 S. Saunders Company, Philadelphia and London.
- KERN, H., 1952: Über die Beziehungen zwischen dem Alkaloidgehalt verschiedener Tomatensorten und ihrer Widerstandsfähigkeit gegen das *Fusarium lycopersici* Sacc. Phytopath. Z. 19, 351—382.

- KOBEL, F., 1951: Untersuchungen über toxische Stoffwechselprodukte von *Nectria cinnabarina* (Tode) Fr. *Phytopath. Z.* **18**, 157—195.
- KUNZ, R., 1952: Die Wirkungsweise von *Bacterium solanacearum* E. F. S., dem Erreger der tropischen Schleimkrankheit des Tabaks, auf *Solanum lycopersicum* L. *Phytopath. Z.* **20**, 89—112.
- LINSKENS, H. F., 1955: Der Einfluß der toxischen Welke auf die Blattausscheidung der Tomatenpflanze. *Phytopath. Z.* **23**, 89—106.
- LUZ, G., 1934: Über den Stoffwechsel von *Fusarium lycopersici* und *Fusarium lini*. *Phytopath. Z.* **7**, 585—638.
- MEYER, A., 1903: Practicum der botanischen Bakterienkunde. 1. Aufl., 157 S. Gustav Fischer, Jena.
- MÜLLER, E., 1951: Die schweizerischen Arten der Gattungen *Clathrospora*, *Pleospora*, *Pseudoplea* und *Pyrenophora*. *Sydowia* **5**, 248—310.
- NAGER, U., 1948: Über die Chemie der Enniatine. Diss. ETH., 42 S. Birkhäuser, Basel.
- NEERGAARD, P., 1945: Danish Species of *Alternaria* and *Stemphylium*. 1. Aufl., 560 S. Munksgaard, Copenhagen.
- NOACK, F., 1893: Der Eschenkrebs, eine Bakterienkrankheit. *Z. Pflanzenkrankh.* **3**, 193—199.
- OLIVEIRA, M., 1940: Inoculações experimentais com o *Bacterium savastanoi* E. F. Smith e o *Bacterium savastanoi* var. *fraxini* N. A. Brown. *Agr. Lusitana* **1**, 88—101.
- OUDEMANS, C. A. J. A., 1923: Enumeratio Systematica Fungorum. Bd. 4, 1231 S. Nijhoff, Haag.
- PLATTNER, PL. A., und NAGER, U., 1947: Über die Chemie des Enniatins. *Experientia* **3**, 325.
- — —, und BOLLER, A., 1948: Über die Isolierung neuartiger Antibiotika aus Fusarien. *Helv. Chim. Acta* **31**, 594—602.
- — —, 1948 a: Über die Konstitution von Enniatin A. *l. c.* **31**, 2192—2203.
- — —, 1948 b: Über die Konstitution von Enniatin B. *l. c.* **31**, 665—671.
- RABENHORST, G. L., 1903: Kryptogamenflora. Bd. 1, Abt. 7, 1072 S. Kummerer, Leipzig.
- RATZBURG, J. T. C., 1868: Die Waldverderbnis. Bd. 2, 5. Aufl., 375 S. Nicolai, Berlin.
- RIGGENBACH, A., 1956: Über ein toxisches Stoffwechselprodukt von *Pleospora herbarum* (Persoon) Rabenhorst. In Vorbereitung.
- SACCARDO, P. A., 1898: Sylloge Fungorum. Bd. 13, 1340 S. Borntraeger, Berlin.
- SCHNEIDER-ORELLI, O., 1947: Entomologisches Praktikum. 2. Aufl., 237 S. Sauerländer, Aarau.
- SCHNEIDER, H., und ZIMMERMANN, A., 1922: Botanische Mikrotechnik. 2. Aufl., 458 S. Fischer, Jena.
- SCHOPFER, H. W., 1949: Plants and Vitamins. 1. Aufl., 293 S. Waltham, Mass.
- SIU, R. G. H., 1951: Microbial Decomposition of Cellulose. 1. Aufl., 531 S. Reinhold, New York.
- SMITH, C. O., 1922: Pathogeneticity of the olive knot organism on hosts related to the olive. *Phytopathology* **12**, 271—278.
- SMITH, E. F., 1905: Some observations on the biology of the olive-tubercle organism. *Cbl. Bakt.* **2**, Abt. 15, 198—200.
- — —, 1913: Cancer in Plants. *Proc. seventeenth Intern. C. of Medicine*, 1—18.
- SORAUER, P., 1874: Atlas der Pflanzenkrankheiten. 5. Folge, Tafel 27. Paul Parey, Berlin.
- — —, 1908: Handbuch der Pflanzenkrankheiten. 3. Aufl., 780 S. Paul Parey, Berlin.
- STALDER, L., 1951: Über Dispositionsverschiebungen bei der Bildung von Wurzelknöllchen. Diss. ETH, *Phytopath. Z.* **18**, 376—403.
- STAPP, C., 1942: Die Virulenzsteigerung von *Pseudomonas tumefaciens* durch Titan. *Zbl. Bakt.* **2**, Abt. 104, 395—401.

- STEINBERG, R. A., 1934: A study of some factors in the chemical stimulation of the growth of *Aspergillus niger*. Am. J. Botany 6, 330—356.
- SUTER, H., 1939: Geologie von Zürich. 1. Aufl., 116 S. Leemann, Zürich.
- THOM, CH., 1930: The Penicillia. 644 S. Baillièrre, Tindall and Cox, London.
- VAN VLIET, J., 1931: Esschenkankers en hun bouw. Diss. Utrecht, 73 S. Hollandia, Baarn.
- VUILLEMIN, P., 1896: Quelques champignons arboricoles nouveaux ou peu connus. Bull. Soc. Myc. France 12, 41.
- WOLF, F. A., and WOLF, F. T., 1947: The Fungi. Bd. 2, 538 S. Wiley & Sons, New York.
- WOLLENWEBER, H. W., und REINKING, O. A., 1935: Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. 1. Aufl., 355 S. Paul Parey, Berlin.
- WOOLLEY, W. D., PRINGLE, R. B., und BRAUN, A. C., 1952: Isolation of the phytopathogenic toxin of *Pseudomonas tabaci*, an antagonist of methionine. J. Biol. Chem. 197, 409—417.
- WOTHERSPOON, M., 1931: Stimulation phenomena in the growth of bacteria as determined by nephelometry. Am. J. Bot. 18, 266—287.
- ZÄHNER, H., 1954: Über den Einfluß der Ernährung auf die Toxinempfindlichkeit von Tomatenpflanzen. Phytopath. Z. 23, 49—88.
- ZOGG, H., 1950: Über Mischinfektionen des Getreides. Schweiz. Z. Pathol. und Bakteriologie, 8, 574—579.
- —, 1951: Studien über die Pathogenität von Erregergemischen bei Getreidefußkrankheiten. Phytopath. Z. 18, 1—54.

## Lebenslauf

Geboren am 25. April 1929 in Zürich. Sechs Jahre Primar- und zwei Jahre Sekundarschule. 1944 bis Herbst 1948: Kantonale Oberrealschule in Zürich. 1948: Maturität Typ C. Winter 1948/49: Praktikum an der Eidgenössischen Landwirtschaftlichen Versuchsanstalt in Oerlikon, anschließend Militärdienst. Herbst 1949: Eintritt in die Abteilung für Naturwissenschaften der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich. Frühjahr 1953: Diplom in botanisch-zoologischer Richtung. Militärdienst. Herbst 1953 bis Herbst 1955: Ausführung der Promotionsarbeit am Institut für spezielle Botanik, wo ich schon seit Herbst 1952 als Assistent und wissenschaftlicher Mitarbeiter von Herrn Prof. Dr. E. GÄUMANN tätig war.