

Die künstliche Mykorrhizaimpfung an Forstpflanzen

Von M. MOSER

(Veröffentlichung aus der Forstl. Bundesversuchsanstalt Mariabrunn, Außenstelle für Lawinenforschung, Bodenbiologisches Institut, Imst)

Im Rahmen unserer Untersuchungen über die praktische Anwendung der Ergebnisse der Mykorrhizaforschung bei Aufforstungen in Gebirgslagen (MOSER 1956) ergaben sich für uns zwei hauptsächliche Arbeitsrichtungen: 1. die künstliche Impfung von Forstpflanzen mit Mykorrhizapilzen und 2. die Aktivierung allenfalls im Boden vorhandener aber oft inaktiver Mykorrhizapilze.

Was die künstliche Impfung betrifft, so könnte eine solche mit Waldstreu erfolgen. Die Erfahrung aber, daß verschiedene Mykorrhizapilze eine physiologisch verschiedene Wirksamkeit gegenüber dem Baumpartner entwickeln können, läßt es wünschenswert erscheinen, Mykorrhizabildung künstlich durch selektierte Reinkulturen von Pilzen zu erzielen. Hinzu kommt ferner bei der Anwendung in der Praxis, daß verschiedene Pilze verschiedene Temperatur- und Feuchtigkeitsvalenzen zeigen, vielleicht auch die Begleitvegetation von Einfluß auf die Wahl des Pilzpartners ist.

So wollen wir in der Folge in drei kurzen Aufsätzen unsere bisherigen Erfahrungen und Ergebnisse bei der Reinkultur der Mykorrhizapilze, vor allem von Zirbe, Lärche und Fichte, bei der Streukultur, mit deren Hilfe die Impfung der Forstpflanzen erfolgt, und in bezug auf die Impftechnik im Forstgarten berichten.

1. Erfahrungen bei der Reinkultur von Mykorrhizapilzen

Zur Klärung der physiologischen Anforderungen und Leistungen der einzelnen Pilzpartner sind zahllose Einzelversuche im Laboratorium, Forstgarten und Freilandstandort notwendig. Von der schwedischen Schule (MELIN, BJÖRKMANN, NYKRANS, NILSSON, SLANKIS, MIKOLA u. a.), von englischen Forschern (RAYNER, LEVISOHN, HARLEY), von russischen Instituten (Mischustin, Trubezkowa, Khudjakow u. v. a.) ist auf diesem Gebiet bereits Hervorragendes geleistet worden. Trotzdem bleibt auch in bezug auf Grundlagenforschung hier noch viel zu tun.

Um aber eine Anwendung solcher Ergebnisse in die Praxis zu übertragen, war es notwendig, die Frage zu prüfen, ob eine Anzucht von Mykorrhizapilzen im großen Maßstabe überhaupt möglich ist. Hierfür gab es die Möglichkeit, raschwüchsige Mykorrhizapilze auszuwählen, wie wir dies anfangs getan haben und wie dies z. B. von SHEMAKHANOVA (1956) getan wurde. Da aber Raschwüchsigkeit keineswegs mit physiologischer Hochwertigkeit parallel gehen muß, war es für uns von Interesse, eine möglichst große Anzahl von Pilzen aus den für uns wichtigen Gebieten zu isolieren. Ferner mußte ein Nährboden gefunden werden, der ein möglichst gutes Wachstum vieler Arten bei gleichzeitiger Billigkeit zuließ.

Isolierungen der Reinkulturen sind entweder von der Wurzel weg oder vom Pilzfruchtkörper ausgehend möglich. Die Isolierung von der Wurzel bietet die Gewähr, daß der Pilz auch unter den am natürlichen Standort gegebenen Bedingungen mit dem betreffenden Baum Mykorrhizen bildet. Die Isolierungstechnik ist schwieriger, die Infektionsgefahr größer. Der Haupt-

nachteil aber ist der, daß die Pilze keine Fruchtkörper bilden und daher unbestimmbar bleiben. Daher schied diese Technik für uns aus, da ja auch die physiologische Qualität verschiedener Arten vergleichend untersucht werden soll.

Die Isolierung vom Fruchtkörper ermöglicht eine sichere Bestimmung, andererseits aber muß erst getestet werden, ob der Pilz tatsächlich mit dem vermuteten Partner die Symbiose eingeht. Da hier Laborergebnisse von den in der Natur vorkommenden Symbiosen auch abweichen können, muß dieser Unsicherheitsfaktor durch langjährige soziologische Beobachtungen der betreffenden Standorte untermauert werden (ROMMEL 1938, 1939; MOSER und GÖBL 1958).

Die Isolierung führten wir zunächst aus dem Innern möglichst junger Fruchtkörper mittels eines geglühten Rasiermessers durch. Es wurden etwa 3–5 mm lange Gewebestückchen herausgeschnitten und auf Agrarnährböden übertragen. Für die Unterscheidung des richtigen Auswachsens von Infektionen mögen zwei Hinweise dienen. Die meisten Mykorrhizapilze sind sehr langsam wüchsig, während Fremdinfektionen rasch wachsen. Das richtige Aushyphen macht sich zunächst in einem reifartigen Überzug des Gewebestückes oder einzelner seiner Schnittflächen bemerkbar, der allmählich zu einem Hyphenflaum und später zu einem Filz wird. Bei raschwüchsigen Mykorrhizapilzen hyphen meist alle Impfstücke gleichzeitig und rasch aus. Die Subkulturen werden dann in der üblichen Weise angelegt.

Erfolgt keine Aushypfung der Gewebestücke, so kann man versuchen, eine solche durch Übertragung auf andere Nährmedien zu erzielen. Bisweilen genügt auch infolge erneuter Sauerstoffzufuhr die bloße Übertragung auf eine neue Platte desselben Nährmediums.

Wir sind später dazu übergegangen, die Gewebestückchen direkt aus der Fruchtschicht herauszuschneiden, wobei wir bei einem viel höheren Prozentsatz positive Erfolge erzielten. Die Infektionsgefahr ist dabei freilich viel größer. Um Infektionen auf



Abb. 1. Herausschneiden eines Gewebestückes aus dem Fruchtkörper

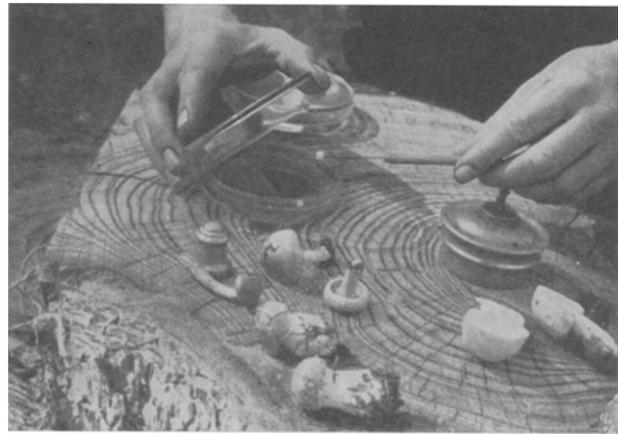


Abb. 2. Übertragung des Impfstückes auf den Nährboden

ein Minimum herabzudrücken, hat es sich als günstig erwiesen, die Isolierung möglichst gleich im Freiland und von ganz jungen, nach Möglichkeit noch geschlossenen Fruchtkörpern vorzunehmen. Wir verwenden hierbei einen kleinen Spiritusbrenner zum Ausglühen der Messer und Nadeln und nehmen sterilisierte Nährböden in Petrischalen mit. (Abb. 1 und 2.) Besonders günstig hat sich dies bei Arbeiten in Gebirgslagen erwiesen, da die Luft dort an sich sehr keimarm ist. Während man bei Isolierung erst im Laboratorium mit 70 bis 80 % an Infektionen rechnen kann, wird dieser Prozentsatz beim Arbeiten an Ort und Stelle auf 30 bis 40 und in Berglagen von etwa 1700 m aufwärts auf unter 10 herabgedrückt.

Das weitere Wachstum der Kultur ist dann verschieden. Die Kultur kann ein dicht filziges, ein locker wolliges, ein seidiges Aussehen haben, sie kann auch oft submers im Agar wachsen. Dies ist weitgehend artspezifisch und auch vom Nährboden bedingt. Bei pigmentbildenden Arten kann dies ein gutes Indiz für die Richtigkeit der Isolierung und auch für gutes Wachstum bilden.

Nährböden

Die Nährböden, über die wir hier berichten, wurden einerseits für Isolierungszwecke, andererseits zur Haltung kräftiger Kulturen und für rasche Vermehrung der Pilze für Praxiszwecke zusammengestellt*.

Anfänglich wurde eine Zusammensetzung wie folgt verwendet:

Malzextrakt (Candoll)	20 g	FeCl ₃	0,01 g
Pepton	1 g	Hefeextrakt (Neuber)	0,5 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g	Agar	15 g
MgSO ₄	0,5 g	Aqua dest.	1000 ml

Pilze aus Tallagen (*Phlegmacium glaucopus*, *fuscomaculatum*, *Leucopaxillus mirabilis*, *Suillus Grevillei*, *aeruginascens* u. v. a.) konnten mit diesem Medium leicht isoliert werden. Doch hatten wir zunächst keine Erfolge mit ca. 30 Arten aus Hochlagen (ca. 1850 bis 1900 m). Aushyphungen konnten jedoch erzielt werden, als wir die Malzextrakt-Menge auf 5 g/L reduzierten. Es erwies sich in der Folge ganz allgemein als günstig, für Isolierungen Medien mit schwachen Konzentrationen zu verwenden, vor allem aber bei Pilzen aus Hochlagen. Durch zu hohe Konzentrationen scheint das osmotische Gleichgewicht der Hyphen durch einen zu plötzlichen Sprung gestört zu werden. In einem Versuch mit *Suillus plorans* und einigen anderen Arten, bei dem die Impfstücke zunächst auf einen höher konzentrierten Nährboden nicht auswachsen und Schrumpfungen zeigten, konnte nach Übertragung auf einen Nährboden mit nur 1/4 der Konzentration des Zuckers bei *S. plorans* noch ein Auswachsen der Hyphen erzielt werden, bei allen anderen Arten waren die Hyphen abgestorben.

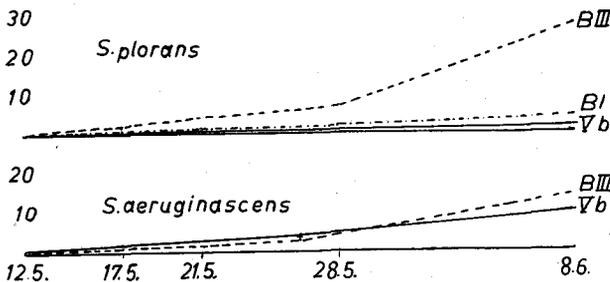


Abb. 3. Radius der Kolonie von *Suillus plorans* bzw. *S. aeruginascens* bei Verwendung verschiedener Nährmedien

Völlig anders jedoch ist das Verhalten bei der Weiterkultur. Für eine kräftige Weiterentwicklung scheinen die Nährstoffe des Mediums (Vb) nicht bei allen Arten auszureichen. Wir führten daher Serienversuche mit verschiedenen Nährbodenvarianten durch, wobei einerseits Zuwachs und Üppigkeit der Kultur, an-

* Spezialnährböden für die Isolierung einzelner schwer kultivierbarer Pilzarten sollen hier nicht behandelt werden

dererseits auch die Pigmentbildung berücksichtigt wurde. Ist letztere der Farbe im natürlichen Boden entsprechend, so läßt dies den Schluß zu, daß sich das Mycel in einem kräftigen, dem natürlichen zumindest annähernd ähnlichen Aktivitätszustand befindet.

Getestet wurden zunächst folgende 6 Nährbodenvarianten:

Vb	Malzextrakt	5 g	BI	Bohnenmehl	20 g
	Pepton	1 g		KH ₂ PO ₄	0,5 g
	MgSO ₄	0,5 g		MgSO ₄	0,5 g
	KH ₂ PO ₄	0,5 g		FeCl ₃	0,01 g
	FeCl ₃	0,01 g		Hefeeextrakt	0,1 g
	Hefeeextrakt	1 g		Agar	15 g
	Agar	15 g		Aqua dest.	1000 ml
	Aqua dest.	1000 ml			
VIb	wie Vb, jedoch Malzextrakt		BII	wie BI, jedoch zusätzlich	
	10 g, Pepton 2 g			Malzextrakt 20 g	
VIIb	wie Vb,		BIII	wie BI, jedoch zusätzlich	
	jedoch Malzextrakt 70 g			Malzextrakt 20 g, Pepton 1 g	

Untersucht wurde der Einfluß auf 8 Mykorrhizapilze von Zirbe, Lärche und Fichte, vergleichsweise auch auf 4 nicht mykorrhizabildende Arten. (*Suillus aeruginascens*, *Grevillei*, *plorans*, *placidus*, *Amanita muscaria*, *Phlegmacium glaucopus*, *fuscomaculatum*, *Lactarius porninsis* – ferner *Morchella esculenta*, *Lepista nuda*, *Kuehneromyces mutabilis*, *Trametes cinnabarina*.)

Die Kurven in Abb. 3 geben einige Beispiele aus diesen Reihen. Aus der Gesamtheit der Versuchsreihen konnten verschiedene Schlüsse gezogen werden.

Malzextrakt

Der Zusatz von Malzextrakt ist für alle Arten günstig und bei Konzentrationen von 0,5 bis 4 oder 5 ‰ haben fast alle ein \pm zunehmendes Wachstum gezeigt. Konzentrationen, die darüber hinausgehen (7 ‰), wirken auf viele Arten bereits hemmend (*Pbl. glaucopus*, *fuscomaculatum*, *A. muscaria*, *S. aeruginascens*, *L. nuda*). Die Verwendung von Malzextrakt als Kohlenstoffquelle erwies sich aus verschiedenen Vorversuchen bereits als am günstigsten. Jedoch kann es nur dort Verwendung finden, wo es nicht für Versuchszwecke auf eine synthetische, genaue Zusammensetzung des Mediums ankommt. Sonst sind natürlich die einzelnen Kohlehydrate als Energiequelle stark verschiedenwertig und variieren auch von Art zu Art der Pilze. (Vgl. auch KELLER 1950, 1952; SCHELLING 1950, 1951.)

Bohnenmehl

Daß Stickstoffverbindungen und besonders verschiedene Aminosäuren und Kombinationen derselben auf das Wachstum vieler Mykorrhizapilze sich günstig auswirken, geht u. a. aus verschiedenen Versuchen von MELIN und seinen Schülern hervor (z. B. MELIN u. NILSSON 1952, 1953). Daß jedoch für Praxiszwecke die Zugabe von Aminosäuren nicht in Frage kommt, ergibt sich allein aus dem Kostenpunkt. Auch Casein bzw. Hydrolysate sind noch zu teuer und zu umständlich zu beschaffen. Caseinpepton allein erwies sich auch noch keineswegs als zufriedenstellend.

So erschien uns als für praktische Zwecke geeignete Quelle für Stickstoff und Aminosäuren Bohnenmehl, das leicht und billig beschafft werden kann. Nach einer von Frau Dr. I. RASCHENDORFER durchgeführten Bestimmung enthielt das von uns verwendete Bohnenmehl 38,08 mg Gesamtstickstoff pro g Bohnenmehl. Zugaben von 20 g grobem Bohnenmehl oder 10 g feinem Mehl pro Liter Nährlösung zeitigten in allen Fällen sehr günstige Resultate. Die Pilze wuchsen rascher und üppiger und bildeten durchwegs ihre natürlichen Pigmente.

Wuchsstoffe

Für Praxiszwecke ist es natürlich im allgemeinen nicht möglich, die für verschiedene Mykorrhizapilze notwendigen Wuchsstoffe in Reinpräparaten zuzusetzen. Wir gaben zunächst 1 g Hefeextrakt bei. Da jedoch auch der Malzextrakt und das Bohnenmehl gewisse Wuchsstoffe enthalten, haben wir die Hefeextraktmenge auf 0,1 g herabgesetzt, da zu hohe Konzentrationen mancher Wuchsstoffe auch hemmend wirken können. Hierbei haben sich verschiedene Hefeextrakt-Präparate als sehr verschiedenwertig erwiesen. Das wirksamste ist entschieden das Difco-Präparat.

Aus diesen Erwägungen und Versuchen stellten wir für die Vermehrung aber auch z. T. für Stammkulturen folgenden Nährboden B IV zusammen, an dem wir nunmehr seit fast vier Jahren festgehalten haben und der nur im Bedarfsfall noch kleineren Modifikationen unterworfen wurde:

Malzextrakt	50 g	FeCl ₃	0,01 g (1 ml einer 1%igen Lösung)
Bohnenmehl	10 g	Hefeextrakt	0,1 g
Pepton	1 g	Agar	15 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g	Aqua dest.	1000 ml
MgSO ₄	0,5 g		

Der Zusatz von Aneurin, Biotin oder Inosit (MELIN 1954 u. a.) fördert eine Reihe von Pilzen, die sich mit obigen Medien nicht oder nur schlecht kultivieren und isolieren lassen. Für solche Arten (z. B. *Boletinus cavipes*, *Suillus Grevillei*, diverse *Phlegmacien*, *Lactarien* u. a.) hat sich ein Nährboden folgender Zusammensetzung als günstig erwiesen:

Maltose	20 g	ZnSO ₄	0,5 ml (Lsg. 1:500)	Aneurin	50 gamma
Glukose	10 g	FeCl ₃	1,0 ml (Lsg. 1%)	Biotin	1 gamma
Pepton	2 g	CaCl ₂	5,0 ml (Lsg. 0,1 m)	Inosit	50 mg
KH ₂ PO ₄	0,5 g	MnSO ₄	0,5 ml (Lsg. 1%)	Agar	15–20 g
MgSO ₄	0,5 g	Hefeextrakt	0,2 g	Aqua dest.	1000 ml

Kombinationen dieses Nährbodens mit B IV haben sich in einigen Fällen bewährt, keineswegs jedoch generell.

Untersuchungen über weitere Verbesserungen und spezielle Modifikationen für bestimmte Pilzgruppen sind derzeit noch nicht völlig abgeschlossen und ausgewertet.

Die Stammkultur

Als Stammkulturen werden jeweils 2 Eprovetten aufbewahrt, die öfter kontrolliert werden, um allfälligen Infektionen vorzubeugen. Die Kulturen sollen nicht zu warm, aber auch nicht zu kühl lagern. Temperaturen zwischen 10 und 18 Grad C haben sich als für die meisten Arten zuträglich erwiesen. Bei zu hohen Temperaturen überaltern die Kulturen zu rasch. Eine Überalterung der Kulturen ist auf jeden Fall zu vermeiden. Deshalb sollen die Kulturen von Mykorrhizapilzen spätestens alle 2 bis 3 Monate überimpft und verjüngt werden. Die Alterungsgeschwindigkeit der einzelnen Arten ist ziemlich verschieden. Raschwüchsigeren Arten, wie etwa *Phlegmacium glaucopus* altern auch rascher und sind nach 3 bis 4 Monaten meist bereits abgestorben. Eine Verzögerung der Alterung (und damit auch längere Ausdehnung der Überimpfungsperioden) kann durch Überdecken der jungen Kultur mit sterilem Paraffin- oder anderem Mineralöl erfolgen (vgl. WERNHAM 1946, STEBBINS und ROBBINS 1949). Doch möchte ich vorerst von dieser Methode etwas abraten, solange über die Auswirkung dieser Behandlungsart auf den Aktivitätszustand der Mykorrhizapilze nichts bekannt ist. Als Nährboden hat sich B IV für Stammkulturen bisher gut bewährt. Es zeigten sich fast nirgends Degenerationserscheinungen, obwohl viele Stämme schon seit 3 bis 4 Jahren in Kultur gehalten werden.

Subkulturen

Kulturen, die für Baumimpfungen oder für physiologische Untersuchungen Verwendung finden sollen, müssen unbedingt häufiger überimpft werden. Bei raschwüchsigen Arten (z. B. den meisten *Suillus*-Arten) sind Umimpfungen in Abständen von 2 bis 3 Wochen zu empfehlen, bei langsamwüchsigen Pilzen wird der Abstand zweckmäßig auf 4 bis 5 Wochen ausgedehnt. Durch derartige häufige Verjüngungen werden die Kulturen wesentlich vitaler, raschwüchsiger, bilden auch ihre natürlichen Pigmente kräftiger und die Mykorrhizabildung erfolgt bei Impfungen in diesem aktiven Zustande viel leichter und besser.

Degeneration von Stämmen

Bisweilen machen sich Degenerationen von Stämmen dadurch bemerkbar, daß diese beginnen, ihre natürlichen Farben nicht mehr zu entwickeln, daß das Wachstum sehr spärlich wird, statt einem dichten, wird nur noch ein dünner, weißlicher Hyphenfilz gebildet. Auch zu starkes submeres Wachstum im Agar kann ein Zeichen von Degeneration sein. Da bei den aus Gewebekulturen gewonnenen Kulturen von Mykorrhizapilzen erblich bedingte Mutationen oder heterokaryotisch bedingte genetische Änderungen ausschließen, sind derartige Degenerationserscheinungen meist in einem Mangelfaktor des Mediums begründet. Häufig lassen sich daher solche Erscheinungen durch öfteres Umimpfen auf verschiedene Nährböden beheben. Man verwendet nacheinander verschiedene Kohlenstoffquellen (Malzextrakt, Saccharose, Glukose, Dextrin u. a. m.) bzw. verschiedene Stickstoffquellen, evtl. auch Zusätze von Wuchsstoffen.

Die Kulturtemperatur

Für normale Kulturen von Mykorrhizapilzen haben sich Temperaturen von 20 bis 26 ° C als günstig erwiesen. Hochlagenpilze zeigen jedoch gewisse Ausnahmen. Die Isolierung von Hochlagenpilzen gelingt bei derartigen Temperaturen nicht oder nur schwer und zögernd. Die optimalen Temperaturen für die Isolierung von Pilzen aus der subalpinen Region liegen tiefer, ca. von 15 bis 18 ° C (MOSER 1956).

Dies erklärt sich aus den durchschnittlich viel tieferen Bodentemperaturen in Gebirgslagen mit Bewaldung. Die weitere Kultur dieser Pilze hat aber gezeigt, daß diese in der Lage sind, sich in längerer Kulturdauer in gewissen Grenzen an etwas höhere Temperaturen anzupassen. Doch muß bezweifelt werden, daß dies für Praxiszwecke günstig ist, da die Pilze ja meist wieder in Hochlagen verpflanzt werden sollen. Für Experimentalzwecke mit Hochlagenpilzen verwenden wir daher einen Brutschrank mit Wasserkühlmantel, um Temperaturen von 17 bis 18 Grad zu halten. Für Praxiszwecke ist Raumtemperatur in einem Raum mit nicht zu extremen Schwankungen ausreichend. Temperaturen im Bereich von 12 bis 20 Grad sind zuträglich. Auch spielt natürlich die Dauer der Temperatureinwirkung eine große Rolle.

Da dem Temperatur- ebenso auch dem Feuchtigkeitsfaktor für die Anwendung unserer Ergebnisse bei Aufforstungen in Gebirgslagen eine wesentliche Rolle zukommt, sind bei uns derzeit umfangreichere Untersuchungen über die Temperatur- und Feuchtigkeitsvalenz von Mykorrhizapilzen begonnen worden.

Flüssigkeitskulturen

Während es günstig ist, Stammkulturen auf festen Böden, durch Agar geliert, zu verwenden, ist es für praktische Zwecke oft wünschenswert, flüssige oder halbflüssige Medien zu verwenden.

Unter halbflüssigen verstehen wir Gelatinekulturen, die zunächst zwar geliert sind, durch das proteolytische Fermentensystem der meisten Mykorrhizapilze jedoch verflüssigt werden. Wir verwenden hier an Stelle des Agars einen Zusatz von 3 bis 6 % Gelatine (ungebleicht!). Man hat hier bei der Impfung den Vorteil eines festen Mediums, nach Tagen verflüssigt sich jedoch der Nährboden zusehends, und man erreicht neben der Oberflächenkultur auch Submerswachstum, wodurch die Gesamtmenge des Nährbodens besser ausgenützt werden kann. Da die Stickstoffmenge, die in der Gelatine enthalten ist, ziemlich groß ist (in unserem Falle nach Bestimmung von Dr. I. RASCHENDORFER ca. 140 bis 145 mg N pro g Gelatine!), ist es bei Verwendung von Gelatine günstig, andere Stickstoffquellen überhaupt wegzulassen oder auf schwache Zusätze zu reduzieren.

Bei der reinen Flüssigkeitskultur bleiben Gelierungsmittel völlig weg. Hierbei empfiehlt es sich in manchen Fällen aber, die gesamte Impftechnik zu ändern. Während sonst mit der Impfnadel aus der alten Kultur Impfstücke auf den frischen Nährboden übertragen werden, verwendet man hier zweckmäßig Hyphensuspensionen nach WIKÉN (WIKÉN, KELLER, SCHELLING und STÖCKLI 1953). In einer Glasflasche (am besten Steilbrustflasche) mit gut schließendem Gummistopfen (oder auch eingeschlifftem Glasstopfen) werden Glaskugeln (4 bis 6 mm Durchmesser) bis zu einem Drittel eingefüllt, darauf destilliertes Wasser etwa bis zur Hälfte oder bis zu $\frac{2}{3}$ des Glases gefüllt, die Gläser dann mit Watte verschlossen und Gläser und Stopfen getrennt sterilisiert. Bei Öffnung des Autoklaven oder Dampftopfes wird der Wattestopfen sofort entfernt und der Gummistopfen (resp. Glasstopfen) leicht aufgesetzt. Durch das Abkühlen setzt sich der Stopfen dann gerade richtig fest, um nicht beim Öffnen Außenluft eindringen zu lassen.

Gleichzeitig sterilisiert man einige Impfpipetten (mit erweiterter Spitze). In die Spitze der Pipette wird ein dünner Wattedropf locker so eingeführt, daß man ihn vor dem Arbeiten herausziehen kann, ohne das Glas zu berühren. In den Hals der Pipette wird ein etwas festerer Wattedropf etwa 3 cm unterhalb der Öffnung eingebracht. Dieser soll eine Art Filtrierung bewirken und die direkte Berührung ungefilterter Luft zwischen Pipette und Mund verhindern. Die Pipetten werden in großen, unten geschlossenen (eprouvettenförmigen), oben mit Watte verstopften Glasröhren sterilisiert.

Nach dem Abkühlen kann mit der Impfung begonnen werden. Günstig ist es hierbei zu zweit zu arbeiten, da der Verschluss von Kolben oder Flaschen so viel rascher möglich ist und die Infektionsgefahr verringert wird. Bei sorgfältigem, sauberem Arbeiten kann so auch ohne Impfkammer ein befriedigender Prozentsatz infektionsfreier Kulturen erreicht werden.

Die Ausgangskulturen (von festen oder flüssigen Medien) werden mit Hilfe der Impfnadel mit möglichst wenig altem Nährboden in die Schüttelflaschen gebracht. Hierbei soll der Gummi- oder Glasstopfen möglichst wenig geöffnet werden. Das Material wird dann mit einem Schüttelapparat, notfalls auch von Hand, so lange geschüttelt, bis es einigermaßen gut zerkleinert und gleichmäßig verteilt ist. (Für physiologische Untersuchungen ist es unter Umständen von Vorteil, eine von MELIN [MELIN 1954] gemachte Verbesserung anzuwenden: Das zerkleinerte Hyphenmaterial wird noch durch ein feines Sieb gepreßt, um eine möglichst Homogenität des Materials zu erreichen.) Mit steriler Pipette wird dann entnommen, am günstigsten so, daß die Spitze zwischen die Glaskugeln gesteckt wird. Die gewünschte Menge wird dann in die vorbereiteten Kolben mit Nährlösung bzw. Torf oder anderen Medien abgefüllt. Es empfiehlt sich meist, nicht zu kleine Pipetten zu verwenden (20 und 25 ml haben sich bei uns am besten bewährt), da eine Pipette nicht mehr als einmal benutzt werden darf! Pipetten mit zu enger Öffnung sind ungeeignet, da sie zu leicht verstopfen und dann nicht ausgeblasen werden sollen. Steht eine Impfkammer zur Verfügung, so ist die Gefahr von Infektionen sehr gering. Ist dies jedoch nicht der Fall, empfiehlt es sich, in einem möglichst kleinen, leicht sauber zu haltenden Raum zu arbeiten, wenn möglich unter Verwendung einer UV-Entkeimungslampe. Diese soll vor dem Arbeiten mindestens 12 Stunden brennen (beim Arbeiten abschalten!). Luftzug ist zu vermeiden. Auf diese Weise lassen sich Bakterieninfektionen so gut wie ausschalten, während Infektionen durch Penicillin, Aspergilli u. a. niedere Pilze nicht ganz beseitigt werden, da die in der Luft befindlichen Sporen gegenüber der UV-Strahlung zu widerstandsfähig sind. Hier könnte nur eine wesentlich längere Brenndauer der UV-Lampe wirksam werden.

Andererseits haben aber verschiedene Arten gezeigt, daß das Hyphenmaterial einer Art Schockwirkung durch die Zerkleinerung unterworfen ist und das Wachstum verzögert wird (ebenso auch die Respiration!) oder überhaupt nur noch von größeren Hyphenpartikeln aus beginnt. Ob diese Schockwirkung irgendwie überwunden werden kann oder ob sie in verschiedenen Fällen letal ist, können wir augenblicklich noch nicht sagen. Untersuchungen in dieser Hinsicht sind im Gange.

Flüssigkeitskulturen von Mykorrhizapilzen ohne besondere Vorkehrungen wachsen zunächst submers. Um an die Oberfläche zu kommen, benötigen sie meist eine ziemlich lange Zeit. *Suillus plorans* z. B. benötigt bei Kultur in 20 ml Nährlösung in 100 ml

Erlenmeyerkolben, Versuchstemperatur 18 ° C, und bei Verwendung von dl-Alanin als N-Quelle 10 bis 14 Tage, um die Oberfläche zu erreichen, bei Verwendung von Serin 14 bis 20 Tage, bei ansonsten gutem Wachstum. Steht Glutaminsäure als N-Quelle zur Verfügung, so verlängert sich der Zeitraum auf 23 bis 28 Tage, bei anderen Stickstoffquellen noch mehr.

Ein Wachstum ohne besondere Luftzufuhr ist also grundsätzlich möglich. Die Verwendung eines Schüttelapparates oder -tisches kann natürlich die Durchlüftung der Flüssigkeit und damit auch die Wachstumsgeschwindigkeit um ein Vielfaches steigern und die Ausnützung des Mediums verbessern. Auch erlaubt dies die Verwendung größerer Gefäße mit höherem Nährlösungsstand und damit auf kleinerem Raum die Erzielung größerer Mycelernten. Bei den relativ langsamwüchsigen Mykorrhizapilzen empfiehlt es sich jedoch nicht, die bei niederen Pilzen übliche Dauerschüttelung anzuwenden, sondern gewisse Ruhepausen einzuschalten (also z. B. Schüttelung nur nachts) und eine nicht zu hohe Frequenz zu wählen. Durchlüftungskulturen, bei denen bakteriengefilterte Luft durchgesaugt wird, oder Tankkulturen mit Rührwerk können selbstverständlich zum selben Ziel führen, doch erfordern sie wegen erhöhter Infektionsgefahr noch größere Sorgfalt und sind auch apparativ komplizierter.

Genaue quantitative Untersuchungen über solche Schüttel- und Durchlüftungskulturen, die die Rentabilität derartiger Kulturen erproben sollen, sind derzeit noch nicht abgeschlossen, und wir werden zu gegebener Zeit darüber berichten.

Flüssigkeitskulturen sind unerlässlich im Laboratorium für jegliche Art physiologischer Untersuchung. Sie sind aber auch ebenso wichtig für die für praktische Zwecke entwickelte Torf- bzw. Streukultur. Auf diese soll dann in der folgenden Arbeit eingegangen werden.

Bisher in unserem Laboratorium kultivierte Mykorrhizapilze¹

Pinus cembra

Suillus plorans (Roll.) Sing.; *S. placidus* (Bon.) Sing.; *Amanita muscaria* (L. ex Fr.) Hooker; *Paxillus involutus* (Batsch) Fr. (Nachweis noch nicht sicher erbracht!); *Lactarius rufus* (Scop.) Fr.

Pinus silvestris

Suillus variegatus (Sow. ex Fr.) Kuntze; *S. granulatus* (L. ex Fr.) Snell; *S. luteus* (L. ex Fr.) S. F. Gray (†); *S. piperatus* (Bull. ex Fr.) Kuntze; *Tricholoma robustum* (A. & S. ex Fr.) Ricken; *Leucopaxillus mirabilis* (Bres.) Mos. (auch mit *P. austriaca*); *Phlegmacium caesiocanescens* (Mos.) Mos.; *S. piperatus* (Bull. ex Fr.) Kuntze; *Trichol. vaccinum* (Fr.).

Larix europaea

Suillus Grevillei (Klotzsch) Sing.; *S. aeruginascens* (Secr.) Snell; *S. Bresadolae* (Quel.); *S. tridentinus* (Bres.) Sing.; *Boletinus cavipes* (Opat.) Kalchbr.; *Lactarius porninsis* Roll.

Picea excelsa

Xerocomus subtomentosus (L. ex Fr.) Quel.; *Boletus edulis* Bull. ex Fr.; *Tricholoma saponaceum* (Fr.) Quel.; *Tricholoma aurantium* (Schff. ex Fr.) Ricken; *Myxacium*

¹ Manche der hier unter einer Baumart angeführten Arten bilden auch mit anderen Partnern Mykorrhizen, sind aber von uns nur im Zusammenhang mit der einen Art untersucht worden (z. B. *A. muscaria*, *Phl. glaucopus*). Ein (†) hinter dem Artnamen bedeutet, daß uns die Art im Laufe der Jahre wieder eingegangen ist.

collinitum (Fr.) Wünsche (†); *Phlegmacium glaucopus* (Fr.) Ricken; *Phl. fuscomaculatum* J. Schff.; *Phl. allutum* (Secr.) Ricken; *Phl. varium* (Fr.) Ri.; *Phl. cephalixum* (Secr.); *Phl. purpurascens* (Fr.) Ri.; *Phl. elegantior* (Fr.) Ri. ss. MOSER 1951; *Phl. orechalcium* (Fr.) Ri. ss. MOSER 1951; *Phl. subglaucopus* Eichh. (†); *Phl. variegatus* (Bres.); *Phl. infractum* (Fr.).

Arten, die sicher Mykorrhizapilze sind, deren Partner jedoch nicht genau festliegt: *Hebeloma longicaudum* (Pers. ex Fr.); *Leucocortinarius bulbiger* (A. & S. ex Fr.) Sing. (wahrscheinlich mit *Pinus silvestris*); *Myxadium delibutum* (Fr.) Ri. (Fagus?); *Phlegmacium cliduchum* ss. Ri. (Fagus?).

Birke: *Leccinum scabrum* (Bull. ex Fr.) Gray; *Lactarius torminosus* (Schff.) Fr.
Espe: *Leccinum aurantiacum* (Bull.) S. F. Gray.

Zusammenfassung

Da die Reinkultur von Mykorrhizapilzen die Grundlage für die Herstellung der Streukulturen für Forstgärten etc. und damit für „gelenkte“ Mykorrhizabildung ist, wurde im ersten Teil dieser Arbeit die Gewinnung und Wartung von Reinkulturen dargelegt. Es werden ferner nach unseren bisherigen Erfahrungen Hinweise für die Zusammensetzung geeigneter Kulturmedien, für die Haltung der Stammkulturen, der Subkulturen und die Herstellung von Flüssigkeitskulturen gegeben.

Literatur

- KELLER, G., 1950, Die Verwertbarkeit verschiedener Kohlehydrate und Dicarbonsäuren durch *Cenococcum graniforme* (Sow.) Ferd. et Winge. Schw. Z. f. Allgem. Patholog. u. Bacteriologie XIII, 565-569. — KELLER, G., 1952, Untersuchungen über das Wachstum von *Cenococcum graniforme* auf verschiedenen Kohlenstoffquellen. Ein Beitrag zur Kenntnis der Physiologie der mykorrhizabildenden Pilze. Prom. Nr. 2036 der ETH Zürich. — LANGKRAMER, O., u. SOBOTKA, A., 1956, Mykorrhiza lesních dřevin a její praktické využití v lesním hospodářství. Ceska Mykologie X, 41-48. — LEVISOHN, I., 1956, Growth stimulation of forest tree seedlings by the activity of freeliving mycorrhizal mycelia. Forestry 29, 53-59. — MELIN, E., 1953, Transfer of labelled nitrogen from glutamic acid to pine seedlings through the mycelium of *Boletus variegatus* (Sw.) Fr. Nature 171 (42) 134. — MELIN, E., 1954, Growth factor requirements of mycorrhizal fungi of forest trees. Svensk Bot. Tidskr. 48, 86-94. — MELIN, E., 1954, Transport of labelled phosphorus to pine seedlings through the mycelium of *Cortinarius glaucopus* (Schff. ex Fr.) Fr. Sv. Bot. Tidskr. 48, 555-558. — MELIN, E., 1955, Ca⁴⁵ used as indicator of transport of cations to pine seedlings by means of mycorrhizal mycelium. Sv. Bot. Tidskr. 49, 119-122. — MELIN, E., u. MIKOLA, P., 1948, Effect of some amino acids on the growth of *cenococcum graniforme*. Physiol. Plantarum 1, 110-113. — MELIN, E., u. NILSSON, H., 1952, Transport of labelled nitrogen from an ammonium source to Pine seedlings through mycorrhizal mycelium. Sv. Bot. Tidskr. 46, 281-285. — MELIN, E., u. NORKRANS, B., 1948, Amino acids and the growth of *Lactarius deliciosus* (L.) Fr. Phys. Plant. 1, 176-184. — MIKOLA, P., 1955, Metsämaan kantasiebiën puhdasviljely. Growing forest soil Basidiomycetes in pure culture. Karstenia III, 5-17. — MOSER, M., 1956, Die Bedeutung der Mykorrhiza für Aufforstungen in Hochlagen. Forstw. Centralbl. 75, 9-18. — MOSER, M., u. GÖBL, F., 1958, Untersuchungen zur Pilzsoziologie eines Zirben-Lärchen-Bestandes knapp unterhalb der Waldgrenze. (In Vorbereitung.) — ROMELL, L. G., 1938, A trenching experiment in spruce forest and its bearing on problems of mycotrophy. Sv. Bot. Tidskr. 32, 89-99. — ROMELL, L. G., 1939, The ecological problem of mycotrophy. Ecology 20, 163-167. — SCHELLING, C. L., 1950, Die Verwertbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen durch *Mycelium Radicis atrovirens* Melin. Schw. Z. f. Allg. Path. u. Bact. XIII, 570-574. — SCHELLING, C. L., 1951, Zur Kenntnis der Physiologie von *Mycelium Radicis atrovirens* Melin mit besonderer Berücksichtigung der Verwertbarkeit verschiedener Kohlenstoffquellen. Diss. ETH Zürich. — SHEMAKHANOVA, N. M., 1956, *Hebeloma crustuliniforme* (Bull.) Fr. mikorizoobrasovatelj duba. (... mycorrhizal fungus of the oak.) Mikrobiologija XXV, 57-60. — STEBBINS, M. E., and RIBBINS, W. J., 1949, Mineral oil preservation of fungus cultures. Mycologia XLI, 632-636. — WERNHAM, C. C., 1946, Mineral oil as a fungus culture preservative. Mycologia XXXVIII, 691-692. — WIKÉN, T., KELLER, H. G., SCHELLING, C. L., STÖCKLI, A., 1951, Über die Verwendung von Mycelsuspensionen als Impfmateriale in Wachstumsversuchen mit Pilzen. Experientia VII, 237-239.