

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Sporen des Kohlhernieerregers (*Plasmodiophora brassicae* Wor.)

Von H. H. BUDZIER

Aus dem Institut für Phytopathologie und Pflanzenschutz der Universität Rostock,
Direktor Prof. Dr. E. Reinmuth

Die taxonomisch zu den Archimyceten gestellte *Plasmodiophora brassicae* Wor. bildet bei ihrer holocarpin Entwicklung kugelförmige Sporen aus, deren Größe bekanntlich bei durchschnittlich $3,3 \mu$ liegt (RIEHM 1928). Die fast an die Größenordnung der Bakterien grenzenden Ausmaße der lebenden Sporen sowie der hyaline, nur wenig strukturierte Inhalt bedingen gewisse Schwierigkeiten bei der mikroskopischen Beurteilung des Vitalitätszustandes der Sporen.

Wie BREMER (1924) feststellte, ist die Struktur des Sporenhaltes kein sicheres Vitalitätskriterium. Das konnte bei den eigenen Untersuchungen bestätigt werden. So zeigte eine Sporenabtötung durch Salzsäure, Kalilauge, Sublimat oder Alkohol vielfach Bilder, die der Lebendstruktur äußerst ähnlich waren. Andererseits ergaben nach GLEISBERG (BREMER 1924) Präparate, die morphologisch „so gut wie nur tote“ Sporen zeigten, noch Infektionen.

Ein Infektionstest an geeigneten Wirten ergibt symptomatologisch nur einen Einblick in die Erkrankungsschwelle, nach der Wurzelhaar-Infektionsmethode von SAMUEL und GARRETT (1945) kann darüber hinaus im Vergleich mit dem Ausgangs-Infektionsmaterial auch die Infektionsschwelle beurteilt werden. Beide Verfahren ergeben aber keinen Befund über den tatsächlich vorhandenen vitalen und infektionsfähigen Anteil an der Infektionsmasse, da nicht alle Sporen zur Infektion zu gelangen brauchen.

Bei früheren Arbeiten (BREMER 1924, FEDOTOWA 1930) wurde die Plasmolysierbarkeit der Sporen als Vitalitätsnachweis benutzt. HEILING (1939) ermittelte später, daß mit zunehmendem Alter der Sporen sowohl deren Plasmolysierbarkeit als auch Pathogenität abnimmt. Dabei soll hier nicht diskutiert werden, ob Pathogenität und Vitalität in diesem Fall terminologisch gleichzuschalten wären. Der Plasmolysetest ist nach neueren Erfahrungen aber nicht als ein sicheres Vitalitätsdiagnostikum bei den Sporen von *Plasmodiophora brassicae* anzusehen (BREMER, WEHNELT und BRANDENBURG 1937).

Es soll hier über fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an den Sporen von *Plasmodiophora brassicae* berichtet werden, denen die Erzielung des sogenannten STRUGGER-Effektes*) nach einer Akridinorange-Fluorochromierung zu Grunde liegt. Unter Einhaltung bestimmter Bedingungen fluoresziert nämlich nach entsprechender Behandlungsmethodik spezifisches Protoplasma im lebenden Zustand grün, tot dagegen rot. „Nekrobiotische Zustände“ (STRUGGER 1949) des Protoplasmas, unter denen irreversible, ad exitum führende Veränderungen zu verstehen sind, demonstrieren sich dabei als intermediärfarben von gelber bis roter Sekundärfluoreszenz.

Auch bei einigen wenigen Vertretern der Fungi konnte ein derartiges Verhalten ermittelt werden.

*) Näheres hierüber ist in einer früheren Arbeit (BUDZIER 1954) nachzulesen. wo auch die entsprechende Literatur zitiert ist.

STRUGGER (1944) und KÖLBEL (1947) experimentierten mit *Saccharomyces*-Zellen.

Außer JOHANNES (1950, 1954) berichtete gleichfalls STRUGGER (1941) über Untersuchungen an Phycomyceten. JOHANNES stellte fest, daß Sporenmaterial und Mycel analoge Effekte im Hinblick auf den Vitalitätszustand ergaben. Gleichfalls konnte WALLHÄUSER (1951) den STRUGGER-Effekt an Pilzhyphen beobachten.

Das Geschwulstausgangsmaterial, das für die im Winter 1954/55 durchgeführten Untersuchungen verwendet wurde, entstammte der Ernte 1951 und war bis zum Verbrauch in einem Kühlschrank bei $+4^\circ\text{C}$ aufbewahrt worden. Da größere Sporenzusammenballungen eine gleichmäßige Behandlung bzw. Fluorochromierung der Einzelsporen verhindern, wurden die im Leitungswasser mazerierten Geschwulste über ein sehr feines Gasesieb gegeben. Die durchgeseichte viskose Flüssigkeit stellte eine Sporensuspension ohne größere Klumpenbildung dar, die dann zur Verwendung gelangte.

Vor der jeweiligen Überführung in kleine Blockschälchen zur Behandlung oder Fluorochromierung wurde das Sporenmaterial stets für kurze Zeit auf Filterpapier gebracht, um anhaftende überschüssige Flüssigkeit abzusaugen und nicht die folgende Manipulation zu beeinträchtigen. Die Fluorochromierung (15 Min.) erfolgte immer mit einem Überangebot von Akridinorange (H-Standard — Hollborn & Sohn) — Phosphatpuffergemisch (pH 7,3) mit einer Fluorochromkonzentration von 1:5000. Zur Fluoreszenzmikroskopie wurde dann Material auf einen Objektträger gehebert und mit einem Deckglas bedeckt untersucht.

Zur Vermeidung von Strahlungsschäden an den Sporen, die die Versuchsergebnisse verfälschen könnten, wurde der bestrahlte Gesichtskreis kontinuierlich langsam verschoben. Nur die in einem bestimmten Sektor des Gesichtskreises liegenden Sporen wurden beurteilt, um eventuellen subjektiven Einflüssen bei der Beobachtung vorzubeugen.

Washungen von behandelten Sporen mit reinem Phosphatpuffer (pH 7,3) — die Herstellung geschah nach Angaben von STRUGGER (1937) — erfolgten derart, daß die Sporen unter ständigem Rühren 30 Minuten lang in einer relativ großen Menge Pufferlösung belassen wurden. Anschließend wurden die Sporen durch Zentrifugieren der Suspension wiedergewonnen.

Es wurde dieselbe technische Ausrüstung wie bei den früheren Experimenten benutzt (BUDZIER 1954), lediglich wurde bei den folgenden Untersuchungen mit dem Okular 10 und dem Objektiv 40 gearbeitet.

Bei der Betrachtung von Sporenmaterial in wäßriger Suspension unter einem Normal-Mikroskop lassen sich der Inhaltsstruktur nach mehr oder weniger vier Kategorien von Sporen unterscheiden. Die mit feinkörnigem, hyalinem Inhalt dürften mit ziemlicher Sicherheit als vital angesehen werden, die mit sichtlicher Destruktion (Verklumpung des Plasmas) als letal. Weiterhin sind Sporen zu sehen, deren

Struktur nicht einwandfrei beurteilt werden kann und solche, die inhaltslos erscheinen.

In der Tabelle 1 ist eine Gegenüberstellung des normal- und fluoreszenzmikroskopischen Befundes derselben, nicht fluorochromierten Präparate erfolgt.

Tabelle 1

Struktur- bild	Sporen- zahl	%	%	%	Sporen- zahl	Fluoreszenz- Farbe
feinkörnig	600	50	65	24	97	+++ gr
destruiert	205	17	22	35	138	++ gblgr
indifferent	120	10	13	41	165	++ grlgb
optisch leer	275	23	—	—	—	
Σ	1200	100	100	100	400	

Zeichenerklärung:

++ = schwache Fluoreszenzintensität
 +++ = mittelstarke Fluoreszenzintensität
 gr = grüne Fluoreszenzfarbe
 gblgr = gelblichgrüne Fluoreszenzfarbe
 grlgb = grünlichgelbe Fluoreszenzfarbe
 rlgbl = rötlichgelbe Fluoreszenzfarbe
 gblr = gelblichrote Fluoreszenzfarbe
 r = rote (kupferrote) Fluoreszenzfarbe

Aus den Angaben ist ersichtlich, daß anhand der Primärfluoreszenz der Plasmodiophora-Sporen kein sicheres Urteil über den Strukturzustand des Plasmas gefällt werden kann. Auch die „indifferente Gruppe“ läßt sich auf diesem Wege allem Anschein nach nicht fluoreszenzoptisch analysieren. Die inhaltslosen Sporen, die also wahrscheinlich nur die leere Membranhülle darstellen, zeigen unter den genannten Bedingungen keine Primärfluoreszenz.

Nach einer Fluorochromierung mit Akridinorange ergab die Sekundärfluoreszenz der Sporen ein interessantes Bild. Vergleicht man dieses, wie es in der Tabelle 2 erfolgt, mit dem normaloptischen Befund, so lassen sich gewisse Beziehungen erkennen.

Tabelle 2

Struktur- bild	Sporen- zahl	%	%	Sporen- zahl	Fluoreszenz-Farbe
feinkörnig	600	65	54,0	430	++ - +++ gr - grlgb
destruiert	205	22	18,5	149	+++ r
indifferent	120	13	27,5	221	++ rlgbl - gblr
Σ	925	100	100,0	800	

Die in grünlicher Farbe fluoreszierenden Sporen entsprechen zahlenmäßig etwa denen, deren Inhalt von feinkörniger Struktur ist, die rot fluoreszierenden dagegen den destruiert erscheinenden. Fluoreszenzmikroskopisch tritt noch eine Gruppe von Sporen auf, die eine gelblich-rötliche Lichtemission aufweist.

Allen bisherigen Erfahrungen nach ist das Plasma derart fluoreszierenden Sporen um so stärker in seiner Struktur irreversibel geschädigt, je mehr das rote Spektrum in der Mischfarbe überwiegt (STRUGGER 1947, 1949; JOHANNES 1950, 1954). Das scheint auch die in der Tabelle 2 aufgezeigte quantitative Stellung dieser Sporentypen zu erklären, denen mit gewisser Wahrscheinlichkeit nicht nur die normaloptisch „indifferenten“, sondern auch bereits gering geschädigte „feinkörnige“ und noch nicht für den Rotefekt ausreichend „destruierte“ Sporen zuzuordnen sind.

Eine Sekundärfluoreszenz der Sporenmembran (leere Sporen) konnte nicht beobachtet werden. Auch JOHANNES (1954) stellte bei dem von ihm untersuchten Phycomyceten fest, daß nach Akridinorange-Fluorochromierung keine Membran-Fluoreszenz an Hyphen, Sporangien und Zoosporen auftrat.

Wurden Plasmodiophora-Sporen durch Aufkochen in Wasser abgetötet und sowohl so als auch fluorochromiert der Fluoreszenzanalyse unterworfen, so ergab sich das in der Tabelle 3 wiedergegebene Bild.

Tabelle 3

Nicht fluorochromiert				Fluorochromiert			
Fluoreszenz- Farbe	Sporen- zahl	%	%	Sporen- zahl	Fluoreszenz- Farbe		
+++ gr	205	41,0	100	500	+++ r		
++ gblgr	198	39,5					
++ grlgb	97	19,5					
Σ	500	100,0	100	500			

Dieses Ergebnis bekräftigt bereits bei der Besprechung der Tabelle 1 und 2 mitgeteilte Beobachtungen. Die Primärfluoreszenz der Sporen kann nicht zur Vitalitätsdiagnose herangezogen werden; nach einer Akridinorange-Fluorochromierung sind die rot fluoreszierenden Sporen mit Sicherheit als tot anzusehen.

Die Tabelle 4 zeigt die Resultate, die erzielt wurden, wenn die Sporen einer Behandlung mit toxisch wirkenden Agenzien ausgesetzt und vor der Fluorochromierung mit dem Phosphatpuffer gewaschen wurden.

Tabelle 4

Behandlung	% (Sporen- zahl)	Fluoreszenz-Farbe
2h Alkohol (96%)	100 500	++ - +++ gblr - r
2h Formalin (35%)	100 400	++ - +++ gblr - r
2h Salzsäure (10%)	100 400	+++ r
2h Kalilauge (10%)	100 400	+++ r

Besonders interessant ist der in der Tabelle 5 dargestellte Versuch, bei dem die Sporen vor der Fluorochromierung der Einwirkung von Sublimat (1 : 1000 in Aq. dest.) unterworfen wurden.

Tabelle 5

Behandlungs- dauer	Fluoreszenzbild			
	gr - grlgb Sporen- zahl	%	%	gblr - r Sporen- zahl
30 Minuten	312	78,0	22,0	88
60 Minuten	298	74,5	25,5	102
120 Minuten	290	72,5	27,5	110
240 Minuten	100	25,0	75,0	300
480 Minuten	0	0,0	100,0	400

Mit zunehmender Einwirkungsdauer des Sublimats nimmt einerseits die Zahl der grün fluoreszierenden Sporen ab, die eine Rotfluoreszenz zeigenden aber zu. Es ist die Vermutung nicht von der Hand zu weisen, daß auch hierbei die auf das Sporenplasma letal wirkende Noxe sich in der Sekundärfluoreszenz der Sporen widerspiegelt. Wurden nämlich die Präparate, die noch grün fluoreszierende Sporen enthielten (30 bis 240 Min.), nach dem Mikroskopieren über einer Flamme stärker erhitzt (Aufwallen), so ergab die erneute Untersuchung stets eine Rotfluoreszenz aller Sporen.

Es wurde auch die Frage geprüft, ob nicht durch „Langfärbungen“, 24 Stunden u. m., eine noch intensivere Fluorochromeinlagerung stattfindet. Es konnte festgestellt werden, daß, ähnlich wie es KÖLBEL (1947) an Hefezellen fand, eine maximale Fluorochromaufnahme relativ schnell erfolgt. Bei lang andauernder Fluorochromierung wurden dagegen vielfach mehr oder weniger starke Umkehreffekte beobachtet. Auf die Möglichkeit des Auftretens eines solchen Phänomens durch Quellungs-, Diffusions- u. a.

Vorgänge im nekrotischen Protoplasma wies KREBS (1947) bereits hin. Er betonte in diesem Zusammenhang, daß die Wahl des Beobachtungszeitpunktes äußerst wichtig sei für die Erzielung richtiger Ergebnisse.

Zur Differenzierung von lebenden und toten Sporen der *Plasmodiophora brassicae* erscheint die unter den genannten Bedingungen beobachtete Primärfluoreszenz als ungeeignet. Im Gegensatz dazu brachte die Sekundärfluoreszenz nach einer Akridinorange-Fluorochromierung durchaus brauchbare Resultate. Nicht nur die Extreme „vital“ und „letal“ treten analysiert hervor, sondern auch Übergangsphasen zwischen diesen. Der STRUGGER-Effekt trat sowohl an unter natürlichen Bedingungen destruierten Sporen als auch an solchen auf, die durch Hitze, Alkohol, Formalin, Salzsäure, Kalilauge oder Sublimat abgetötet worden waren. Die Untersuchungsergebnisse geben der berechtigten Hoffnung Ausdruck, daß in der Akridinorange-Fluorochromierungsmethode ein technisch relativ einfaches, rationelles Schnellverfahren gegeben ist, das bei Fungizidprüfungen an *Plasmodiophora*-Sporen zur Anwendung gelangen kann.

Zusammenfassung:

Es wird über fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Sporen der *Plasmodiophora brassicae* Wor. berichtet. Eine Vitalitätsdifferential-Diagnose ist nicht anhand der Primärfluoreszenz der Sporen möglich. Die nach einer Akridinorange-Fluorochromierung auftretende Sekundärfluoreszenz ermöglicht eine leichte Unterscheidung vitaler und nekrotischer Sporen derart, daß die lebenden grün, die toten dagegen rot fluoreszieren.

Damit konnte berichtet werden, daß der sogenannte STRUGGER-Effekt nach einer Akridinorange-Fluorochromierung auch an Archimyceten aufzutreten vermag.

Literaturverzeichnis

- BREMER, H.: Untersuchungen über die Biologie und Bekämpfung des Erregers der Kohlhernie, *Plasmodiophora brassicae* Woronin. *Ldw. Jahrb.* 1924, 59, 227—243.
- BREMER, H., B. WEHNELT und E. BRANDENBURG: Zur Prüfung von Bekämpfungsmitteln gegen Kohlhernie. *Mitt. a. d. BRA* 1937, H. 55, 61—79.
- BUDZIER, H. H.: Untersuchungen über die Primär- und Sekundärfluoreszenz der Larven des Kartoffelnematoden *Heterodera rostochiensis* Wollenweber

unter Verwendung von Akridinorange. *Wiss. Ztschr. Univ. Rostock, math.-nat. Reihe*, 1954, 3, 221—229.

FEDOTOWA, T.: Über die die *Plasmodiophora brassicae* Wor. begleitenden Bakterien. *Phytopath. Ztschr.* 1930, 1, 195—210.

HEILING: Bekämpfung der Kohlhernie. *Wiss. Jahrb. 1937 der BRA f. Land- u. Forstwirtschaft. Bln.-Dahlem*, 1939, 108—109, Berlin, Verlag Parey.

JOHANNES, H.: Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien, III. Die Vitalfärbung von *Phycomyces Blakesleeanus* mit Akridinorange. *Arch. f. Mikrobiol.* 1950, 15, 13—41.

JOHANNES, H.: Beiträge zur Vitalfärbung von Pilzmycelien, IV. Die Vitalfärbung der *Achlya racemosa* (Hildebrand) Pringsheim mit den basischen Farbstoffen Neutralrot und Akridinorange. *Protoplasma* 1954, 44, 165—191.

KÖLBEL, H.: Quantitative Untersuchungen über die Farbstoffspeicherung von Akridinorange in lebenden und toten Hefezellen und ihre Beziehung zu den elektrischen Verhältnissen der Zelle. *Ztschr. f. Naturforsch.* 1947, 2b, 382—392.

KREBS, A.: Fluorochrome in der Strahlenbiologie. *Die Naturwiss.* 1947, 34, 59.

RIEHM, E.: *Plasmodiophoraceae*. *Hdb. d. Pflkrankh.* 1928, 2. Bd., 1. Teil, 354 u. f. . . , Berlin, Verlag Parey.

SAMUEL, G. und S. D. GARRETT: The infected root-hair count estimating the activity of *Plasmodiophora brassicae* Woron. in the soil. *Ann. Appl. Biol.* 1945, 32, 96—101.

STRUGGER, S.: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die Speicherung und Wanderung des Fluoresceinkaliums in pflanzlichen Geweben. *Flora* 1937, 132, (32), 253—304.

STRUGGER, S.: Die fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung lebender und toter Zellen mit Hilfe der Akridinorange-Färbung. *Dtsch. tierärztl. Wochenschrift* 1941, 49, 525—527.

STRUGGER, S.: Untersuchungen über die vitale Fluorochromierung der Hefezelle. *Flora* 1944, 137, (37), 73—94.

STRUGGER, S.: Vitalfluorochromierung des Protoplasmas. *Die Naturwiss.* 1947, 34, 267—273.

STRUGGER, S.: Fluoreszenzmikroskopie und Mikrobiologie. 1949, 79 u. f. . . , Hannover, Verlag M. & H. Schaper.

WALLHÄUSER, K. H.: Untersuchungen über das antagonistische Verhalten von Mikroorganismen am natürlichen Standort. *Arch. f. Mikrobiol.* 1951, 16, 237—251.

Reisen und Tagungen

Zweites Symposium über Viruskrankheiten der Obstbäume in Europa vom 23 bis 27. August 1955 in Wageningen (Holland)

Am 2. Symposium über Viruskrankheiten der Obstbäume in Europa nahmen Wissenschaftler aus folgenden Ländern teil: Holland, Bundesrepublik Deutschland und DDR, Norwegen, Dänemark, Schweiz, Frankreich, Italien, Jugoslawien, Canada, USA, Neuseeland, Ekuador und Nigeria.

Die Tagung wurde nach dem im Vorjahr, während des 1. Symposiums über Obstvirosen in Wädenswil (Schweiz) gefaßten Beschluß in Wageningen durchgeführt und vom Instituut voor Plantenziektenkundig

Onderzoek (IPO) und dem Plantenziektenkundige Dienst (PD) gemeinsam veranstaltet. Von den während des Symposiums erstatteten Referaten seien die folgenden hervorgehoben:

DR. A. F. POSNETTE, East Malling, England: The leaf roll virus disease of sweet cherry.

Das Krankheitsbild dieser bisher nicht beschriebenen Süßkirschen-Virose erinnert an Befall durch *Armillaria* oder *Pseudomonas morsprunorum*. Die Blätter rollen sich nach oben ein, sind spröde und bei der besonders anfälligen Sorte „Early Rivers“ purpurrot gefärbt. Im Frühjahr erfolgt zögernd und spärlich die Blatt- und Blütenentwicklung. Bei Übertragung auf F 12/1-Unterlage kommt es zu Nekrosenbildung und Gummifluß an der Okulationsstelle.