

# Das Phasenkontrastverfahren als Hilfe bei der Untersuchung und Determination phytoparasitärer Nematoden

Von Rudolf DERN, Pflanzenschutzamt Frankfurt a. M.

[Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) 19. 1967, 106–109]

Die Schwierigkeiten bei der Untersuchung und Determination der verschiedenen Nematodenarten sind jedem Nematologen bekannt. Viele Artmerkmale können nur bei Anwendung eines guten, stark vergrößernden Öl-immersionsobjektives erkannt und unterschieden werden. Viele Strukturen sind bei normaler Hellfeldbeleuchtung nur dann sichtbar, wenn entweder sehr helles Licht, schräge Beleuchtung (Reliefbeleuchtung) oder zur Kontrasterhöhung absichtlich vorgenommene „extrafokale“ Einstellungen (auf eine höhere oder tiefere Einstellenebene) eingesetzt werden. In vielen Fällen aber können fast unsichtbare Strukturen bei Phasenkontrastbeleuchtung deutlich und scharf abgebildet werden.

Literatur über die Anwendung der Phasenkontrastmikroskopie in der Nematologie ist außerordentlich verstreut. Oft finden sich in den einzelnen Arbeiten nur in Erklärungen zu abgebildeten Mikroaufnahmen kurze Hinweise, daß diese Aufnahmen bei Phasenkontrastbeleuchtung aufgenommen wurden. Ein Teil der Mikroaufnahmen ist im Druck schlecht wiedergegeben, so daß diese Aufnahmen allein keine Empfehlung für die Anwendung des Phasenkontrastverfahrens darstellen. Goodey (1963), der sich mit der Phasenkontrastmikroskopie befaßt hat, erwähnt, daß diese gelegentlich bei der Nematodenuntersuchung von Vorteil ist, gibt jedoch keine konkreten Beispiele an. Cairns (1957) hält die Anwendungsmöglichkeiten des Phasenkontrastverfahrens für sehr begrenzt, da schon der Körperdurchmesser eines dünnen Nematoden zu dick sei, um gute Resultate damit zu erzielen. Lediglich isolierte Zellen und dünne Cuticulastrukturen sieht er als geeignete Objekte an. Über gute Erfahrungen haben Stefanopoulos, Ovazza und Bessis (1949) bei der Untersuchung von Cuticulastrukturen einiger Blut-fadenwürmer (Mikrofilarien) berichtet. Sie erkannten bei Phasenkontrast – sowohl bei lebenden als auch bei fixierten Tieren – Strukturen, die mit den klassischen Methoden nicht sichtbar gemacht werden konnten. Auch die bemerkenswerte Klarheit der Konturen wird hervorgehoben im Vergleich zu der oft angewandten schiefen Beleuchtung oder Reliefbeleuchtung (méthode de l'ombrage), die wesentlich verschwommener Konturen liefert. McFadzean und Smiles (1956) haben die Larvenentwicklung der Mikrofilarie *Litomosoides carinii* untersucht und empfehlen die Phasenkontrastmikroskopie als wertvolle Hilfe bei dem Studium der Entwicklung von Nematodenlarven. Beobachtungen im Hellfeld wurden durch solche im Phasenkontrast ergänzt, wodurch die visuellen Befunde „erhärtert“ werden konnten. Auch der Vorteil der Phasenkontrastbeleuchtung bei der Mikrophotographie wird hervorgehoben. Die Verfasser haben auch Säugetiereier, die normalerweise zu dick für die Anwendung des Phasenkontrastes sind, zwischen Objektträger und Deckglas eingeklemmt und dadurch abgeflacht, so daß sie dann die feinsten Strukturen erkennen konnten. Sehr gute Resultate erzielten auch Nath und Singh (1956) bei der Untersuchung reifer Spermien und der Spermienbildung von *Ascaris suilla* und *Porrocaecum angusticollis*, wie die guten, nicht retuschierten Mikroaufnahmen bei Phasenkontrastbeleuchtung beweisen. Die Beobachtung, daß auch das Muster der Zysten-schale von

*Heterodera fici* im Phasenkontrast runzelig und sehr plastisch zu sehen ist, wird von Goffart (1961) erwähnt und durch eine Mikroaufnahme veranschaulicht. Scherney (1957) schreibt, daß bei der Phasenkontrastbeleuchtung die Punktierung der Zystenoberfläche bei *Heterodera rostochiensis*, *H. schachtii* und *H. avenae* besonders klar erkennbar ist (vgl. Abb. 1). Er verwendet die Punktierung als zusätzliche Bestimmungshilfe, da auf einer bestimmten Fläche die Anzahl der Punkte innerhalb der einzelnen Arten annähernd konstant ist. Außerdem ist die Hofbildung um die Punkte artcharakteristisch.

Hier sollen einige Beispiele zeigen, welche Ergebnisse bei Phasenkontrast leicht zu erzielen sind.

Bei Anwendung des Phasenkontrastverfahrens ist die Qualität der Abbildung in vielen Fällen vom Brechungsindex des verwendeten Einschlußmittels abhängig. In unseren Versuchsreihen wurden daher die in der Nematologie meist gebräuchlichen Einschlußmittel Leitungswasser, Glycerin, Milchsäure, außerdem Berlesgemisch und das Einschlußmittel W 15 (für Objekte aus wäbrigem Milieu) der Fa. Carl Zeiss geprüft. Bei der Betrachtung von *Heterodera*-, *Meloidogyne*-, *Longidorus*-, *Xiphinema*-, *Pratylenchus*-, *Rotylenchus*- und *Aphelenchoides*-Arten erhielten wir mit allen genannten Einschlußmitteln sehr gute Phasenkontrastbilder.

Besonders erwähnenswert ist die Feststellung, daß bei Phasenkontrastbeleuchtung bereits mit dem Spezialobjektiv 40 x in vielen Fällen Feinheiten deutlich werden, die ohne Phasenkontrast erst bei Verwendung einer Olimmersion 100 x erkennbar sind. Die z. T. empfohlenen Färbungen der Nematoden mit Baumwollblau (Franklin 1962) und anderen Farbstoffen können fortfallen. Das Zeichnen und Photographieren der Phasenkontrastbilder ist wesentlich leichter als im Hellfeld. Außerdem ist das Mikroskopieren nicht so anstrengend für die Augen, da sehr helles Licht, wie es z. B. bei der Zählung von Lippenringen oder Seitenlinien oder zum Auffinden der Phasmidien erforderlich ist, bei Phasenkontrastbeleuchtung nicht auftritt. Das Erkennen der Lippenringe und Seitenlinien ist leider hierbei ebenso schwierig wie im Hellfeld. Begrenzungen von Mundstachellängen, z. B. bei *Xiphinema*, die besonders bei ungeeigneter Fixierung der Nematoden in Glycerinpräparaten häufig schwer erkennbar sind, werden im Phasenkontrast oft wieder sehr deutlich meßbar. Dies gilt auch für Stachelführungsringe und für dünne, durchsichtige Kopf- und Schwanzanhänge. So kann z. B. im Hellfeld das Erkennen der Schwanzzipfel von *Aphelenchoides ritzemabosi* schwierig sein, während sie bei Phasenkontrast sehr deutlich und mit scharfen Konturen sichtbar sind. Auch die genaue Form der Spicula, die z. B. für die Artbestimmung von *Aphelenchoides* festgestellt werden muß, läßt sich nach unseren Erfahrungen bei keiner anderen Beleuchtung so präzise erkennen. Dies gilt auch für die Feststellung der Ringelung des Schwanzendes von *Pratylenchus*-Arten.

Wenn auch auf die Hellfeldbeobachtung mit ihren verschiedenen Variationen nicht verzichtet werden kann, so stellt doch das Phasenkontrastverfahren auch in der Phytonematologie eine wertvolle Hilfe und wichtige Ergänzung dar. – Sicher würde von vielen



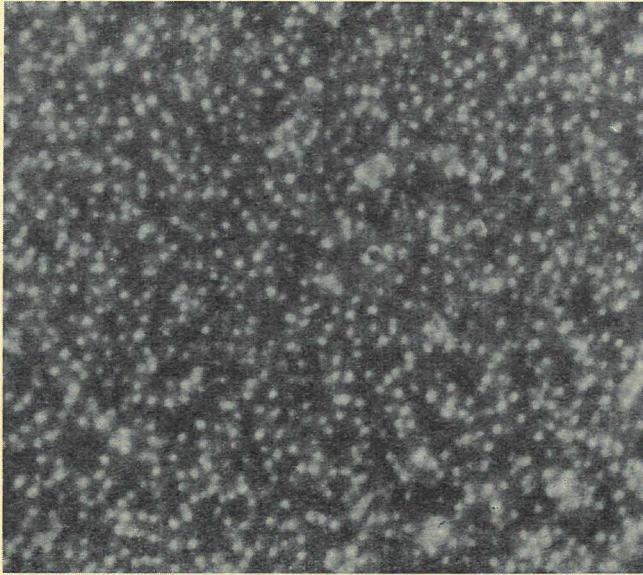


Abb. 1. *Heterodera avenae*. Punktierung der Oberfläche einer Zyste. Phasenkontrast.

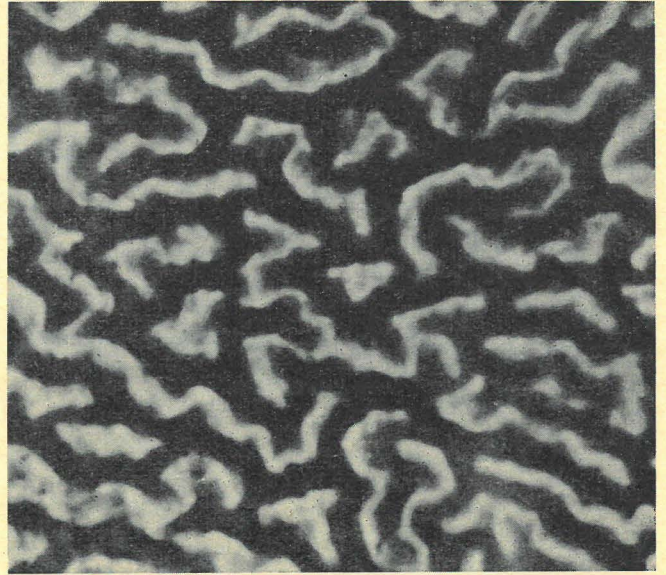


Abb. 2. *Heterodera avenae*. Zickzackmuster bis Wellenmuster der Zyste (tiefer gelegene Schicht). Gleicher Bildausschnitt wie Abb. 1. Phasenkontrast.

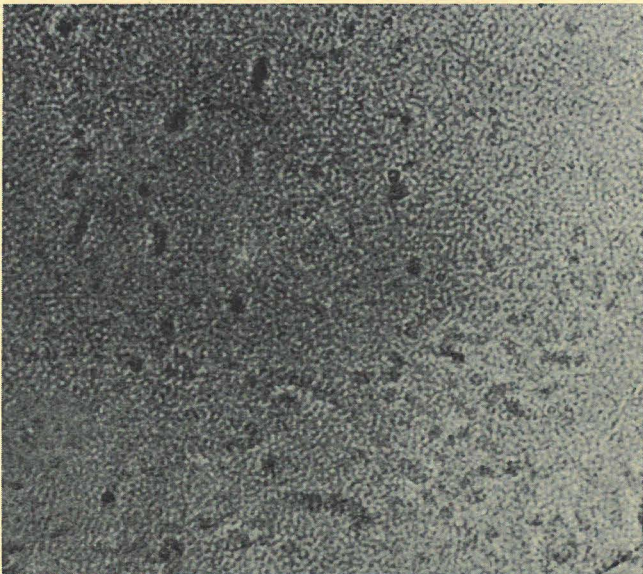


Abb. 3. *Heterodera avenae*. Junge, noch weiße Zystenschale. Punktierter Oberfläche. Hellfeld bei extrafokaler Einstellung.

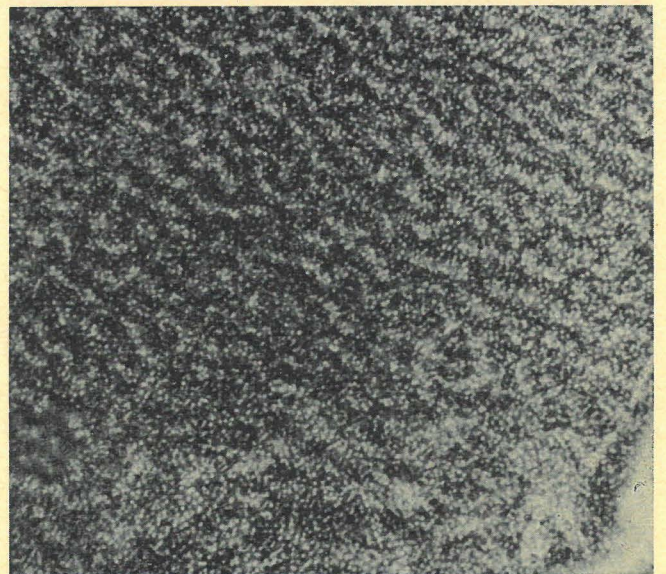


Abb. 4. Gleicher Bildausschnitt wie Abb. 3 bei Phasenkontrast.

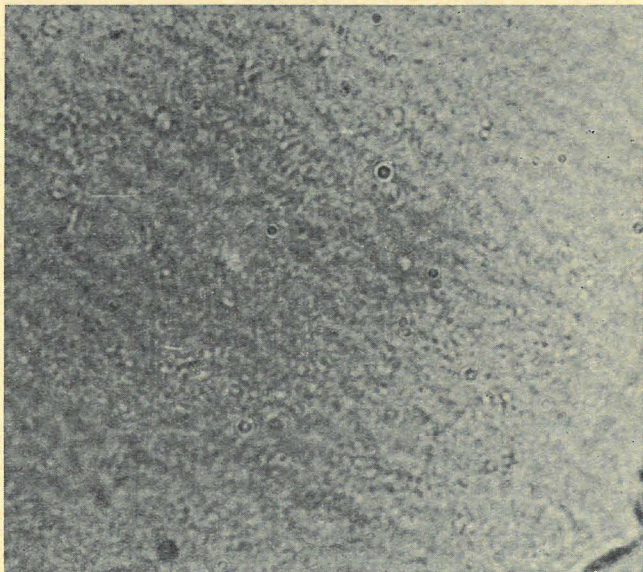


Abb. 5. Gleicher Bildausschnitt wie Abb. 3, jedoch tiefere Schicht mit schwach erkennbarem Zickzackmuster. Hellfeld.

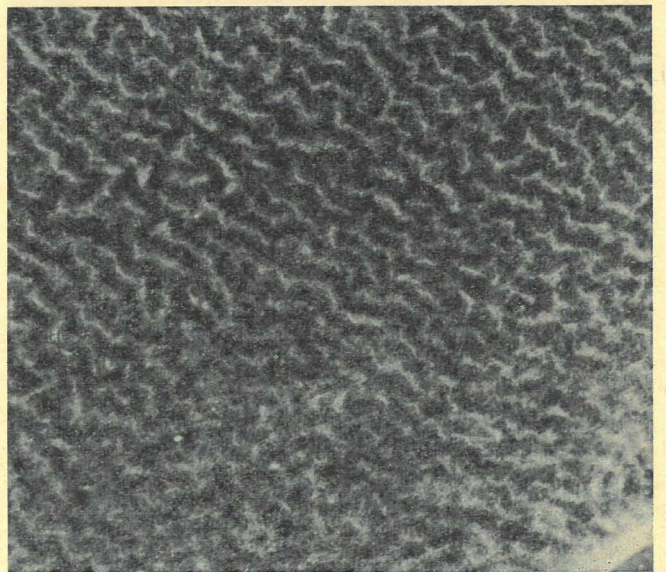


Abb. 6. Wie Abb. 5, jedoch Phasenkontrast.



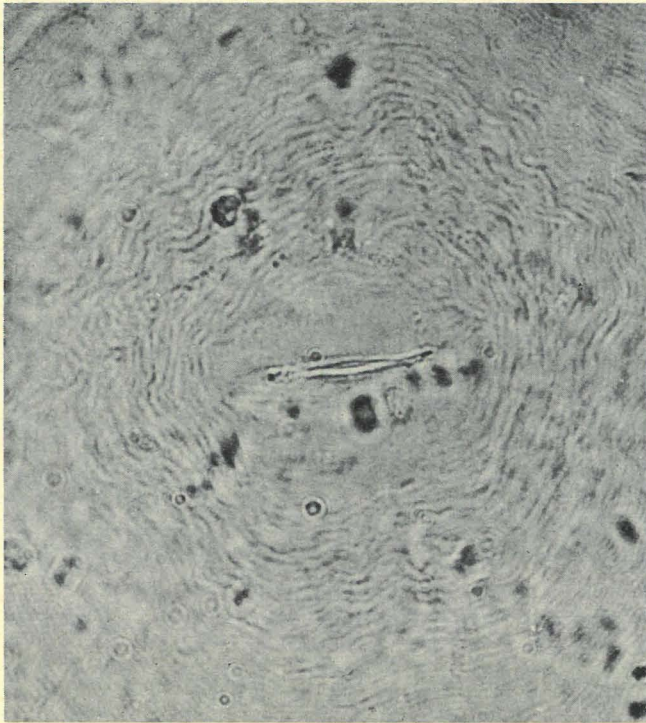


Abb. 7. *Meloidogyne* sp. Perinealstruktur. Hellfeld (extrafokale Einstellung der Bildebene).

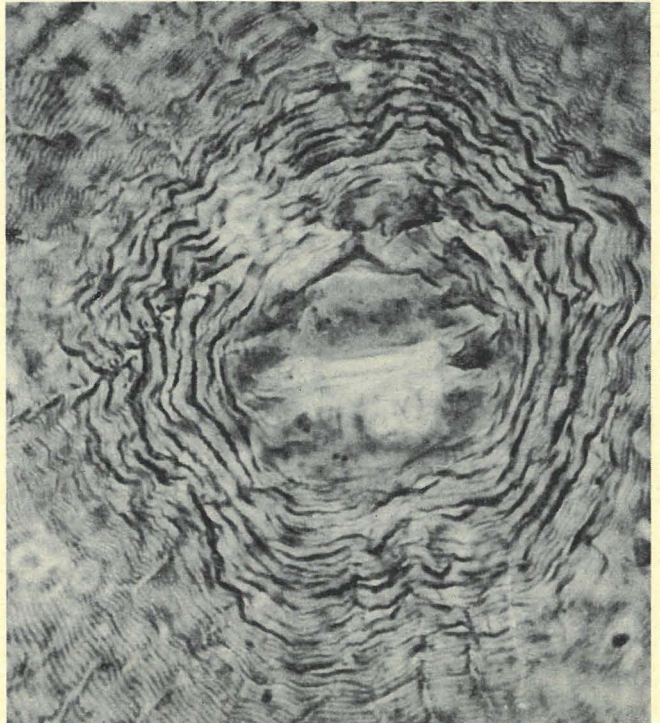


Abb. 8. Wie Abb. 7, jedoch Phasenkontrast.

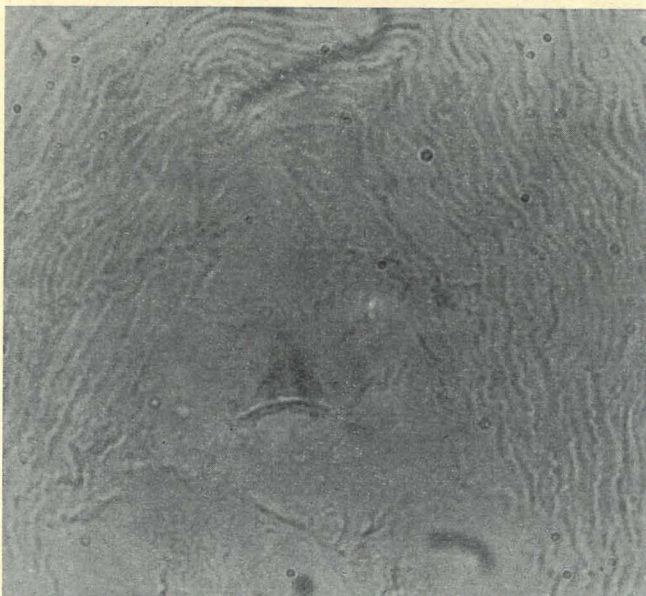


Abb. 9. *Meloidogyne* sp. Perinealstruktur (Ausschnitt). Hellfeld.

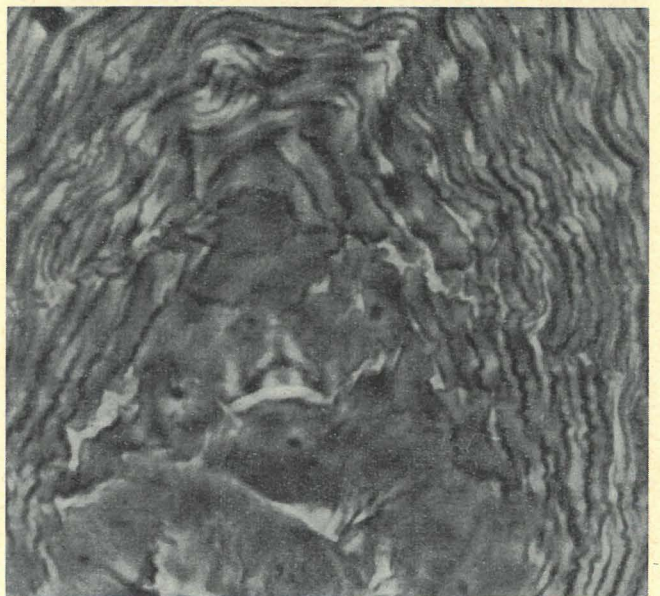


Abb. 10. Wie Abb. 9, jedoch Phasenkontrast. (Abb. 1-10: Phot. R. Dern).

Nematologen sehr begrüßt, wenn alle Beispiele für eine wirklich nutzbringende Anwendung des Phasenkontrastverfahrens in der Phytonematologie zusammengestellt werden könnten. Mit dem vorliegenden Beitrag wurde versucht, hiermit einen wenn auch nur bescheidenen Anfang zu machen.

#### Technische Daten zu den Mikroaufnahmen

Alle Aufnahmen wurden auf Agfa IF 17 DIN (40 ASA) Film aufgenommen. Aufnahmen Abb. 1, 2, 9 und 10 mit Zeiss-Phasenkontrast-Neofluar 100/1,30 Öl. Aufnahmen Abb. 3-8 mit Zeiss-Phasenkontrast Neofluar 40/0,75 unter Anwendung des Phasenkontrastkondensators VZ (für Hellfeld-, Phasenkontrast- und Dunkelfeldbeobachtungen) mit Interferenz-Breitbandfilter grün (546  $\mu$ ).

Keine Aufnahme wurde retuschiert.

#### Zusammenfassung

Es werden einige Beispiele für die Anwendung des Phasenkontrastverfahrens in der Nematologie gegeben. Kontrastreiche Strukturen bei Phasenkontrastbeleuchtung erleichtern die Anfertigung von Zeichnungen und Mikroaufnahmen bei Arten der Gattungen *Heterodera*, *Meloidogyne*, *Longidorus*, *Xiphinema*, *Rotylenchus*, *Pratylenchus* und *Aphelenchoides*. Auch Messungen und Artbestimmungen werden dadurch leichter. Viele Feinstrukturen sind auch ohne Anfärbung und oft schon bei mittleren Vergrößerungen deutlich sichtbar.

Lippenringe, Seitenlinien, Phasmidien und andere schwer erkennbare Unterscheidungsmerkmale freilebender Nematoden können mit Phasenkontrastbeleuchtung ebenfalls erkannt, aber z. T. auch nicht besser



als bei Hellfeldbeleuchtung gesehen werden. Zweifellos stellt das Phasenkontrastverfahren für die Untersuchung und Determination von Nematoden eine wertvolle Ergänzung dar.

### Summary

Some examples are given for applicability of phase-contrast in nematology. A good contrast structure by phase-contrast illumination facilitates determination, measurements, drawings and photomicrographs of *Heterodera*, *Meloidogyne*, *Longidorus*, *Xiphinema*, *Rotylenchus*, *Pratylenchus* and *Aphelelenchoides*. Many microstructures are evident without staining with cotton-blue or any other staining agents and are often visible under lower magnifications.

The annules of the lip region, incisures of the lateral field, phasmids, and other characteristics of free living nematodes which are difficult to determinate can be seen by phase-contrast, but sometimes not better than in bright field.

The phase-contrast method is doubtless a valuable supplement for investigation and determination of nematodes.

### Literatur

1. Bennett, A. H., Jupnik, H., Osterberg, H., and Richards, O. W.: Phase microscopy. Principles and applications. New York and London 1951. 319 pp.
2. Cairns, E. J.: Specialized microscopy for the study of nematodes. In: Proceedings of the S-19 Workshop in Nematology, 1957, "Micro" 1-16.
3. Cairns, E. J., in: Nematology, ed. by J. N. Sasser and W. R. Jenkins. Chapel Hill, N. C. 1960, p. 56.
4. Franklin, Mary T.: Preparation of posterior cuticular patterns of *Meloidogyne* spp. for identification. *Nematologica* 7. 1962, 336-337.
5. Goffart, H.: Bemerkungen zu einigen Arten der Gattung *Meloidogyne*. *Nematologica* 2. 1957, 177-184.
6. -, -: Die taxonomische Bewertung morphologisch-anatomischer Merkmale bei den Zysten der Gattung *Heterodera*

(*Nematoda*). Mitt. Biol. Bundesanst. Berlin-Dahlem 99. 1960, 24-51.

7. -, -: Über *Heterodera fici* Kirjanova 1954. *Zeitschr. Pflanzenkrankh.* 68. 1961, 597-599.
8. Goodey, J. B.: Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. 4. ed. London 1963, p. 35-36 u. 52. (Techn. Bull. Ministry Agric., Fish. and Food 2).
9. Haselmann, H.: Beiträge zur Phasenkontrast-Mikroskopie: 1. Praktische Methodik und kritische Betrachtungen. *Mikroskopie* (Wien) 5. 1950, 214-224.
10. -, -: 20 Jahre Phasenkontrast-Mikroskopie. Historischer Rückblick und aktuelle Sonderfragen. *Ztschr. wiss. Mikrosk.* 63. 1957, 140-155.
11. Keuning, F. J.: Das Phasenkontrastverfahren in der Mikroskopie. Theoretische Grundlagen und praktische Auswertung. *Mikroskopie* 5. 1950, 49-61.
12. McFadzean, J. A., and Smiles, J.: Studies of *Litomosoides carinii* by phase-contrast microscopy: the development of the larvae. *J. Helminthol.* 30. 1956, 25-32.
13. Michel, K.: Phasenkontrast. *Zeiss-Mitteilungen* 1. 1959, 243-268.
14. Nath, V., and Singh, S.: The nematode sperm. *Res. Bull. Punjab Univ. Hoshiarpur* 91. 1956, 121-134.
15. Scherney, F.: Morphologische und histologische Untersuchungen an *Heterodera*-Arten. *Zeitschr. Pflanzenkrankh.* 64. 1957, 131-139.
16. Stefanopoulo, G. J., Ovazza, M., et Bessis, M.: Utilisation du microscope à contraste de phase et de la méthode de l'ombrage en parasitologie. Application à l'étude de quelques microfilaires sanguicoles. *Compt. rend. Soc. Biol. Paris* 143. 1949, 767-768.
17. Taylor, A. L., Dropkin, V. H., and Martin, G. C.: Perineal patterns of root-knot nematodes. *Phytopathology* 45. 1955, 26-34.
18. Taylor, A. E. R., and Smiles, J.: A study of microfilariæ (*Loa loa* and *Dirofilaria immitis*) by phase-contrast and ultra-violet microscopy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 49. 1955, 303.

Eingegangen am 1. Februar 1967.

## MITTEILUNGEN

### Kranzniederlegung am Grabe Otto Appels

In dankbarer Erinnerung beging der Deutsche Pflanzenschutz den 100. Geburtstag seines Altmeisters

Präsident a. D. Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. Dr. h. c. Dr. h. c.  
Dr. h. c. Otto Appel.

Am 19. Mai 1967 wurden mit einem stillen Gedenken an seinem Grabe auf dem Dahlemer Friedhof Kränze der Biologischen Bundesanstalt und der Vereinigung deutscher Pflanzenärzte e. V. von einigen Kollegen niedergelegt.

Sein Name ist in der Geschichte der Phytomedizin unter den großen Phytopathologen verzeichnet. Die Verdienste von Otto Appel um den Deutschen Pflanzenschutz sind unvergänglich, und seine Werke werden sich auch weiterhin in der Entwicklung unseres Forschungsgebietes fruchtbringend auswirken.

### Neues Institut für Samenpathologie

In Kopenhagen wurde ein Institut für Samenpathologie eröffnet, das hauptsächlich für die Entwicklungsländer arbeiten soll (Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries). Zu seinem Direktor wurde der bekannte Mykologe Paul Neergaard ernannt. Das Institut soll Gesundheitsprüfungen von Saatgut durchführen sowie Forschungen über bodenbürtige bzw. mit dem Saatgut übertragbare Krankheiten wichtiger landwirtschaftlicher Kulturpflanzen der Entwicklungsländer betreiben. Untersuchung eingesandter Saatgutproben aus diesen Gebieten ist vorgesehen. Die Ergebnisse sollen von Zeit zu Zeit zu Übersichten verarbeitet werden, die u. a. die geographische Verbreitung bodenbürtiger Krankheiten, den Infektionsgrad ihrer Erreger in den Entwicklungsländern und die Häufigkeit solcher Krankheiten an den Kulturpflanzensorten der betreffenden

