

derelbischen Anbaugesamt eine ausreichende Bekämpfung des Schorfes nicht möglich gewesen.

Im Ausschuß wurde nun auch eine Kontrolle besprochen, die zusammen mit der Polizei durchgeführt worden ist. Schlagartig wurden während der Kurzvorblütenspritzung der Äpfel die Ortsausschüsse und die Polizeiposten benachrichtigt und angewiesen, aus den laufenden Spritzen Proben zu nehmen und diese der Obstbauversuchsanstalt Jork zur Untersuchung einzuschicken. Die Ortsausschüsse waren vorher mit leeren Bierflaschen für diese Probenahme versehen worden. Am gleichen Tage wurde dann bei 12 laufenden Spritzen je etwa  $\frac{1}{2}$  l Spritzbrühe aus dem Tank entnommen und dem chemischen Laboratorium der Obstbauversuchsanstalt Jork eingesandt. Das Ergebnis wird in vorstehender Tabelle mitgeteilt.

Wir sehen, die Bauern hatten nur Nirit oder Fuclasin für die Spritzung verwandt. Die Folge war, daß auch keinerlei ernstliche Bienenschäden eintraten.

Die stärksten und gefährlichsten Sporenflüge in diesem Jahr traten dann erst in der Zeit vom 13. bis 18. Mai und später nochmals in den Tagen vom 20. bis 25. Mai ein. Leider war die Zeitspanne bis zur

ersten Nachblütenspritzung noch zu groß, und es hätte eine weitere Spritzung mit bienenungefährlichen Mitteln in die volle Apfelblüte noch größere Sicherheit in diesem für die Schorfentwicklung so günstigen Jahr bringen können, eine Maßnahme, die, wie der Verfasser sich auf seinen Reisen in den letzten Jahren überzeugen konnte, in ausländischen Obstanbaugesamten als absolut notwendig angesehen und ohne Bedenken mit bienenungefährlichen Mitteln auch durchgeführt wird. Wie die letzte Sitzung des Bienenausschusses ergab, würden gegen diese Maßnahme von seiten aller Beteiligten im nächsten Jahr auch bei uns keine Bedenken bestehen.

Es kann also die Einsetzung der Ausschüsse zur Vermeidung von Bienenschäden in Zusammenhang mit der Steuerung der Spritzung und laufenden Kontrolle der ausgespritzten Flüssigkeiten, wie wir gesehen haben, endlich den Weg frei machen, die so dringend notwendige Spritzung in die Blüte der Obstbaupraxis zu ermöglichen, ein Ziel, das der Verfasser bereits in seinen ersten Veröffentlichungen zur Bekämpfung des Fusidiums als notwendig erachtete, und dessen Richtigkeit sich in diesem Jahr wieder bestätigt hat.

## Die künstliche Infektion mit dem Kartoffel- und Rübennematoden und die Färbung der Parasiten in situ

Von Arved H. Meyl

(Aus dem Zool. Institut der Techn. Hochschule Braunschweig. Direktor: Prof. Dr. C. R. Boettger.)

Zur weiteren Erforschung der Biologie unserer beiden wichtigsten parasitischen Nematoden an Rübem und Kartoffeln während des ganzen Jahres, aber auch zur schnellen und weitgehend sicheren Feststellung der Zugehörigkeit einer Pflanze zum Wirtsspektrum des betr. Nematoden, soll eine Methodik kurz beschrieben werden, bei der sich die Vorteile der Agarplattenkultur mit jener der Lactophenol-Färbung nach G o o d e y und F r a n k l i n (5) (6) verbinden. Bei Untersuchungen über Einwanderungszeiten, relative Häufigkeit, Lokalisation der Larven usw. ist das Ziel aller Versuchsanordnungen, eine möglichst große Gleichartigkeit der Parallelversuche hinsichtlich des Substrates, der Temperatur- und Lichtfaktoren, der Äquivalenz der Infektionspflanzen selbst und ähnlicher Faktoren zu erreichen. Ist diese Forderung bei den üblichen Topfanzuchten schon kaum erfüllbar, so kommt noch hinzu, daß unkontrollierbare synergistische oder antagonistische Einflüsse (z. B. die Wirkung von Enchytraeiden und räuberischen Nematoden auf Heteroderenlarven oder die parasitärer Pilze!) einwandfreies Ergebnis in Frage stellen können, das aber gerade bei der Feststellung gradueller Anfälligkeit unumgänglich nötig erscheint.

Andererseits sollen die vielleicht in größeren Reihen angesetzten Infektionsversuche auch zu jedem Zeitpunkt und in jeder Phase der Infektion rasch fixierbar und zahlenmäßig sicher auswertbar sein. Hierzu eignet sich in besonderem Maße die Lactophenol-Säurefuchsin- (oder Baumwollblau-) Färbung nach G o o d e y. Unabhängig von der künstlichen Infektion auf Agarplatten, kann diese Färbung aber auch überall dort angewendet werden, wo ein sicherer und schneller Nachweis für in irgendwelche Pflanzenteile eingewanderte Nematoden zu führen ist.

### Die künstliche Infektion

Als Substrat dient eine Nährlösung üblicher Zusammensetzung (also etwa 0,5% KCl, 0,5% Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0,5% NaHPO<sub>4</sub>, 0,25% MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O, Fe<sub>2</sub>Cl<sub>6</sub> in Spuren) in 10%iger Verdünnung, in der 1,5—2% Stangenagar

gequollen und aufgekocht werden. Es empfiehlt sich, zur Klärung den heißen Agar durch Glaswatte zu filtern und jeweils eine größere Menge des Ansatzes auf mehrere 100 ccm-Erlenmeyerkolben zu verteilen, die mit Watte steril verschlossen, im Bedarfsfall schnell verflüssigt werden können. Während bei Infektionsversuchen von Kartoffeln (z. B. zur Prüfung von Sortenanfälligkeit) der flüssige Agaransatz in die vorher sterilisierten Petrischalen (dünnes und weißes Glas!) in 2—3 mm Dicke als Platte gegossen wird, gießt man für die Infektion von Sämlingspflanzen ebensolche Platten in 100 ccm-Erlenmeyerkolben, die mit Watte verschlossen, danach nochmals kurz sterilisiert werden. Es erscheint leider unmöglich, in allen vorkommenden Fällen die für die binokulare Betrachtung viel bequemeren Petrischalen zu verwenden, da die an den Deckel anstoßenden Pflanzenteile im Kondenswasser bald zu faulen beginnen. Da sich aber die Untersuchung des Wurzelnetzes auch in Petrischalen von der Unterseite als günstiger erwiesen hat, steht einer Verwendung der Kolben und ihrer Beobachtung im Binokular nichts im Wege.

Im Gegensatz zu Berliner und Busch (2) halte ich es für praktischer, die Augensetzlinge von Kartoffeln nicht erst auf einfachem Agar anzuziehen, um sie dann auf Nähragarplatten zu übertragen, sondern sie in 5—10 cm hohen, mit Glas bedeckten Glasschalen in aqua dest. die ersten Wurzeln treiben zu lassen. Dazu werden, um eine übermäßig starke Wurzelbildung zu vermeiden, 1,5 × 1,5 cm große und 0,5—0,7 cm dicke Augenstücke herausgeschnitten, 20 Minuten in 0,125% Naßbeize (Germisan o. ä.) gebeizt und anschließend in aqua dest. gewaschen und hierauf in die oben beschriebene Glasschale gesetzt. Diese Anzucht kann weitgehend steril erfolgen. Nach einer ersten Bewurzelung werden die Stücke auf die Nähragarplatten übertragen. Sollten nach einiger Zeit durch das Nachfüllen von aqua dest. oder durch das von Zeit zu Zeit nötige Kürzen der Geiltriebe Pilze eingeschleppt werden, so ist doch meist die Infektion schon abgeschlossen, und die Pilzkolonien stören bei

unterseitiger Betrachtung der Petrischalen kaum. — Umständlicher gestaltet sich die Anzucht von Sämlingspflanzen. Will man wegen gewisser Versuchsbedingungen nicht gleich die im Naßbeizverfahren mit nachfolgender mehrmaliger (!) Nachwäsche in aqua dest. gebeizten Samen selbst in die Erlenmeyerkolben einbringen, so empfiehlt sich folgende Vorbehandlung: Man keimt die gebeizten Samen auf sterilem Filtrierpapier an, wählt die geeigneten aus und zieht sie bis zur Entfaltung der Keimblätter in Hydrokultur (z. B. in Esmarschälchen) weiter. Nährlösungen in Quarzsand oder auf Filtrierpapier sind insofern wenig geeignet, weil die feinen Saugwurzeln die Sand- oder Papierteilchen umwachsen, sich die Wurzeln dann kaum ablösen lassen und die Durchsichtigkeit bei der Untersuchung beeinträchtigt wird. Die bewurzelten Keimpflanzen werden auf die Agarplatte des Erlenmeyerkolbens gebracht, wo sie in kurzer Zeit festwachsen. Sowohl bei Kultur in Petrischalen als auch in Erlenmeyerkolben ist dafür Sorge zu tragen, daß alles verdunstete Wasser wieder durch aqua dest. (mit Hilfe einer sterilen Pipette) ersetzt wird. Die so präparierten Petrischalen können trotz evtl. Auftretens von Schwärzepilzen usw. bis zur Bildung von Dauerzysten voll zur Untersuchung herangezogen werden. In einem Falle wurden noch nach acht Wochen sich neubildende Wurzeln durch freie Larven, die jetzt erst einwanderten, infiziert, nachdem sich bereits lange vorher zahlreiche Zysten gebildet hatten. — Sehr viel kürzer sind natürlich die Samenpflanzen haltbar, doch genügt wohl in allen Fällen die Lebensdauer für die Invasion der Larven, die dann färberisch oder im Binokular nachgewiesen werden können.

Um auch im Infektionsmaterial eine weitgehende Qualitätsgleichheit zu erzielen, werden möglichst gleich alte Zysten nach Prüfung auf äußerliche Gesundheit (Farbe, Form, evtl. Verpilzung) einzeln mehrmals in aqua dest. gewaschen und ebenfalls einzeln in einem Tropfen aqua dest. auf dem Objektträger mit einem sterilen Glasstab vorsichtig aufgedrückt. Anders als bei Berliner und Busch und Reinmuth (2) (3), halte ich es für notwendig, daß sich in jedem Tropfen der Inhalt von nur einer Zyste befinden sollte, einmal um Vergleiche über die Qualität des Infektionsmaterials anstellen zu können (Menge der noch vorhandenen Eier und Larven, ihr gegenseitiges Verhältnis, Agilität der Larven), und zweitens um den infektiösen Inhalt nicht mit verpilztem oder sonstwie unbrauchbarem zu vermischen. Wie schon Berliner und Busch und Reinmuth gezeigt haben, erfolgt eine Infektion nur mit freien Larven außerhalb der Zystenhülle. Je nach den Versuchsbedingungen werden nun die von Eiern und Hülle gesonderten, beim Rüben-nematoden meist sofort agilen Larven in Wassertropfen auf die Agarplatten pipettiert, was sich hinsichtlich der Sterilerhaltung und der Fixierung bestimmter Infektionsmengen gegenüber der bisherigen Abtupfmethode mit dem Wattebausch als vorteilhafter erwiesen hat. — Als eine gewisse Schwierigkeit tritt lediglich die Abdunkelung der Agarplatte im Erlenmeyerkolben durch schwarzes Papier auf, da hierdurch die Entwicklung der Keimpflänzchen nicht gehemmt werden soll. Die Petrischalen können ohne weiteres in eine Dunkelkammer gestellt werden.

### Die Färbung

Während die mikroskopische Untersuchung der z. T. beträchtlichen Wurzellängen mehrerer Pflanzen oder auch die zahlreicher Blätter wegen der geringen Lichtbrechungsdifferenz zwischen Nematodenkörper und Pflanzengewebe erhebliche Mühe macht und sehr viel Zeit in Anspruch nimmt, ergibt die Färbung in situ eine schnelle Übersicht über den Umfang der Infektion und daneben die Sicherheit, daß auch jede noch so ver-

steckte Larve erfaßt wird. — Die Herstellung des Reagens erfolgt nach der Amannschen Formel, wobei 20 g Phenolkristalle in 20 g aqua dest. aufgelöst werden und mit 20 g Milchsäure (spez. Gewicht 1,31) und 40 g Glyzerin (spez. Gew. 1,25) vermischt werden. Zu dieser Lösung gibt man 0,05 bis 0,1 % Säurefuchsin oder Baumwollblau. Diese so angesetzte Farbe kann längere Zeit aufbewahrt und mehrmals benützt werden.

Man kann praktisch jedes pflanzliche Material färben, gleich ob es sich um frische oder getrocknete Blätter, ganze Wurzelnetze oder um Stengelteile handelt. Blätter von *Chrysanthemum* z. B. werden, um die Alchen in situ zu erhalten, deshalb vorher nicht eingeweicht. Die Lactophenolfarbe wird in einem Becherglas im Wasserbad zum Kochen gebracht, und in dies kochende Färbegrad taucht man etwa 3—6 Min. je nach der Dicke des Materials die zu färbenden Stücke, die anschließend auch noch während des Abkühlens des Färbegades in diesem verbleiben. Nach etwa 30 Minuten bis 1 Stunde werden die gefärbten Pflanzenteile herausgenommen, im fließenden Wasser abgewaschen, und, indem man sie gegen das Licht hält, auf ihre Färbungsintensität hin untersucht. Zeigen sich bei dicken Blattstücken z. B. noch ungefärbte Flecken, muß nachgefärbt werden. Ist die gewünschte Farbdurchdringung erreicht, wird gewaschen und in 50 %igen Alkohol überführt, der die Farbe wieder aus den pflanzlichen Geweben extrahiert, wogegen die Nematoden erst nach längerer Alkoholeinwirkung entfärbt werden. Wurde stark überfärbt, kann anstelle des kalten auch heißer 50 %iger Alkohol verwendet werden. — Meist wird der Färb- und Fixierungsgang bis zu diesem Punkt vollauf genügen, um alle erforderlichen Infektionsdaten festlegen zu können. Bei sehr dicken Blättern, wie älteren Chrysanthemenblättern, ist jedoch eine Aufhellung mit flüssigem Phenol sehr vorteilhaft. Etwa eine Stunde bleiben dicke Blätter in diesem Agens, wobei meist noch überflüssiges Chlorophyll extrahiert wird. Die Herstellung von Dauerpräparaten kann nach Passage der Alkoholreihe in Euparal vorgenommen werden. Diese Färbemethode kann mit gleichem Erfolg auch bei der Untersuchung von Ribesblättern, Farnwedeln, Lilienblättern usw. in der Praxis zur Feststellung von Nematodenbefall Verwendung finden. In dem speziellen Fall der Agarplatten-Methode wird das vorsichtig aus dem Agar herausgelöste Wurzelnetz (auch mit evtl. noch anhaftenden Agarstücken) in das kochende Lactophenol-Färbegrad getaucht. Nach kurzer Differenzierung im Alkohol können die einzelnen Wurzellängen auf dem Objektträger ausgelegt und unter dem Binokular untersucht werden.

### Zusammenfassung

Die künstliche Infektion von Augensetzlingen der Kartoffel mit Rüben- und Kartoffelälchen auf Agarplatten nach Berliner und Busch wurde in einigen Phasen der Methodik abgeändert und auf die Anzucht und Infektion von Sämlingen ausgedehnt. Zur schnellen Untersuchung der Ergebnisse während der verschiedenen Einwanderungsstadien im Hinblick auf Reihenversuche wurde die Lactophenol-Säurefuchsin-Färbung nach Goodey und Franklin mit der Agarplatten-Methode verbunden und in einem der Praxis angepaßten, verkürzten Arbeitsgang dargestellt.

### Literatur

1. Hilgermann und Weibenberg, Nematodenzüchtung auf Agarplatten. Centralbl. f. Bakt., Band 80, S. 467—472, 1917.
2. Berliner, E., und Busch, K., Über die Züchtung des Rüben-nematoden *Herterodera schachtii* Schm. auf Agar. Biol. Zentralbl. Band 34, 1914, 349.
3. Reinmuth, E., Der Kartoffelnematode, Beiträge zur

Biologie und Bekämpfung, Zeitschr. Pflanzenkrankh. 39, S. 241—276, 1929.

4. Buhner, E., Technique for the beheading and en face examination of nematodes and similar animal types. Proc. helm. Soc. 16, Nr. 1, 1949.

5. Franklin, M., A quick method of demonstrating nematodes of the genus *Aphelenchoides* in leaves. Journal of Helm. 23, S. 91—93, 1949.

6. Goodey, T., Two methods for staining nematodes in plant tissues. Journal of Helm. 15, S. 137—144, 1937.

## Normen für Pflanzenschutzmittel

Von H. Zeumer und W. Fischer

(Aus den Mittelprüfstellen der Biologischen Bundesanstalt Braunschweig und der Biologischen Zentralanstalt Berlin-Dahlem)

(3. Fortsetzung)

### 8. Fluor-Streuköder

Begriff: Präparate, die Kleie als Köder und Natriumfluorid oder Natrium- bzw. Bariumsilicofluorid als Wirkstoff enthalten.

#### a) Natriumfluorid-Präparate

Anforderungen:

1. Der Gehalt an Natriumfluorid muß  $12 \pm 2\%$  betragen.
2. Der Rest des Präparates muß aus Kleie bestehen.
3. Der Wirkstoff muß der Kleie anhaften und gleichmäßig im Präparat verteilt sein.
4. Das Präparat muß deutlich blau oder violett gefärbt sein. Der Farbstoff muß wasserlöslich sein.

Anwendung:

gegen Rübenaskäfer, Erdraupen und Maulwurfgrillen. 25 kg je ha mit gleicher Menge Wasser durchfeuchten und breitwürfig ausstreuen.

Methoden zur Prüfung auf Normenfestigkeit.

Zu 1) Bestimmung des NaF-Gehaltes.

8,00 g Präparat werden mit 250,0 ccm Wasser etwa 1 Stunde unter häufigem Umschütteln kalt ausgezogen. Nach dem Absetzen der Hauptmenge der Kleie filtriert man durch ein trockenes Faltenfilter, bis etwas mehr als die Hälfte durchgelaufen ist. 125,0 ccm Filtrat werden auf etwa 25 ccm eingedampft. Nach dem Erkalten werden 20 g NaCl und 5 ccm 20%ige Ammoniumrhodanidlösung hinzugefügt, mit gestellter FeCl<sub>3</sub>-Lösung auf hellgelb titriert und nach Zugabe von 20 ccm Amylalkohol oder je 10 ccm Äther und Alkohol unter lebhaftem Umschütteln bis zur bleibenden Rotfärbung der oberen Schicht zu Ende titriert. Verbrauch = a ccm.

#### Herstellung und Einstellung der FeCl<sub>3</sub>-Lösung

15 g FeCl<sub>3</sub> werden in Wasser gelöst und auf 500 ccm aufgefüllt. 0,500 g NaF werden in 25 ccm Wasser gelöst, 20 g NaCl und 5 ccm 20%ige Ammoniumrhodanid-Lösung hinzugefügt und mit FeCl<sub>3</sub>-Lösung bis zur schwachen Gelbfärbung titriert. Nach Zugabe von 20 ccm Amylalkohol oder von je 10 ccm Alkohol und Äther wird unter lebhaftem Umschütteln bis zur bleibenden Rotfärbung der oberen Schicht zu Ende titriert. Verbrauch = b ccm.

Berechnung:  $\text{Gehalt an NaF} = \frac{a \cdot 12,5}{b} \%$

Zu 3) Die Prüfung auf gleichmäßige Verteilung des Wirkstoffes im Präparat wird vorgenommen, indem man wenigstens 3 NaF-Analysen aus verschiedenen Schichten der Packung — wie unter 1) beschrieben — durchführt. Die Einzelwerte jeder Bestimmung dürfen höchstens um 2 Gehaltsprozent von dem gefundenen Mittelwert abweichen.

#### b) Natrium- und Bariumsilicofluorid-Präparate

Anforderungen:

1. Der Gehalt an Natrium- bzw. Bariumsilicofluorid muß  $12 \pm 3\%$  betragen.
2. Der Rest des Präparates muß aus Kleie bestehen.

3. Der Wirkstoff muß der Kleie anhaften und gleichmäßig im Präparat verteilt sein.

4. Das Präparat muß deutlich blau oder violett gefärbt sein. Der Farbstoff muß wasserlöslich sein.

Anwendung:

gegen Rübenaskäfer, Wiesenschnakenlarven, Erdraupen und Maulwurfgrillen. 25 kg je ha mit gleicher Menge Wasser durchfeuchten und breitwürfig ausstreuen.

Methoden zur Prüfung auf Normenfestigkeit.

Zu 1) Bestimmung des Natrium- bzw. Bariumsilicofluorid-Gehaltes.

2,00 g des Präparates werden in etwa 400 ccm Wasser dauernd in schwachem Sieden gehalten und mit n/1 NaOH (Indikator Phenolrot) titriert, bis der Umschlagsfarbton nach Zusatz der letzten 5 Tropfen NaOH 2 Minuten lang bestehen bleibt.

Verbrauch = c ccm.

Berechnung:

Gehalt an Natriumsilicofluorid =  $c \cdot 2,35\%$

Gehalt an Bariumsilicofluorid =  $c \cdot 3,49\%$

Zu 3) Die Prüfung auf gleichmäßige Verteilung des Wirkstoffes im Präparat wird — wie bei 8a) zu 3) beschrieben — vorgenommen.

### 9. Metaldehyd-Streuköder

Begriff: Präparate, die Metaldehyd als Wirkstoff und Kleie als Trägerstoff enthalten.

Anforderungen:

1. Der Gehalt an Metaldehyd muß, nach der unten angegebenen Vorschrift bestimmt,  $6 \pm 0,5\%$  betragen.
2. Der restliche Bestandteil des Präparates muß aus Kleie bestehen.
3. Der Wirkstoff muß der Kleie anhaften und im Präparat gleichmäßig verteilt sein.

Anwendung:

zur Bekämpfung von Schnecken im Freiland; ausstreuen oder in Häufchen auslegen.

Methoden zur Prüfung auf Normenfestigkeit.

Zu 1) Bestimmung des Gehaltes an Metaldehyd<sup>1)</sup>

Reagentien: n/2 HCl

n/1 NaOH

10%iges Hydroxylaminchlorhydrat:

10 g Hydroxylaminchlorhydrat gelöst in 100 ccm H<sub>2</sub>O, vorsichtig neutralisiert mit n/1 NaOH. Indikator: 0,04%iges Bromkresolgrün; 0,4 g Bromkresolgrün und 6 ccm n/10 NaOH gelöst in 1000 ccm 20%igem Alkohol.

Methode:

15—18 g Präparat (Einwaage a Gramm) werden in einem 500-ccm-Rundkolben mit genau 300 ccm Alkohol  $\frac{1}{2}$  Stunde am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt.

<sup>1)</sup> Nach eigenen Versuchen abgeänderte Methode aus „Specifications and Methods of Analysis for certain Insecticides and Fungicides“. Technical Bulletin No. 1, Ministry of Agriculture and Fisheries 1949.