

Zeitschrift: Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz = Matériaux pour la flore cryptogamique suisse = Contributi per lo studio della flora crittogama svizzera

Herausgeber: Schweizerische Naturforschende Gesellschaft

Band: 9 (1939)

Heft: 1

Artikel: Über die Biologie von Flechtenbildnern

Autor: Thomas, Eugen A.

Kapitel: 1: Methodik zur experimentellen Untersuchung von Flechtenbildnern

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-821072>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 02.04.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Kapitel I

Methodik zur experimentellen Untersuchung von Flechtenbildnern

A. Methodik zur experimentellen Untersuchung von Flechtenpilzen

1. Beschaffung des Materials

a) Jahreszeit und Standort.

Man war bisher geneigt anzunehmen, dass Flechtenpilzsporen, wenn sie nicht keimen, oder wenn sie nicht einmal ausgeschleudert werden, nicht reif genug seien und schrieb dies der Jahreszeit zu. Im Gegensatz zu W e r n e r (1927, S. 68) lieferten, wie aus Kap. II hervorgeht, Flechten aus verschiedenen Gegenden der Schweiz auch in den Monaten September—Dezember reichlich keimfähige Askosporen. Folgende Beobachtungen zeigen, dass die Keimfähigkeit der Sporen nicht nur von der Jahreszeit, sondern auch vom Standort abhängig ist.

Von zwei im September gesammelten *Collema*-flechten lieferte die an einem schattigen Waldbach gefundene zirka 90 % keimfähige Sporen. Die andere hatte an der Böschung einer in eine Wiese gegrabenen Steingrube gestanden; ihre Sporen trieben keine Keimschläuche.

Ferner gaben die Sporen einer im dichten, schattigen Walde gewachsenen *Peltigera canina* sehr gute Keimzahlen, während die Sporen eines gleichzeitig am Waldrand gesammelten Stückes nicht keimten.

Ursache für die Schädigung dürfte die stärkere Insolation sein; denn feuchte Apothezien von *Peltigeromyces horizontalis* (über die Benennung der Flechtenpilze vgl. Kapitel V, B, 3, e) verlieren bei Temperaturen von über 30° die Fähigkeit, Sporen zu schleudern. Die Sonne vermag von Regen oder Tau befeuchtete Apothezien so stark zu erwärmen.

Da die Flechtenpilzapothezien während mehreren Jahren keimfähige Sporen bilden, muss nach solchen schädlichen Temperatureinflüssen eine Regeneration möglich sein. Bei dem langsamen Wachstum der Flechtenpilze mögen dazu einige Wochen oder Monate nötig sein. Allgemein beobachtet man, dass die ersten nach der sommerlichen Störung auf-

trehenden Sporen nicht keimfähig sind. Das wären die bei über 30° im Apothezium getöteten Sporen, die den jungen, neue Sporen bildenden Aszi Platz machen müssen.

b) Witterung.

Es scheint ungünstig, das Material nach andauernden Regenfällen zu sammeln. Die Sporenabgabe alter und junger Apothezien war dann spärlich, weil sie offenbar durch die Feuchtigkeit bereits die Hauptmenge der Sporen ausgeschleudert hatten.

c) Dauer der Keimfähigkeit bei trockenem Material.

Man hat beobachtet, dass Flechtenpilzsporen von ihrer Keimfähigkeit kaum etwas einbüßen, wenn die Apothezien einige Zeit der Trockenheit ausgesetzt blieben. W e r n e r (1927, S. 11) erhielt nach zwei Monaten noch keimfähige Sporen, wenn er die Flechten im Laboratorium kühl aufbewahrte.

Ein Nachweis anhaltender Keimkraft von Sporen gelang für *Caliciomyces hyperelli*. Herr Dr. O. J a a g hatte das *Calicium* im Juli 1934 gesammelt und mir freundlicherweise ein Stück davon zur Untersuchung überlassen. Nach einem achtmonatigen Aufenthalt der Flechte in trockener, zeitweise über 24° warmer Laboratoriumsluft keimten noch über 80 % der Sporen.

2. Sporenschleudern der Aszi

a) Schleuderhöhen.

Zur Beobachtung der Flughöhen der Sporen einiger Flechtenpilze wurden in eine gedeckte Glasschale mit feuchtem Fliesspapier unter einen schräggestellten Objektträger drei Längsreihen gleicher Apothezien gelegt. Auf dem Objektträger befand sich eine Skala über die Entfernung von den Apothezien; nach zwei Tagen beobachtete ich die Sporen unter dem Mikroskop.

Bei *Peltigeromyces horizontalis* flog die Hauptmasse der Sporen 1—7 mm hoch. Bei diesen geringen Abständen lagen die Sporen enger beisammen, weil hier die schräggeschleuderten Sporen weniger seitlich fliegen konnten infolge der durch den kleineren Abstand kleineren Flugbahn. Die maximale Schleuderhöhe der Aszi beträgt 16 mm; nur vereinzelte Sporen fliegen so hoch. *Peltigeromyces aphthosae* schleuderte seine Sporen bis 8 mm hoch, *Peltigeromyces venosae* bis 24 mm, *Lobariomyces pulmonariae* bis 31 mm und *Physciomyces pulverulentae* bis 23 mm.

Xanthoriomyces parietinae schleuderte die Hauptmasse der Sporen 1—9 mm hoch, vereinzelte bis 17 mm (vgl. auch B a r t u s c h 1931, S. 134).

b) Einfluss der Feuchtigkeit auf das Ausschleudern.

Flechtenpilze brauchen zum Ausschleudern der Askosporen Feuchtigkeit. W e r n e r (1927, S. 12) und B a r t u s c h (1931) nehmen an, dass die Sporen durch langsames Eintrocknen der Apothezien ausgepresst würden, bzw. dass überschüssige Feuchtigkeit die Ejakulation verzögere (wie Z i e g e n s p e c k, 1926, S. 342).

In den Versuchen dieser Arbeit war jedoch oft die Sporenausschleuderung bei nassen, sogar in einem Wassertröpfchen liegenden Apothezien zu beobachten und nie eine hemmende Wirkung von überschüssiger Feuchtigkeit (übereinstimmend mit F a l k, 1923, S. 93 u. S. 104—105).

c) Einfluss der Befeuchtungszeit auf das Ausschleudern.

Im Dezember gesammelte Apothezien von *Peltigeromyces horizontalis* zeigten 5 Stunden nach der Befeuchtung reichliche Sporenejakulation. Zur Prüfung der Keimfähigkeit wurden die ausgeschleuderten Sporen in feuchter Atmosphäre bei 18° aufbewahrt, welche Massnahme auch für die folgenden Beobachtungszeiten gilt. Nach 19- und 33stündiger Befeuchtung nahm die Menge ausgeschleuderter Sporen kaum ab, erheblich aber nach 57 Stunden. Nach 71stündigem Verbleiben in der Feuchtigkeit war die Mehrzahl der ausgeschleuderten Sporen schon äusserlich als unreif zu bezeichnen, was sich durch die grössere Durchsichtigkeit und die schlecht ausgebildete Septierung zu erkennen gab. Bis zu 95 Stunden vermochte das Apothezium nur noch wenige und unreife Sporen zu schleudern.

Die Keimproben ergaben, dass schon die zwischen 19 und 33 Stunden nach Versuchsbeginn ausgeschleuderten Sporen stark verminderte Keimfähigkeit aufwiesen, nämlich zirka 30 % gegenüber zirka 65 % der nach 5 Stunden geschleuderten. Von den zwischen 33 und 57 Stunden geschleuderten Sporen trieben nur noch vereinzelte Keimschläuche. Nach 57 Stunden oder später ausgeschleuderte Sporen keimten nicht.

Wenn auch die Zahlen je nach dem Zustand des verwendeten Materials etwas schwanken mögen, so geht für *Peltigeromyces horizontalis* daraus hervor :

1. Mit zunehmender Zeit nimmt die Sporenschleuderfähigkeit feuchter Apothezien ab.
2. Mit zunehmender Zeit nimmt die Keimfähigkeit der von feuchten Apothezien geschleuderten Sporen ab.

d) Einfluss der Temperatur auf das Ausschleudern.

Zur Prüfung dieser Frage gelangten in Petrischalen auf feuchtem Fliesspapier Apothezien von *Peltigeromyces horizontalis* und *Xanthoromyces parietinae* zu den Temperaturen 3°, 6°, 9° usw. bis 36°; die geschleuderten Sporen wurden im hängenden Tropfen aufgefangen.

Zwischen 3° und 27° hatte die Temperatur kaum einen Einfluss. Bei 30° schleuderten die Pilze nur vereinzelte Sporen, *Peltigeromyces* mehr als *Xanthoriomyces*, bei 33° und 36° keine. Die einer Temperatur von 33° oder 36° ausgesetzten Apothezien schleuderten nachher auch bei Zimmertemperatur keine Sporen mehr.

3. Einfluss der Temperatur auf das Keimen der Sporen

Bei Zimmertemperatur während fünf Stunden ausgeschleuderte Sporen von *Xanthoriomyces parietinae* wurden im hängenden Tropfen Nährlösung zu Temperaturen von 3°, 6°, 9° usw. bis 36° gebracht. Um weniger abhängig von der Beschaffenheit des Sporenmaterials zu sein, befanden sich bei jeder Temperatur Sporen aus verschiedenen Apothezien. Die Ergebnisse nach 2, 3, 4, 4½ und 6 Tagen sind in Abb. 1 dargestellt.

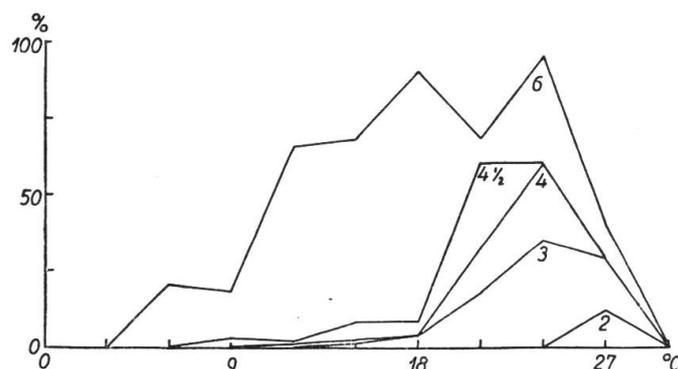


Abb. 1

Abhängigkeit der Sporenkeimung von der Temperatur bei *Xanthoriomyces parietinae* (L.). Die %-Zahlen bedeuten keimende Sporen nach 2, 3, 4, 4½ und 6 Tagen.

Bei 30° und bei höheren Temperaturen keimten die Sporen nicht. Der vorher körnige Inhalt erschien glasig. Auch bei Zimmertemperatur waren die Sporen nachher keimunfähig; die Temperatur von 30° hatte sie getötet. Bei 27° keimten die Sporen zuerst. Es war aber ein erzwungenes Keimen, denn die Sporen erreichten die maximale Keimzahl nicht und die nur kurzen Keimschläuche starben bald ab. Bei 24° war die Keimzahl nach wenigen Tagen maximal und die Keimschläuche blieben lebenskräftig. Bei 21° trat eine Störung des Versuchs auf. Bis hinunter zu 12° war die Keimfähigkeit der Sporen gut. Mit zunehmender Zeit fanden wir auch bei tieferen Temperaturen zunehmende Keimungszahlen.

Bei Temperaturen von 15—21° waren Sporen, die aus beiden Zellen keimten, häufiger als bei 24° und bei 27°; ebenso wiesen jene, wenn sie einmal gekeimt hatten, mehr Verzweigungen und ein regeres Wachstum auf. Spätere Temperaturversuche mit dem Pilz bestätigten, dass

die günstigste Wachstumstemperatur des Pilzes etwas tiefer liegt als die günstigste Keimtemperatur der Sporen (Abb. 21 bis 23). Die Temperaturspanne des günstigsten Wachstums liegt wie die der günstigsten Keimung zwischen 12° und 24°, wobei die höheren Temperaturen für die Keimung besser sind.

Für *Peltigeromyces horizontalis* fand ich ein Keimungsoptimum von 18°. Temperaturen von 24° und mehr zerstörten die Sporen, was an ihrer Deformation und an der Unfähigkeit zu keimen kenntlich war.

Für das Anlegen von Reinkulturen sind nach diesen Versuchen tiefere Temperaturen günstiger, als W e r n e r (1927, S. 12) angibt.

4. Erzielung von Reinkulturen

a) Aus Askosporen nach der Petrischalenmethode: In den Deckel einer mit sterilem Malzagar gefüllten, umgekehrten Petrischale brachte ich Apothezien oder bei kleinfrüchtigen Formen ganze Thallusstücke, die ich vorher gründlich gewaschen hatte, ähnlich wie W e r n e r (1927, S. 12). Sie gelangten auf feuchte Holdermarkstücke, die so hoch waren, dass die ausgeschleuderten Sporen die über ihnen liegende Nährbodendecke erreichten, ohne den Nährboden zu berühren; sonst traten Infektionen ein. Nach einigen Stunden war die Aussaat vollzogen, und ich konnte die Apothezien herausnehmen oder unter eine noch nicht mit Sporen bestreute Agarfläche stellen. Nach 4—7 Tagen sah man auf der Platte mit Lupe oder schwacher mikroskopischer Vergrößerung einerseits Sporenhäufchen, normalerweise keimend, andererseits gediehen Bakterien, Hefen und unerwünschte Pilze. In einigen Fällen schleuderten die Apothezien auch reines Sporenmateriale und es entstanden keine Infektionen. Fast immer aber war es möglich, infektiionsfreie Stellen mit Flechtenpilzsporen zu finden. Die keimenden Sporen wurden in Reagensgläser übertragen.

Öfters änderte ich diese Methode so, dass ich die Petrischalen nicht umkehrte, sondern die befeuchteten Apothezien mit Vaseline in den Deckel klebte und die Sporen hinunterschleudern liess.

b) Aus Askosporen mittels Mikromanipulator: Die emporgeschleuderten Sporen fing ich im hängenden Tropfen auf, isolierte sie mit dem Mikromanipulator und wusch sie mit sterilem Wasser aus der Mikropipette. Dann übertrug ich je eine Spore in ein Reagensglas. Gegenüber der ersten Methode hat diese den Vorteil der absoluten Sauberkeit, aber den Nachteil, dass es bei dem langsamen Wachstum der Pilze einige Monate länger dauert, bis man über genügend Impfmateriale für Versuche verfügt. Einsporkulturen von Flechten-

pilzen können aber bei Syntheseversuchen wertvoll sein im Hinblick auf die Frage der Heterothallie.

c) Aus keimenden Askosporen mittels Mikromanipulator: Wie vorher gewann ich Sporen im hängenden Tropfen, wartete aber bis sie Keimschläuche aussandten und isolierte nur keimende Sporen. Diese Methode hat den Vorteil, dass man keine toten Sporen isoliert; aber an den Keimschläuchen haften gelegentlich Bakterien, die mit der Mikropipette nicht wegzuwaschen sind. Man wird die Methode nur verwenden, wenn die Prozentzahl keimfähiger Sporen sehr klein ist, was durch vorhergehende Keimversuche zu prüfen ist.

d) Aus Soredien: Man streut etwas feinsten Soredienstaub über die Malzagschicht einer Petrischale und beobachtet nach 7—14 Tagen. Einzelne Soredien werden frei sein von fremden Pilzen und Bakterien. Auf dem günstigen Nährboden trennen sich Pilz und Alge aus ihrem Verband, und durch sorgfältiges Abimpfen kann man Reinkulturen von beiden erhalten. Von der Alge lassen sich dann leicht Einzelkulturen herstellen. Diese Methode kommt nur in Frage, wenn keine Askosporen zur Verfügung stehen. Besser ist auch dann das folgende Verfahren.

e) Aus Hyphenstücken mittels Mikromanipulator: Man zerdrückt ein Stück Thallus oder Soredien zu einem Brei, gibt Wasser dazu und bringt einen Tropfen davon in die feuchte Kammer des Mikromanipulators. Mit der Mikropipette isoliert man möglichst kleine, aber doch lebensfähige Hyphenstücke und überträgt sie in Reagensgläser. Günstig sind Stücke mit Verzweigungen oder Stücke, die mit einer toten Algenzelle in Verbindung stehen. Diese Methode ist besonders wertvoll für Flechten, die nur steril bekannt sind. Man kann auf diese Weise den Pilz kultivieren und durch den Vergleich mit anderen Flechtenpilzkulturen vielleicht etwas über seine Verwandtschaft aussagen (*Lepraria*, *Dufourea*, *Thamnolia*, *Letharia arenaria*, *Psoroma* [= *Crocynia* ?] *lanuginosum* usw.).

5. Verwendete Kulturmedien

a) Wachstum der Keimschläuche in Erdlösung.

Unter dem Mikroskop wurde bei einem hängenden Tropfen von Erdlösung (Herstellung vgl. c) eine günstige Stelle auf dem Deckglas mit Tusche umrahmt und an verschiedenen Tagen die gleiche Spore bei Zimmertemperatur beobachtet und gezeichnet.

Bei *Cladoniomyces pyxidatae* zeigte die beobachtete Spore nach 2 Tagen einen Keimschlauch, doppelt so lang wie die Spore selbst. Nach 6 Tagen hatte dieser Keimschlauch sich auf das sechsfache verlängert

und eine Abzweigung gebildet; auf der anderen Seite der Spore war ebenfalls ein Keimschlauch ausgewachsen. Die nach 9 Tagen verlängerten Keimschläuche wiesen weitere Verzweigungen auf. Der Inhalt der Spore mit sechs grösseren, ölartigen Tröpfchen schien unverändert. Zwischen dem 9. und 13. Tage verschwanden die Öltröpfchen; an ihrer Stelle blieben nur einige Pünktchen. Die Hyphen waren weiter ausgewachsen und wiesen jetzt erstmals Querwände auf.

Anders wuchsen die Keimschläuche von *Xanthoriomyces parietinae*. Nach 3 Tagen waren zwei Keimschläuche von der Länge der Spore vorhanden. Schon nach dem dritten Tage hatte der eine Querwände gebildet. Weitere Querwände und auch Verzweigungen traten nach 6 Tagen auf. Bei diesen Sporen nahm der Zellinhalt von Anfang an ab; es wurden aber auch sehr früh Querwände gebildet. Im Gegensatz zu den Hyphen von *Cladoniomyces* stellten die Hyphenenden von *Xanthoriomyces* plötzlich ihr Wachstum ein und der Pilz wuchs durch eine Verzweigung weiter.

Als Kuriosum sei das Auffinden dreizelliger Sporen von *Xanthoriomyces parietinae* erwähnt, die aus allen drei Zellen keimten.

Die mauerförmigen Sporen von *Collematomyces* keimten aus mehreren Zellen, wobei auch die Reservestoffe nichtkeimender Zellen verschwanden, so dass die Spore schliesslich leer erschien.

Bei den spindelförmigen, vierzelligen Sporen von *Peltigeromyces* vermochten nur die zwei endständigen Zellen zu keimen, die auch hier die Reservestoffe der übrigen Zellen verbrauchten. Als merkwürdige Erscheinung sei erwähnt, dass ein Teil der Keimschläuche der *Peltigeromyces*sporen rundliche Verdickungen bildete, aus denen der Pilz weiterwuchs.

b) Wachstum der Keimschläuche in andern Medien.

Über die Keimung der Flechtenpilzsporen in der Natur ist wenig bekannt. Versuchsweise könnte man die Sporen an einem für die betreffende Flechte günstigen Standort ausschleudern lassen und während Monaten in ihrer Entwicklung beobachten, was zu Einblicken in die natürliche Flechtensynthese führen dürfte. Beobachtungen des Wachstums von Keimschläuchen im Laboratorium haben aber insofern eine Bedeutung, als die Form der jungen Hyphen bereits Schlüsse gestattet, ob der Pilz in einem bestimmten Medium günstig ernährt ist. Das ist für die Flechtenpilze wertvoll wegen ihres langsamen Wachstums.

Als Versuchsobjekt für vergleichende Versuche mit destilliertem Wasser, Erdlösung, Knopagar und 4%igem Malzagar diente *Physciomyces stellaris*. In destilliertem Wasser wachsen die Keimschläuche lang aus, ohne sich oft zu verzweigen. Anastomosenbildungen zwischen den

Keimschläuchen verschiedener Sporen waren häufig, ein Zeichen schlechter Ernährung. In Erdlösung wachsen die Keimschläuche ebenfalls lang und schlank, bilden aber weniger Querwände und weniger Anastomosen. Schönes Wachstum zeigte sich auf 1,5%igen Knopagarböden. Querwände und Verzweigungen sind gut ausgebildet. 4%ige Malzagarböden zwingen den Pilz zu anderem Wachstum. Die Keimschläuche sind kurz und dick. Ihr Inhalt ist körnig, die Querwände deutlich; sie scheinen überernährt. Selbst die Spore nimmt Nährstoffe auf, wird dicker und quillt auf.

c) Zusammensetzung geprüfter Kulturmedien.

Sämtliche bis heute in Kultur gezogenen Flechtenpilze wachsen auf allen geprüften Nährböden sehr langsam. Der radiale Zuwachs der Kulturen beträgt monatlich oft nur einen Millimeter. Das erschwert das Arbeiten mit diesen eigenartigen Pilzen. Das Ziel des Prüfens folgender Nährböden war deshalb, einen Nährboden zu finden, auf dem die Flechtenpilze wesentlich besser wachsen.

W e r n e r (1927) verwendete an Zusammensetzungen hauptsächlich:

1. Glukose 1 % oder Malz 3 %, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,025 %, MgSO_4 0,025 %, KH_2PO_4 0,05 %, Fe_2Cl_6 0,00067 %, Agar 3 % (schwach sauer; nach W a r é n).
2. Glukose 2 %, MgSO_4 0,025 %, KH_2PO_4 , 0,05 %, CaCl_2 0,025 %, Fe_2Cl_6 Spuren (bei W e r n e r l. c, S. 12 dürfte hier ein Druckfehler vorliegen), Agar 3 %; dazu als Stickstoffquelle 0,5 % Pepton oder Asparagin oder NH_4NO_3 .

Für meine Kulturen geprüfte Nährböden :

1. Malzextrakt (Wander, Bern) 4 %, 2 %, 0,2 % in Lösung oder mit 3 % oder 1,5 % oder 1 % Agar.
2. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,1 %, KNO_3 0,025 %, KH_2PO_4 0,025 %, MgSO_4 0,025 %, FeCl_2 Spur (Knopsche Nährlösung), dazu 1,5 % Agar, ohne organische Nährstoffe, oder mit 1 % Pepton, oder mit 1 % Pepton und 2 % Glukose, oder mit 2 % Glukose.
3. KH_2PO_4 0,1 %, MgSO_4 0,025 %, Agar 1,5 %, Asparagin 1 %, Rohrzucker 10 % (Rohrzucker-Asparagin-Agar nach K r e b s, 1936, S. 76).
4. Erdlösungen und Erdagar : 1 Teil schwarze Waldhumuserde vom pH 4,3 mit 2 Teilen H_2O dest. 30 min. gekocht und dekantiert. Nach dem Kochen zeigte die Lösung noch ein pH von 4,0. Als Lösung oder mit 1,5 % Agar verwendet. Der Agarboden blieb nach dem dritten Mal Sterilisieren dickflüssig. Deshalb neutralisierte ich einen Teil der Lösung mit Na_2CO_3 , worauf der Boden mit 1,5 % Agar nach dem Erkalten erstarrte.

5. Salepgeleatine (nach Bernard, 1909) : 30 g Salep mit 1 l H₂O 24 Stunden kalt stehen lassen, dann im Autoklav 1 Stunde bei 120°. Das verlorene H₂O ersetzen. Am nächsten Tag die klare Flüssigkeit abgiessen und mit 12 % Gelatine und 0,2 % Agar (flüssig) versetzen.
6. Hefenagar : 3 % Bäckerhefe und 1,5 % Agar.
7. Flechtenagar : 10 % *Xanthoria parietina* und 1,5 % Agar.
8. Kartoffelmehlagar : 2,5 % Kartoffelmehl und 1,5 % Agar.
9. Hafermehlagar : 5 % Hafermehl und 1,5 % Agar.
10. Gerstenpflänzchen und Haferkeimlinge mit 3 % Agar sterilisiert.
11. Pflaumenagar : 100 g gedörrte Pflaumen in 1 l H₂O gekocht und dekantiert; Saft mit 2 % Agar.
12. Kartoffelsaftagar : Preßsaft von frischen Kartoffeln mit 4 Teilen H₂O und 2 % Agar.

Auf alle Nährböden impfte ich die drei Pilze *Xanthoriomyces parietinae*, *Cladoniomyces pyxidatae* und *Baeomycomyces rosei*. Im Verlauf einiger Monate zeigte es sich, dass diese Flechtenpilze den verschiedenen Nährböden gegenüber sich indifferent verhalten. In Farbe, Form und Grösse der Kulturen traten zwar Unterschiede auf, aber nur geringe. Bei *Baeomycomyces* fiel auf dem dickflüssigen Erdagar das verhältnismässig gute radiale Wachstum auf, allerdings auf Kosten der Kulturhöhe.

Es bestand also nach diesen Versuchen wenig Aussicht, die Flechtenpilze auf irgendeinem Nährboden zu dem für Pilze gewohnten schnellen Wachstum zu bringen. In Vorversuchen prüfte ich dennoch die Abhängigkeit des Wachstums von der Azidität.

6. Wachstum in Abhängigkeit von der Azidität

Diese Versuche sollen zeigen, ob eine gewisse Aziditätsstufe für das Wachstum von Flechtenpilzen ausnehmend günstig ist. Zur Verwendung kamen Pufferlösungen von Zitronensäure und Na₂HPO₄ nach Mc Ilvaine in Koltzoff (1926, S. 150).

Eine pH-Reihe von flüssigen Nährmedien zu verwenden, schien von vornherein nicht angebracht, weil alle eigenen Kulturversuche mit Flüssigkeiten wie die aus der Literatur bekannten nur negativ ausgefallen sind. Aber gepufferte Agarnährböden mit pH-Werten unter zirka 3,4 bleiben schon nach dem ersten Sterilisieren flüssig. Auch bei den Werten 3,4—5,2 tritt nach Sterilisieren keine richtige Erstarrung mehr ein, indem saure Böden von pH 3,4 dickflüssig erkalten, vom pH 4,0—4,6 in Reagensgläsern zwar schräge Oberflächen erhalten lassen, jedoch pastartig weich sind. Erst Böden mit pH 5,8 oder basischer erstarrten gut. Eine solche Reihe zu verwerten war zwecklos, weil

ausser dem veränderlichen Säuregrad die Konsistenz des Nährbodens veränderlich ist; andere Wege versprochen günstiger zu sein.

In Petrischalen wurden Gipsplättchen sterilisiert, zu denen ich im Impfkasten 2% ige, sterile Malzlösung und die entsprechenden sterilen Pufferlösungen aus Reagensgläsern zugoss. Nach dem Impfen mit Flechtenpilzen kamen die Petrischalen in grössere sterile Schalen, um die Infektionsgefahr zu verkleinern. Doch liess sich nicht verhindern, dass nach 5 Wochen zahlreiche Infektionen auftraten. Nach dieser kurzen Zeit war an den geimpften Myzelien kein messbares Wachstum zu sehen; die Flechtenpilze waren also nicht über ihr gewohnt langsames Wachstum hinausgekommen.

Schliesslich gelang es, eine Reihe steifer Agarnährböden zu erhalten mit pH-Werten von 2,2 bis 7,6. Hierzu wurden gesondert Reagensgläser mit 6 ccm Malzagar (2 % Malzextrakt, 3 % Agar) sterilisiert und die gleiche Zahl mit 2 ccm Puffer von pH 2,2; 2,8; 3,4; 4,0; 4,6; 5,2; 5,8; 6,4; 7,0; 7,6. Nach dem dritten Sterilisieren goss ich die heisse Pufferlösung steril in die heisse Malzagarlösung über. Jetzt erstarrten beim Abkühlen die Nährböden mit allen pH-Werten, für einen Versuch verwendbar. Infektionen kamen mit dieser Methode keine vor.

Bei diesem Vorversuch musste es genügen, je Pilz und obengenannte Säurestufe 3 Reagensgläser zu impfen mit 0,5—1 mm grossen Myzelstücken. Nach 14 Wochen beobachtete ich folgendes Wachstum :

a) *Xanthoriomyces parietinae* (Stamm 60) :

Bei pH 2,2—2,8 Durchmesser der Kulturen = 1,5 mm; bei pH 3,4 = 4,5 mm; bei pH 4,0—4,6 = 5 mm; bei pH 5,2—6,4 = 7 mm; bei pH 7,0—7,6 = 5 mm.

b) *Caloplacomycetes elegantis* (Stamm 65) :

Bei pH 2,2—3,4 = Stillstand oder unmessbares Wachstum; bei pH 4,0 = 2 mm; bei pH 4,6—6,4 = 4 mm; bei pH 7,0—7,6 = 3,5 mm. Bei pH 6,4—7,6 scheint die Parietinbildung optimal.

c) *Caloplacomycetes murorum* (Stamm 44) :

Durchwegs schlechtes Wachstum ohne offensichtliches Optimum. Besseres Wachstum im Parallelversuch ohne Puffer.

d) *Stereocaulomyces paschalis* (Stamm 26) :

Bei pH 2,2—3,4 = Stillstand; bei pH 4,0—4,6 = 2 mm; bei pH 5,2—6,4 = 5 mm; bei pH 7,0—7,6 = Stillstand.

e) *Cladoniomyces squamosae* (Stamm 34) :

Bei pH 2,2—5,2 = 2—4 mm; bei pH 5,8 = 5—6 mm; bei pH 6,4 bis 7,0 = 2 mm; bei pH 7,6 = Stillstand. Beim Optimum um 1 mm besseres Wachstum als im Parallelversuch ohne Puffer.

f) *Cladoniomyces digitatae* (Stamm 30) :

Bei pH 2,2—5,2 = 2—5 mm; bei pH 5,8 = 3 mm; bei pH 6,4 — Stillstand. Ohne deutliches Optimum; grösste Kulturen kaum grösser als ohne Puffer.

g) *Baeomycomyces byssoidis* (Stamm 27) :

Bei pH 2,2—4,6 = Stillstand oder geringes Wachstum; bei pH 5,2 bis 5,8 = 5—5,5 mm. Ohne Puffer = 8,5 mm.

h) *Icmadophilomyces ericetorum* (Stamm 17) :

Bei pH 2,2—4,6 = 1—3 mm; bei pH 5,2 = 3 mm; bei pH 5,8 = 2 mm; bei pH 6,4—7,6 = Stillstand bis geringes Wachstum. Optimales Wachstum 0,5 mm besser als im Parallelversuch ohne Puffer.

Diese Versuche zeigen, dass die geprüften Flechtenpilze sich auf Nährböden von verschiedener Azidität gleich anderen parasitischen Pilzen (vgl. Fischer und Gäumann, 1929, S. 103) nur wenig verschieden verhalten. Schwach saure Böden sind günstiger als extrem saure oder basische.

7. Systematische Charakterisierung der Kulturen

Von Interesse ist die genaue Beschreibung von Flechtenpilzen in Kultur einerseits für den Vergleich von Pilzen nahe verwandter Flechten untereinander. Zweifellos müssen sich hier Verwandtschaften zeigen; es besteht die Möglichkeit, dass die Pilze zweier verschiedener Flechten gleich sind, nur die Algen verschieden (vgl. Möller, 1887, S. 29). Andererseits ist es wertvoll, vergleichen zu können, wie weit sich Flechtenpilze in Kultur von nahe verwandten, nicht lichenisierten Pilzen unterscheiden.

Die Hauptschwierigkeit, artcharakteristische Merkmale für kultivierte Flechtenpilze festzulegen, beruht auf dem Umstand, dass es nicht gelungen ist, die Flechtenpilze zu einem nach wenigen Wochen oder Tagen messbaren Wachstum zu bringen. Weil das Wachstum langsam ist, sind für alle Versuche sehr lange Zeiträume nötig. Die langen Versuchszeiten vergrössern die Einwirkungsmöglichkeit störender Einflüsse wie Temperaturschwankungen, Belichtungsänderungen und besonders die Änderung in der Feuchtigkeit des Nährbodens. Es ist unmöglich, die Wattepfropfen aller Versuchsgläser gleich zu machen; deshalb verdunstet aus dem einen Glas mehr Feuchtigkeit als aus dem andern: der Nährboden vertrocknet mehr und gleichzeitig wird die Luftfeuchtigkeit im Versuchsglas geringer. Dadurch wächst der Pilz langsamer und bildet weniger Luftmyzel. Die Erkenntnis dieser Schwierigkeiten hielt mich nicht davon ab, mit Flechtenpilzen zu experimentieren, aber sie

zwingt oft zu Zurückhaltung in der Beurteilung der Versuchsergebnisse.

Flechtenpilze bildeten in Kultur bisher keine Askosporen und oft auch keine Nebenfruchtformen (vgl. W e r n e r , 1927, S. 67). Für die Charakterisierung in Kultur blieben somit zwei Möglichkeiten : 1. Wir untersuchten die Abhängigkeit des Pilzwachstums vom Nährboden; 2. wir untersuchten die Abhängigkeit des Pilzwachstums von der Temperatur.

W e r n e r (1924, 1925, 1927, 1934) hat für die Charakterisierung der kultivierten Flechtenpilze ausschliesslich die zweite Methode verwendet wie vor ihm M ö l l e r (1887). Es steht uns fern, den grundlegenden Wert der Arbeiten W e r n e r s für die Lichenologie zu bezweifeln. Im Laufe der Untersuchungen reiften jedoch Erkenntnisse, die eine Kritik erlauben : 1. Die von W e r n e r gemessenen Kulturen gehen von einer unbestimmten Anzahl beliebig über das Substrat verbreiteten Sporen aus. Anzahl und Ausbreitung der Sporen sind aber bei verschiedenen Versuchen nie gleich gross, und so ergeben sich für das Ausmessen einer Kultur Fehler, die um so grösser sind, je langsamer der Pilz wächst. Da die Flechtenpilze auf den bekannten Nährböden langsam wachsen, konnte ich diese Fehlerquelle nachweisen bei den Arten, für die neben Einzellkulturen auch die Petrischalenmethode zur Anwendung kam. Bei *Cladoniomyces pyxidatae* trat beispielsweise die braune Verfärbung der aus Petrischalen erhaltenen Kulturen fast um einen Monat früher ein, als bei den Einsporkulturen; ähnlich verhielt sich *Baeomycomyces*. 2. Der Autor gibt zu wenig genaue Angaben über die Temperaturen, bei denen er die Kulturen wachsen liess. 3. Damit die Zahlen verschiedener Pilze miteinander vergleichbar sind, muss man alle Pilze auf allen Nährböden nach gleichen Zeiten messen. Diesen Grundsatz konnte ich bei den Nährstoffversuchen durchführen; bei den Temperaturversuchen war es aus zeitlichen Gründen nicht möglich.

Die in den Nährstoffversuchen verwendeten Nährböden (Kapitel II) sind : 1. Malzagar. Er besteht aus 2 % Malzextrakt (Wander, Bern) und 1,5 % Agar in destilliertem Wasser. Die Zusammensetzung dieses Malzextraktes ist : Maltose 41 %, Dextrin 32 %, Albumosen und Peptone 7 %, Mineralsalze 1,5 %, Wasser 18 %. 2. Peptonagar. Darunter verstehe ich einen Nährboden mit 1 % Pepton (Peptonum siccum sine sale Siegfried) und 1,5 % Agar, gelöst in Knopscher Nährlösung. 3. Glukoseagar; Nährboden mit 2 % Glukose und 1,5 % Agar, gelöst in Knopscher Nährlösung. 4. Knopagar; Knopsche Nährlösung und 1,5 % Agar ohne Zusatz.

In 400 ccm-Erlenmeyerkolben füllte ich 150 ccm einer der flüssigen Agar-Nährlösungen, setzte Wattepfropfen auf und sterilisierte dreimal bei 98° im Dampftopf. Mit jedem zu prüfenden Pilz wurden je 2 Kolben

an je 5 Stellen beimpft. So entstanden von jedem Pilz auf jedem Nährboden 10 Kulturen, von denen ich den Durchmesser mass und den mittleren Fehler berechnete nach den Tabellen von Z ö l l e r (1925). Die Zahlen für die Kulturhöhen gelten nur für die drei höchsten Kulturen, von denen ich das Mittel nahm. Die Zahlen für die Kulturfarbe beziehen sich auf die Nummern im « Code universel des couleurs » von E. S é g u y (1936). Diese mindestens angenähert richtigen Farbzahlen dürften verständlicher sein als eine Farbenbezeichnung in Worten.

Während der ganzen Versuchszeit befanden sich diese Kulturen in einem dunklen Raum mit der konstanten Temperatur von 18—20°. Weil in einem ersten Versuch infolge der langen Versuchsdauer und der Luftfeuchtigkeit fremde Pilze durch die Wattepfropfen hindurch in die Kolben wuchsen und die ganze Versuchsreihe vernichteten, sah ich mich bei der Wiederholung genötigt, die Wattepfropfen mit alkoholischer Sublimatlösung (mit Glycerin und Eosin) zu vergiften. So blieben Infektionen fast ganz aus.

Für die Temperaturversuche wurden 400 ccm-Erlenmeyerkolben mit 150 ccm Malzagar (2 % Malzextrakt Wander, Bern und 1,5 % Agar) gefüllt. Zu jeder Temperatur von 0°, 3°, 6°, 9° usw. bis 30° brachte ich für jeden zu untersuchenden Pilz zwei Kolben mit je 5 Impfstücken, so dass für jede Temperatur 10 Kulturen zu messen und nach Z ö l l e r (1925), deren Mittelwert zu berechnen waren. Bei den meisten Flechtenpilzstämmen zeigten die Kulturen bei 27° anfänglich ein geringes Wachstum, starben dann aber ab, weshalb in Kapitel II die Kurven nur bis 27° geführt sind. Als « Kulturhöhe » ist auch im folgenden die mittlere Höhe der drei höchsten Kulturen zu verstehen. Für die Kulturfarbe ist wieder der « Code universel des couleurs » von E. S é g u y (1936) massgebend.

In einigen Fällen gelangten 150 ccm-Kolben mit 80 ccm Malzagar gefüllt zur Verwendung. In solche kleinen Kölbchen konnte ich nur 1—3 Impfstücke bringen, brauchte also viel mehr Kölbchen. Da auch das Wachstum in den grösseren Kolben besser ist, verwendete ich schliesslich nur diese. Für wenige Versuchsreihen standen nur je 5 Parallelkulturen zur Verfügung für die Berechnung des Durchschnittes und des mittleren Fehlers.

8. Das Impfen von Flechtenpilzen für Versuchsreihen

Wenn schon beim Impfen irgendwelcher schnellwachsender Pilze für Versuchsreihen besondere Sorgfalt zu verwenden ist, dann gilt das in erhöhtem Masse für Flechtenpilze. Jeder Reihenversuch mit Flechten-

pilzen ist erfolglos, wenn man nicht einige wichtige Punkte beim Impfen beachtet.

Die Hyphen aller für diese Arbeit kultivierten Flechtenpilze wachsen auf Malzagar mit vielen Verzweigungen eng aneinander gepresst kreuz und quer über- und untereinander und bilden so ein dichtes Geflecht. Äusserlich erkennt man dies an der gewissermassen verkrüppelten Form der Kulturen und an der im Vergleich zum Durchmesser grossen Höhe. Da die einzelnen Hyphen dick und zäh sind, kann man mit gewöhnlichen Impfnadeln von Flechtenpilzkulturen kaum ein Stück lostrennen. Aus 1 mm dickem Draht bereitete ich deshalb ein brauchbares Werkzeug, indem ich den vordersten Teil flach aushämmerte und so einen scharfen Spachtel dengelte. Mit diesem gelang es leichter, die Flechtenpilzstücke zu zerteilen durch Zerdrücken oder Zerschneiden.

Die Impfstücke für Reihenversuche müssen zwei Bedingungen erfüllen : 1. klein sein; 2. unter sich gleich gross sein. Letzteres ist verständlich. Klein müssen die Stücke sein, weil die Unterschiede von veränderten Nährböden oder Temperaturen sonst nicht genügend hervortreten würden bei dem langsamen Wachstum der Flechtenpilze. Meistens steht auch für Versuche nur wenig Impfmateriale zur Verfügung, weil sich die Flechtenpilze ja nicht beliebig rasch vermehren lassen. Und doch braucht man z. B. für einen Temperaturversuch 110 einzelne Impfstücke. Aus diesen Gründen zerteilte ich das Ausgangsmyzel in Stücke, die je nach dem Pilzstamm 0,5 bis 1 mm im Durchmesser waren. Die Kurven der Temperaturversuche beginnen und endigen deshalb nicht beim Nullpunkt, sondern bei diesen Durchmessern.

Wie bei den sporenbildenden andern Pilzen dürfen wir für Reihenversuche mit Flechtenpilzen nur Nährböden verwenden, auf deren Oberfläche kein Kondenswasser fliesst. Sonst verbreitet das fliessende Wasser über die ganze Agaroberfläche kleine Myzelstücke, die zu selbständigen Kulturen auswachsen und ein Messen der geimpften Kulturen verunmöglichen.

B. Methodik zur experimentellen Untersuchung von Flechtenalgen

1. Erzielung von Reinkulturen

Nach den bisherigen Forschungen dürfen wir sagen, dass die Flechtenalgen weder systematisch noch biologisch eine Sonderstellung einnehmen im Gesamtgebiet der Algen. Das Kultivieren von Flechtenalgen bietet deshalb keine grösseren Schwierigkeiten als von freilebenden Algen. Da zudem die Arbeiten über Flechtenalgen schon ziemlich zahlreich sind, um nur an die Namen *Artari*, *Trebooux*, *R. Cho-*

dat, Letellier, Warén, Jaag und H. Raths zu erinnern, können wir uns im folgenden kurz fassen.

Sämtliche untersuchten Reinkulturen sind Klone, ausgehend von einer einzigen Algenzelle. Dabei veränderte ich die von Jaag (1929, S. 20 f.) verwendete Methode nur wenig. Günstig schien es, die feine Öffnung der Mikropipette zu sterilisieren durch das Hinhalten einer heissen Impfnadel, weil sich dort gelegentlich schleimige Bakterien festklebten und später Infektionen verursachen konnten. Im übrigen kamen die gleichen Vorsichtsmaßnahmen zur Anwendung.

2. Systematische Charakterisierung der Kulturen

Zu einer guten Beschreibung einzelliger Algen in Kultur sind drei Wege erwünscht: 1. Prüfung der Abhängigkeit des Wachstums vom Nährboden; 2. Prüfung der Abhängigkeit des Wachstums von der Temperatur; 3. variationsstatistische Bearbeitung von Länge und Breite (bzw. Durchmesser) von 200 gemessenen Algenzellen. In der vorliegenden, mehr biologischen Arbeit haben wir auf den dritten Punkt verzichtet, um für die über drei Dutzend Algenklone die beiden ersten Untersuchungen durchführen zu können. Somit behandeln wir die bearbeiteten Algenklone nach der Feststellung der Gattungszugehörigkeit nur als Nummern. Die Nummer bezeichnet die Herkunft der Alge aus einem bestimmten Material, der hinzugefügte Buchstabe bezeichnet den einzelnen Klon.

Die Untersuchung der Flechtenalgen auf verschiedenen Nährböden und bei verschiedenen Temperaturen hatte nicht nur den Zweck, Gleichheit oder Verschiedenheit zu prüfen. Es war auch interessant zu sehen, ob die Ansprüche der Algen gleicher Flechtengruppen gleich seien.

Zur Prüfung des Wachstums auf verschiedenen Nährböden kamen zur Verwendung: 1. Malzagar (2 % Malzextrakt Wander, Bern, und 1,5 % Agar in destilliertem Wasser); 2. Peptonagar (1 % Pepton und 1,5 % Agar gelöst in Knopscher Nährlösung); 3. Pepton-Glukoseagar (1 % Pepton, 2 % Glukose und 1,5 % Agar gelöst in Knopscher Nährlösung); 4. Glukoseagar (2 % Glukose und 1,5 % Agar gelöst in Knopscher Nährlösung); 5. Knopagar (1,5 % Agar gelöst in Knopscher Nährlösung).

Meistens war das Wachstum auf Peptonagar, immer auf Knopagar zu gering für Messungen. In den Tabellen fehlen dann diese Nährböden.

Wie bei den Flechtenpilzen verwendete ich für den Nährstoffversuch mit Flechtenalgen 400 ccm-Erlenmeyerkolben, gefüllt mit 150 ccm Agar und dreimal bei 98° C im Dampftopf sterilisiert. Auch hier liessen sich in jedem Kolben 5 Stellen beimpfen. Mit zwei Kolben pro Alge und

Nährboden standen von jedem Nährboden 10 Kulturen zur Verfügung, von deren Durchmesser das Mittel und der mittlere Fehler nach Z ö l l e r (1925) berechnet wurden. Auch hier bezeichnen die Koloniehöhen das Mittel der drei höchsten Kolonien. Die Zahlen der Koloniefarben erhielt ich durch Vergleich mit den Farben des « Code universel des couleurs » von E. S é g u y (1936).

Der Nährstoffversuch war im Winter angelegt und so konnten die Kolonien bei diffusem Licht und einer Temperatur von 18—20° wachsen.

Bei den Temperaturversuchen diente als Nährboden Glukoseagar (2 % Glukose und 1,5 % Agar gelöst in Knopscher Nährlösung). Zu jeder Temperatur von 0°, 3°, 6°, 9°, usw. bis 30° brachte ich von jeder Alge 2 Kolben mit je 5 Kulturen, so dass wieder für jede Temperatur 10 Kolonien zur Untersuchung zur Verfügung standen. Wie oben berechnete ich den mittleren Durchmesser mit dem mittleren Fehler nach Z ö l l e r (1925), die mittlere Höhe der drei höchsten Kolonien und verglich die Farbe mit dem « Code universel des couleurs » von E. S é g u y (1936).

Weniger günstig erwiesen sich wie bei den Flechtenpilzen die kleineren 150 ccm-Kölbchen. Die Zahlen einzelner Temperaturversuche stammen von nur 5 Parallelversuchen.

3. Das Impfen von Flechtenalgen für Versuchsreihen

Im Gegensatz zu den Flechtenpilzen bereiten die Flechtenalgen beim Impfen keine Schwierigkeiten. Wie bei den Flechtenpilzen benützen wir einen mit Formol desinfizierten Impfkasten.

Die in Versuchsreihen verwendeten Impfstücke massen 0,5—1 mm im Durchmesser.

Wie bei den Flechtenpilzen muss man darauf achten, dass die Agaroberfläche von Kondenswasser frei ist, weil sonst das fliessende Wasser die Algen über die ganze Agaroberfläche verschwemmt und solche Kulturen unmessbar sind.