

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500019-5

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE VĚD  
ACADEMIA SCIENTIARUM BOHEMOSLOVENICA

# FOLIA BIOLOGICA

TOMUS II  
FASCICULUS 6



Fol. biol. (Praha) Tom. 2 - Fasc. 6 Praha 31. 12. 1956

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500019-5

FOLIA BIOLOGICA (PRAHA)

*Международное издание журналов Československá biologie и Československá mikrobiologie*

Редакционная коллегия:

Академик И. Малек (главный редактор), В. Вршанский, М. Гаšek, чл.-корр. ЧСАН Ф. Герчик, академик О. Провец, Ю. Мадура, академик С. Прát, Б. Росицкий (секр. ред. коллегии), Л. Черный, Я. Штерцль.

Переводы на русский язык: доц. д-р Широ́ва, на английский язык: д-р Ридесова, на немецкий язык: д-р Файгель

Издается Биологическим институтом Чехословацкой Академии наук в Издательстве ЧСАН. Выходит 6 раз в год. Подписки цена на 1 год Kčs 60.—, цена одного номера Kčs 10.—. Адрес редакции: Биологический институт ЧСАН, На дврчшшт 2, Прага XIX. Звázкы: Артия, Смедькы 30, Прага II, Чехословакия.

FOLIA BIOLOGICA (PRAHA)

*International Edition of the Journals Československá biologie and Československá mikrobiologie*

Editorial Board:

Academician I. Málek (Chief Editor), L. Černý, M. Hašek, Corresponding Member of the Czechoslovak Academy of Science F. Herčík, Academician O. Jirovec, J. Macura, Academician S. Prát, B. Rosický (Editorial Secretary), J. Šterzl, V. Vršanský.

Translations into Russian: Dr Schierová, into English: Dr Ridesová, into German: Dr Feigel.

Issued by Biologický ústav Československé akademie věd at Nakladatelství Čs. akademie věd. Yearly subscription (6 numbers) Kčs 60. Single number Kčs 10. Address: Biologický ústav ČSAV, Na cvičišti 2, Praha XIX. Orders: Artia, Smečky 30, Praha II, Czechoslovakia.

FOLIA BIOLOGICA (PRAHA)

*Internationale Ausgabe der Zeitschriften Československá biologie und Československá mikrobiologie*

Redaktionsrat:

Akademiemitglied I. Málek (leitender Redakteur), L. Černý, M. Hašek, korresp. Mitgl. d. Čs. Akademie d. Wiss. F. Herčík, Akademiemitglied O. Jirovec, J. Macura, Akademiemitglied S. Prát, B. Rosický (Redaktions-Sekretär), J. Šterzl, V. Vršanský.

Die Übersetzungen besorgt Doz. Dr A. Schierová für die russischen, Dr A. Ridesová für die englischen und Dr T. Feigel für die deutschen Artikel.

Herausgeber: Biologický ústav Československé akademie věd durch Vermittlung des Nakladatelství Čs. akademie věd. 6 Lieferungen jährlich. Abonnementpreis 60 Kčs, Preis der Einzelnummer 10 Kčs. Anschrift der Redaktion: Biologický ústav ČSAV, Na cvičišti 2, Praha XIX. Zu beziehen durch: Artia, Smečky 30, Praha II, Československo.

Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500019-5

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE VĚD  
ACADEMIA SCIENTIARUM BOHEMOSLOVENICA

# FOLIA BIOLOGICA

1956



Approved For Release 2008/04/10 : CIA-RDP80T00246A002900500019-5

FOLIA BIOLOGICA (PRAHA)

*Международное издание журналов Československá biologie и Československá mikrobiologie*

Редакционная коллегия:

Академик И. Малек (главный редактор), В. Вршанский, М. Гашек, чл.-корр. ЧСАН Ф. Герчик, академик О. Ировец, Ю. Мацура, академик С. Праг, Б. Росицкий (секр. ред. коллегии), Л. Черный, Я. Штерцль.

Переводы на русский язык: доц. д-р Широ́ва, на английский язык: д-р Ридесова, на немецкий язык: д-р Файгль

Издается Биологическим институтом Чехословацкой Академии наук в Издательстве ЧСАН. Выходит 6 раз в год. Подписная цена на 1 год Kčs 60.—, цена одного номера Kčs 10.—. Адрес редакции: Биологический институт ЧСАН, На цвечишти 2, Прага XIX. Заказы: Артия, Смечки 30, Прага II, Чехословакия.

FOLIA BIOLOGICA (PRAHA)

*International Edition of the Journals Československá biologie and Československá mikrobiologie*

Editorial Board:

Academician I. Málek (Chief Editor), L. Černý, M. Hašek, Corresponding Member of the Czechoslovak Academy of Science F. Herčík, Academician O. Jírovec, J. Macura, Academician S. Prát, B. Rosický (Editorial Secretary), J. Šterzl, V. Vršanský.

Translations into Russian: Dr Schierová, into English: Dr Ridesová, into German: Dr Feigel.

Issued by Biologický ústav Československé akademie věd at Nakladatelství Čs. akademie věd. Yearly subscription (6 numbers) Kčs 60. Single number Kčs 10. Address: Biologický ústav ČSAV, Na cvičišti 2, Praha XIX. Orders: Artia, Smečky 30, Praha II, Czechoslovakia.

FOLIA BIOLOGICA (PRAHA)

*Internationale Ausgabe der Zeitschriften Československá biologie und Československá mikrobiologie*

Redaktionsrat:

Akademienmitglied I. Málek (leitender Redakteur), L. Černý, M. Hašek, korresp. Mitgl. d. Čs. Akademie d. Wiss. F. Herčík, Akademienmitglied O. Jírovec, J. Macura, Akademienmitglied S. Prát, B. Rosický (Redaktions-Sekretär), J. Šterzl, V. Vršanský.

Die Übersetzungen besorgt Doz. Dr A. Schierová für die russischen, Dr A. Ridesová für die englischen und Dr T. Feigel für die deutschen Artikel.

Herausgeber: Biologický ústav Československé akademie věd durch Vermittlung des Nakladatelství Čs. akademie věd. 6 Lieferungen jährlich. Abonnementpreis 60 Kčs, Preis der Einzelnummer 10 Kčs. Anschrift der Redaktion: Biologický ústav ČSAV, Na cvičišti 2, Praha XIX. Zu beziehen durch: Artia, Smečky 30, Praha II, Československo.

## СО Д Е Р Ж А Н И Е

Беран, К. и Бургер, М.: Изучение оптимальных условий осахаривания картофельных затаров плесневыми энзиматическими препаратами . . . . .	329
Блаттный, Ц.: Замечания по вопросу интерференции штаммов вируса табачной мозаики	356
Блаттный, Ц., Брчак, Я., Лимберг, Я. и Бойнянский, В.: К вопросу эпидемиологии столбура в ЧСР, в особенности столбура картофеля . . . . .	181
Блашкович, Д., Быстрицкий, В., Стык, Б. и Коварова, В.: К проблеме фильтрующихся форм бактерий . . . . .	8
Боредцкий, Л.: К вопросу вирусных рецепторов. Об элективной склеиваемости эритро- цитов суслика <i>Citellus citellus</i> . . . . .	344
Бургер, М. и Беран, К.: К вопросу трансглюковидирующей деятельности энзимати- ческих препаратов <i>Aspergillus niger</i> . . . . .	227
Бургер, М., Рокос, И. и Прохазка, П.: Влияние хлортетрациклина на активность $\alpha$ -амилазы . . . . .	320
Вавра, Ю.: Действие стрептомицина на жгутиков <i>Euglena gracilis</i> Klebs. . . . .	351
Винтер, В.: Спорообразование бацилл. Переход кальция в клетки и падение протеолити- ческой активности среды при спорообразовании <i>Bacillus megatherium</i> . . . . .	216
Войтишкова, М.: К вопросу участия неоплодотворяющих живчиков в половом процессе	239
Войтишкова, М. и Книже, Б.: Отдаленное половое скрещивание цесарки ( <i>Numida meleagris</i> ♀) с петухом ( <i>Gallus domesticus</i> ♂) . . . . .	84
Гашек, М.: Влияние внутривидовых впрыскиваний чужеродной крови на образо- вание антител. II. Исследования реактивности у уток, гусей и цесарок . . . . .	48
Гашек, М., Граба, Т. и Эсслова, М.: Подавление образования иммунных агглютининов у цыплят, которым на первый день после выклеывания впрыскивались чужеродные эритроциты и лейкоциты . . . . .	54
Гашкова, В. и Покорная, Э.: Влияние интраэмбриональных и многократных постэмбри- ональных впрыскиваний крови на образование гетероагглютининов . . . . .	249
Гейтманек, М. и Гейтманкова-Угрова, Н.: Необычные формы изменчивости <i>Tricho- phyton mentagrophytes</i> . . . . .	149
Герчик, Ф.: К вопросу микроструктуры живого вещества . . . . .	1
Герчик, Ф.: Механизм биологического действия облучения . . . . .	193
<b>Горжавка, Ф.,</b> Боучкова-Мартиновская, А. и Стейскал, Б.: Фотопериодические опыты с просом . . . . .	88
Граба, Т.: Иммунологическое поведение эмбриональных парабионтов между индюшкой и курицей . . . . .	165
Граба, Т. и Гашек, М.: Гомотрансплантация кожи у однодневных цыплят, утят и ин- дюшат . . . . .	61
Граба, Т., Гашек, М. и Чумливский, Б.: Иммунологическое сближение у овечьей тройни, естественных эмбриональных парабионтов . . . . .	276
Граба, Т., Гашкова, В., Ленгерова, А. и Войтишкова, М.: Влияние внутривидовы- шевых впрыскиваний чужеродной крови на образование антител. I. Исследования реактивности у кур . . . . .	43
Гроданович, Я.: Иммунологическое сближение у крыс по отношению к мышинной опухолью Стоскег-а в эмбриогенезе и постэмбриогенезе . . . . .	296
Гршель, И.: Исследования митохондриальных образований у риса и пшеницы . . . . .	371
Достажек, М. и Спурный, М.: Культивационные характеристики десульфуризирующих бактерий из нефтяных залежей . . . . .	338
Йогановский, Ю.: Состояние невосприимчивости в течение экспериментальной ста- филококковой инфекции . . . . .	141
Карпфель, Э.: Характер лейкоцитарной реакции после рентгеновского облучения	211
Миловидов, П.: Определение жизнеспособности конидий спорыньи по методу прижизненного окрашивания . . . . .	375
Нермут, М. и Нечас, О.: L-формы бактерий. III. Влияние концентрации пенициллина в среде на развитие L-образований у <i>Proteus vulgaris</i> . . . . .	36
Нечас, О.: Жизнеспособность клеточных фрагментов дрожжей. IV. Связь между ядром и способностью к росту . . . . .	29
Пенка, М.: Оценка почвенной воды с помощью биологического метода кривых высы- хания . . . . .	100

Поспишил, Ф.: Влияние радиоизотопов S <sup>35</sup> и P <sup>32</sup> на изменения биопотенциалов корня	112
Прасличка, М. и Пleshko, И.: Влияние спирта на действие облучения у мышей	121
Пуза, А. и Мольнар, И.: Исследования реактивности крысы после внутриварошесевых впрыскиваний чужеродных кровяных телец	300
Розенберг, М.: Фаголизис клеток стафилококка	201
Розенберг, М.: Динамика распада лизогенных клеток под действием ультрафиолетовых лучей	206
Розсыпал, Я. и Мраз, Ф.: Бактериозы сеянного мака, наблюдавшиеся в Чехословакии	233
Рышавый, Б.: К вопросу специфичности и изменчивости кокцидий у различных хозяев	65
Санто, Я.: Титрация вируса гриппа в тканевых культурах	79
Свобода, Я. и Гашек, М.: Воздействие иммунологического сближения на передаваемость вируса саркомы Rous-a у индеек	256
Скалка, М.: Влияние потери крови на смертность мышей от рентгеновского облучения	116
Соснова, В.: Анатомическо-цитологические исследования пластинов в точках роста	364
Токин, Б. П.: Научное наследие И. И. Мечникова и вопросы иммунитета эмбрионов	261
Тринка, З.: Влияние недостатка и избытка белков в пище на иммунную реакцию	306
Халоупка, Ю.: Протеолитические энзимы актиномицета <i>Streptomyces griseus</i> . II. Влия- ние характера и концентрации азота на выделение протеазы	72
Хутная, И.: Изучение заживления раны в денервированной конечности	157
Хутная, И.: К вопросу механизма деструкции гомотрансплантатов. I. Сравнительное гистологическое изучение авто-, гомо- и гетеротрансплантатов	284
Штерцль, Я.: Длительная иммунизация. Изменения в образовании антител, в лейко- цитарной и температурной реакции	129
Штерцль, Я. и Грубешова, М.: Перенос способности к образованию антител на не- иммунизированных реципиентов нуклеопротеидными фракциями	21
Эргардова, Б. и Рышавый, Б.: К вопросу квантитативных копрологических методов исследования в гельминтологии	172

*Краткие сообщения*

Арпай, Я. и Яноткова, О.: К проблематике бактериального микоза	191
Гашек, М., Ленгерова, А., Майер, Я. и Матернова, Э.: К вопросу роли клеток в про- цессе сближения	124
Герчик, Ф.: Передающийся лизис клеток <i>Escherichia coli</i> , вызываемый рентгеновским облучением	380

## CONTENTS

## INHALT

Beran, K., Burger, M.: Study of Optimal Conditions for Saccharification of Potato Mashies by Mould Enzyme Preparations . . . . .	329
Blaškovič, D., Bystrický, V., Styk, B. a Kovárová V.: On the Problem of Filtrable Forms of Bacteria . . . . .	8
Blattný, C.: Bemerkungen zur Interferenz der Tabak-Mosaikvirusstämme . . . . .	356
Blattný, C., Brčák, J., Limberk, J., Bojňanský, V.: Beitrag zur Stolbur-Epidemiologie in der CSR unter besonderer Berücksichtigung der Kartoffeln . . . . .	181
Borecký, L.: On the Question of Virus Receptors. The Selective Agglutinability of Erythrocytes of the Ground Squirrel ( <i>Citellus citellus</i> ) . . . . .	344
Burger, M., Beran, K.: On the Transglucosidatory Activity of Enzymatic Preparations of the Fungus <i>Aspergillus niger</i> . . . . .	227
Burger, M., Rokos, J., Procházka, P.: Effect of Chlortetracycline on the Activity of $\alpha$ -amylase . . . . .	320
Dostálek, M., Spurný, M.: Cultivation Characteristics of Sulphate-reducing Bacteria . . . . .	338
Erhardová, B., Ryšavý, B.: Zur Frage der quantitativen koprologischen Untersuchungsmethoden in der Helminthologie . . . . .	172
Grozdanovič, J.: Immunological Tolerance of Rats against Crocker's Tumour during Embryogenesis and Postembryogenesis . . . . .	296
Hašek, M.: The Influence of Intra-embryonal Injections of Foreign Blood on the Formation of Antibodies. II. Observation of Reactivity in Ducks, Geese and Guinea-Fowl . . . . .	48
Hašek, M., Hraba, T., Esslová, M.: Suppression of the Formation of Immune Agglutinins in Chicks in which Approximation was Produced on the First Day after Hatching by Means of Injections of Erythrocytes and Leucocytes . . . . .	54
Hašková, V., Pokorná, Z.: The Influence of Intra-embryonal and Repeated Post-embryonal Injections on the Formation of Heteroagglutinins . . . . .	249
Hejtmánek, M., Hejtmánková-Uhrová, N.: Unusual Forms of Variability in <i>Trichophyton mentagrophytes</i> . . . . .	149
Herčík, F.: On the Problem of the Microstructure of Living Matter . . . . .	1
Herčík, F.: The Mechanism of the Biological Action of Radiation . . . . .	193
Hořavka, F., Boučková-Martinovská, A., Stejskal, B.: Photoperiodische Versuche mit Hirse . . . . .	88
Hraba, T.: Immunological Behaviour of Embryonal Parabionts between Turkey and Hen . . . . .	165
Hraba, T., Hašek, M.: Skin Homotransplants in Day-old Chicks, Ducks and Turkeys . . . . .	61
Hraba, T., Hašek, M., Čumlínský, B.: Immunological Approximation of Sheep Triplets, Natural Embryonic Parabionts . . . . .	376
Hraba, T., Hašková, V., Lengerová, A., Vojtíšková, M.: The Influence of Intra-embryonal Injections of Foreign Blood on the Formation of Antibodies. I. Observation of Reactivity in Hens . . . . .	43
Hršel, I.: Untersuchungen mitochondrialer Strukturen bei Reis und Weizen . . . . .	371
Chaloupka, J.: Proteolytic Enzymes of <i>Streptomyces griseus</i> . II. The Influence of the Nature and Concentration of Nitrogen on the Secretion of Protease . . . . .	72
Chutná, J.: A Study of Wound Healing in a Denervated Extremity . . . . .	157
Chutná, J.: On Questions of the Mechanism of Destruction of Homotransplants. I. Comparative Histological Studies of Auto-, Homo- and Heterotransplants . . . . .	284
Johanovský, J.: The Phenomenon of Resistance in the Course of Experimental Staphylococcal Infection . . . . .	141
Karpfel, Z.: The Character of Leucocyte Reaction Following X-Irradiation . . . . .	211
Milovidov, P.: Die Feststellung der Lebensfähigkeit von Mutterkornpilzkonidien mittels Vitalfärbungsmethode . . . . .	375
Nečas, O.: The Vitality of Cell Fragments of Yeast. IV. The Relation of the Nucleus to Growth Ability . . . . .	29
Nermet, M., Nečas, O.: L-forms of Bacteria. III. The Influence of the Concentration of Penicillin in the Medium on the Development of L-Bodies of <i>Proteus vulgaris</i> . . . . .	36
Penka, M.: Die biologische Wertung des Bodenwassers mit der Methode der Austrocknungskurven . . . . .	100
Pospíšil, F.: The Influence of Radioisotopes $S^{35}$ and $P^{32}$ on Changes in the Biopotentials of Roots . . . . .	112
Praslička, M., Pleško, I.: The Influence of Ethanol on the Action of Irradiation in Mice . . . . .	121
Puza, A., Molnár, J.: The Reactivity of Rats after Intra-embryonal Injection of Foreign Blood Cells . . . . .	300
Rosenberg, M.: Lysis of Staphylococcal Cells due to Bacteriophage . . . . .	201

Rosenberg, M.: The Dynamics of the Breaking-down of Lysogenic Cells Irradiated by Ultra-violet Light . . . . .	206
Rozsypal, J., Mráz, F.: Das Auftreten von Ölmohnbakterien in der Tschechoslowakei . . . . .	233
Ryšavý, B.: Die Frage der Spezifität und Variabilität der Coccidien bei verschiedenen Wirten . . . . .	65
Skalka, M.: The Influence of Loss of Blood on the Death-Rate in Mice Following X-ray Irradiation . . . . .	116
Sosnová, V.: Anatomisch-zytologische Studie über die Plastiden der Vegetationspunkte . . . . .	364
Svoboda, J., Hašek, M.: Influencing the Transplantability of the Virus of Rous. Sarcoma by Immunological Approximation in Turkeys . . . . .	256
Szántó J. Titration of the Influenza Virus in Tissue Cultures . . . . .	79
Šterzl, J., Hrubešová, M.: The Transfer of Antibody Formation by Means of Nucleoprotein Fractions to Non-immunised Recipients . . . . .	21
Šterzl, J.: Long-term Immunisation. Changes in Antibody Formation and Leucocytic and Pyrexial Reactions . . . . .	129
Tokin, B. P.: The Heritage of I. I. Mechnikoff and Questions of Embryonal Immunity . . . . .	261
Trnka, Z.: The Influence of Protein Deficiency and Excess in the Diet on Immunity Response . . . . .	306
Vávra, J.: The Action of Streptomycin on the Flagellate Euglena gracilis Klebs. . . . .	351
Vinter, V.: Sporulation of Bacilli. Consumption of Calcium by the Cells and a Decrease in the Proteolytic Activity of the Medium during Sporulation of Bacillus megatherium . . . . .	216
Vojtíšková, M.: The Question of the Participation of Non-fertilising Sperms in the Sexual Process . . . . .	239
Vojtíšková, M., Kníže, B.: Entfernte geschlechtliche Kreuzung von Perlhuhn (Numida meleagris ♀) und Hahn (Gallus domesticus ♂) . . . . .	84

*Brief Reports*

Arpai, J., Janotková, O.: On Problem of Bacteriological Mycolysis . . . . .	191
Hašek, M., Lengerová, A., Majer, J., Maternová, E.: On the Role of Cells in the Process of Adaptation . . . . .	124
Herčík, F.: Transmissible Lysis of Cells of Escherichia coli Induced by X-ray Radiation . . . . .	327



## FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc. 6

### Study of Optimal Conditions for the Saccharification of Potato Mashes by Mould Enzyme Preparations

K. BERAN and M. BURGER

Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Science, Department of Microbiology, Praha

Received June 28, 1955

A great number of authors have contributed to the study of the problem of using amylolytic preparations of moulds for the saccharification of starch material for the alcoholic fermentation industry. The results of all these papers show that these preparations can successfully replace malt which has been used up to now. The great majority of authors used various cereals as the basic starch material. With regard to potatoes, however, there is insufficient material for comparison.

Interest has been concentrated mainly on two kinds of mould: *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*. Preparations from these moulds are made both on solid substrates, particularly bran (Roberts et al. 1944, Takamine 1914, Underkofler et al. 1939, 1946, Lu-Cheng Hao et al. 1943), and on liquids by submerged culture. *A. niger* is mostly used for submerged culture (Le Mense et al. 1949, Adams et al. 1947, Teixeira et al. 1950).

The temperature at which starch material is saccharified varies. With *A. oryzae*, 50–55° C is most often cited (Underkofler et al. 1939, Lu-Cheng Hao et al. 1943, Roberts et al. 1944), although 30° C is also given (Lu Cheng Hao et al. 1943, Roberts et al. 1944). With *A. niger* the same or a somewhat higher temperature (60–62° C) is cited (Le Mense et al. 1949, Adams et al. 1947).

These higher temperatures do not, however, correspond in character to saccharifying temperatures as we understand them in technological processes (Underkofler et al. 1946, Adams et al. 1947, Teixeira et al. 1950). During saccharification the pH of both preparations is usually kept at the same value of about 5.5.

In a recent paper (Burger and Beran 1956) we have shown the great effect of temperature on maltase activity during starch hydrolysis by the enzyme preparation from the mould, *A. niger*. Maltase activity was 7.3 times greater at 65° C than at 30° C. For these reasons we decided to verify the optimal conditions of temperature and pH for the saccharification of potato mashes by mould preparations.

#### Material and Methods

##### Enzyme Preparations and Material

Enzyme preparations from two kinds of moulds, *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae*, and dried diastatic malt were used in the experiments. The moulds were cultured on bran. The methods of culturing the moulds and of making the enzyme preparations have been described previously (Burger and Beran 1954, 1956). As distinct from the papers mentioned the mould enzyme extracts were filtered through a sintered glass crucible ( $G_4$ ). Potato flakes containing 65.58 % starch or soluble starch p. a. (Lachema) were used for the preparation of the mash.

## Analytical Methods

Fermentable sugars (glucose, maltose and maltotriose) were determined by the method already described (Beran and Burger 1955). The method is based on the technique of fermenting samples by the yeast, *Saccharomyces cerevisiae* R XII, in the presence of 2,4-dinitrophenol, the amount of fermented sugar being calculated from the volume of carbon dioxide formed on the basis of Gay-Lussac's stoichiometric relation. The amount of fermentable sugars determined is expressed as glucose. Chromatographic analysis of sugars was made by a modification of the method described by Green and Stone (1952). The dextrination activity was determined by a modification of Wohlgenuth's method (Belozersky and Proskuryakov 1951); the iodine test was performed with iodine solution, using the volume of samples given in the description of the method.

## Preparation of Substrates and Technique used in Saccharification

Potato mashes prepared from potato flakes with a final starch content of 5 and 10 % were used for the experiments (see below). The necessary amount of finely ground potato flakes was weighed into test-tubes, 3 cm. in diameter, then water was added in amounts necessary to bring the final volume of mash up to 25 ml. after the addition of the enzyme extract of the mould. The potato meal having been mixed with water, the test-tubes with their contents were autoclaved for half-an-hour at  $\frac{1}{2}$  atm. After autoclaving, the test-tubes were kept in a water bath at 50 °C.

When studying the effect of pH on the dextrination activity of mould preparations, the same volume of a 15 % solution of soluble starch was used. With the *A. niger* preparation, the range of pH under consideration (3.5–6.5) was obtained by acetate buffer at a final concentration of 0.1 M; with *A. oryzae* (7.6–4.6) by veronal-acetate buffer at a final concentration of 0.02 M.

To the substrates thus prepared, quantities of enzyme extract were added so that the weight of dry mould preparation used amounted to 10 % of the weight of starch present in the experiment. Exceptions to this proportion are given in the description of the experiments in question.

Test-tubes with substrates were placed in a water bath. The effect of temperature in the range of 25–80 °C was studied. If not stated otherwise, saccharification time was one hour. After that time the enzyme process was stopped by dipping the test-tubes into a boiling bath and the necessary analyses were made after allowing them to cool off.

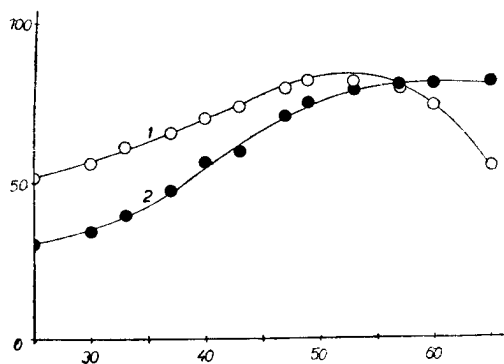


Fig. 1. Effect of temperature on formation of fermentable substances during saccharification of potato mashes with 5% starch content. y: mg. of fermentable substances expressed as glucose in 2.5 ml. sample, x: temperature in °C. Curve 1 — *A. oryzae*, 2 — *A. niger*.

As shown in fig. 1, the temperature optimum for the formation of fermentable substances during saccharification of potato mash by the *A. oryzae* preparation lies between 50 and 60 °C, and, in the case of the *A. niger* preparation the temperature of 65 °C was not exceeded. The flatness of the curves may be explained by the large content of enzymes and the lack of substrate in the system.

The saccharification test by iodine solution showed that the achroous point was reached in the *A. oryzae* preparation at a temperature as low as 40 °C, and in the *A. niger* preparation at a temperature as high as 65 °C. Before reaching this tempera-

## Results

## Formation of Fermentable Substances during Saccharification of Potato Mashes with a 5% Starch Content

The amount of fermentable substances formed during saccharification of potato mash with a 5% starch content was studied at temperatures ranging from 25–65 °C. The amount of dry enzyme preparations used was 15% starch weight. The results of the experiments are given in figs. 1 and 2.

ture the *A. niger* preparation gave the whole series of colours, characteristic for the degree of starch hydrolysis, from violet at 25° C up to achroous at the temperature of 65° C.

Fig. 2 gives chromatograms of mashes after saccharification by *A. niger*, *A. oryzae* preparations and malt at temperatures of 25, 47, 57 and 65 °C. Perceptible variations in the decomposition of individual sugars are due to the different enzyme composition of individual preparations as shown previously (Feniksová 1953, Klimovsky and Rodzevich 1950, Burger and Beran 1954, Stárka 1954). Chromatograms of mashes

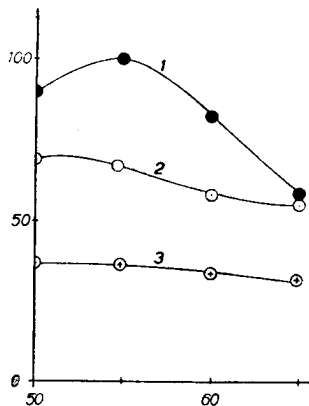


Fig. 3. *A. oryzae*

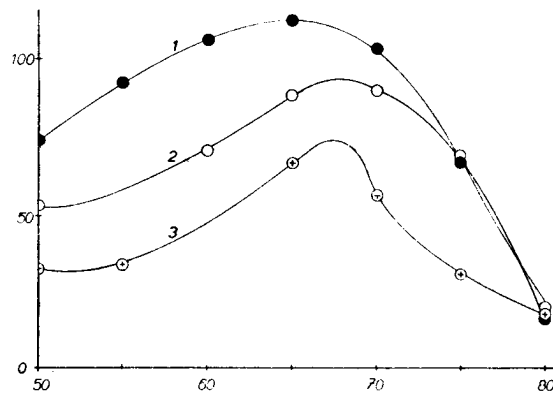


Fig. 4. *A. niger*.

Effect of temperature on formation of fermentable substances during saccharification of potato mashes by mould preparations (10% starch content in mash).

$x$ : temperature in °C.  $y$ : mg. of fermentable substances expressed as glucose in 2.5 ml. sample. Curve 1 — saccharified for 60 minutes, 2—40 minutes, 3—20 minutes.

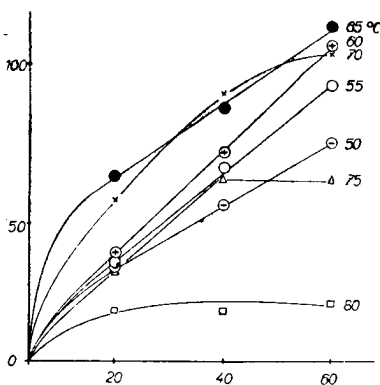


Fig. 5. *A. niger*

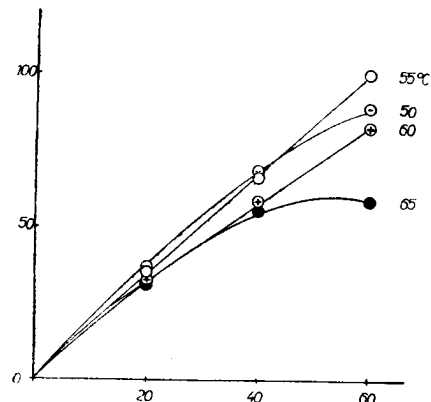


Fig. 6. *A. oryzae*

Fig. 5, 6. Course of formation of fermentable substances during saccharification of potato mashes by mould preparations at various temperatures (10% starch content in mash).

$x$ : time of saccharification in minutes.  $y$ : mg. of fermentable substances expressed as glucose in 2.5 ml. sample.

saccharified by the *A. niger* preparation show clearly a large amount of isomaltose produced by transglucosidation and a quantity of maltotriose decreasing with increasing temperature.

Chromatographic analysis of products formed during saccharification of potato mashes containing 5% starch. Course of formation of products formed during saccharification of potato mashes by mould preparations under optimum temperatures (*A. niger* 65 °C, *A. oryzae* 55 °C).

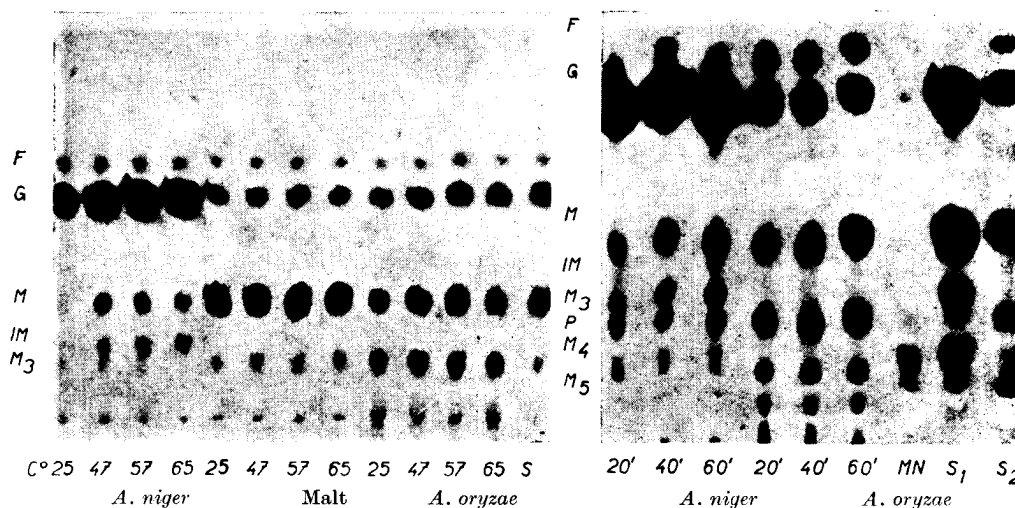


Fig. 2. F — fructose, G — glucose, M — maltose, IM — isomaltose, M<sub>3</sub> — maltotriose, P — panose, M<sub>4</sub> — maltotetraose, M<sub>5</sub> — maltopentaose, MN — maltose incubated with *A. niger* preparation with simultaneous fermentation by the yeast *S. cerevisiae* R XII, S<sub>1</sub> — maltose after incubation with *A. niger* preparation, S<sub>2</sub> — malt extract.

#### Formation of Fermentable Substances during Saccharification of Potato Mashes with a 10% Starch Content

Since there was an insufficiency of substrate in the above experiment it was repeated on a mash containing 10% starch and with a smaller amount of enzyme preparation (10% of starch weight). The temperature range studied was narrowed to 50–80° C in the case of the *A. niger* preparation and 50–60° C with the *A. oryzae* preparation. At the same time, the amount of fermentable sugars formed at these temperatures after 20, 40 and 60 minutes of saccharification was studied. The results of this experiments are given in figs. 3, 4, 5, 6 and 7.

As shown in figs. 3 and 4, the *A. niger* and *A. oryzae* preparations differ in their optimum temperature. After 60 minutes of saccharification, the optimum temperature of the *A. oryzae* preparation was 55° C and that of the *A. niger* preparation was 65° C. At these temperatures 46.6% of fermentable substances in relation to the amount of starch present is produced with *A. oryzae* and 56.1% with *A. niger*. Figs. 5 and 6 give the amount of fermentable substances in time relation. The linear course of the curves up to 65° C with the *A. niger* preparation and up to 55° C with the *A. oryzae* shows clearly that a distinct inactivation of enzymes appears only above these optimal temperatures.

Saccharification tests with iodine solution showed that with the *A. oryzae* preparation the achroous point was reached after 60 minutes of saccharification at all temperatures investigated, but that a yellow-brown colouration only was obtained after 40 and 20 minutes of saccharification. A yellow-brown colouration was obtained with the *A. niger* preparation only at the temperature of 65° C after 60 minutes of saccharification. At that temperature the colouration was a bright red after 40 minutes of saccharification and red-brown after 20 minutes. This colouration of samples was the lightest in the whole series of temperatures and times studied. In the other cases the colouration of samples by iodine has shown various degrees of starch decomposition.

Fig. 7 shows chromatograms of mashes saccharified at optimal temperatures (*A. niger* 65° C, *A. oryzae* 55° C) after 20, 40 and 60 minutes of saccharification. Mashes saccharified by the *A. niger* preparation show a considerable production of isomaltose formed by transglucosidation; the amount of isomaltose increases with time: next there is a considerable amount of maltotriose, but a small quantity of panose and maltotetraose. Chromatograms of mashes saccharified by the *A. oryzae* preparation show sugar decomposition characteristic for  $\alpha$ -amylase activity, i. e. small quantities of monosaccharides and large quantities of oligosaccharides and higher components. These higher components decrease with time. Chromatograms of malt extract and maltose incubated with the *A. niger* enzyme preparation are given as standards since their distribution of sugars in chromatography is well-known. The chromatogram of maltose incubated with the *A. niger* preparation after fermentation with the yeast *S. cerevisiae* R XII, without stopping the enzyme activity of the preparation, shows that not only maltotriose but also isomaltose and in part panose are broken down as well. This confirms our previous findings (Burger and Beran 1954).

#### Effect of pH on Starch Dextrination

Various quantities of enzyme preparations were used in this experiment. The *A. niger* preparation was added in amounts of 10% of the weight of starch present and *A. oryzae* in amounts of 5.6%. We worked at the optimal temperatures given above. The results are given in fig. 8.

As shown in fig. 8, the enzyme preparations of *A. oryzae* and *A. niger* also differ in their optimal pH value for starch dextrination. The optimal pH found was 4.5 with the *A. niger* preparation and 6.1 with *A. oryzae*. The course of the curve shows dextrination activity of *A. niger* preparation to be only slightly affected by low pH values, as opposed to this the dextrination activity of the *A. oryzae* preparation is considerably affected.

#### Formation of Fermentable Substances in Unbuffered 10% Starch Solution

The formation of fermentable substances appearing during starch hydrolysis by malt and the preparations of *A. niger* and *A. oryzae* was studied. The 10% solution

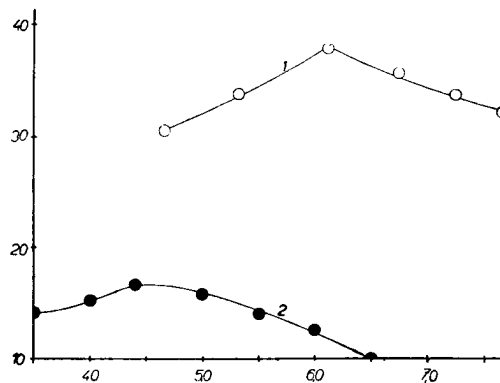


Fig. 8. Effect of pH on dextrination activity of starch. x: pH values. y:  $\alpha$ -amylase units. Curve 1 - *A. oryzae*, 2 - *A. niger*.

of soluble starch was not buffered. Saccharification time was 30 minutes. The results are given in fig. 9.

During incubation considerable acidification of the substrate occurred. In the experiment with malt pH decreased to 3.2, with the *A. niger* preparation to 3.5 and with *A. oryzae* to 5.0. It can be seen that this decrease in pH had a negative effect

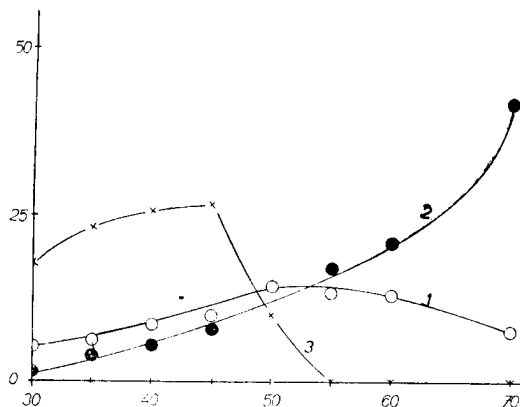


Fig. 9. Effect of temperature on formation of fermentable substances during 5% unbuffered hydrolysis of soluble starch (time of saccharification 30 minutes).  $x$ : temperature in °C.  $y$ : mg. of fermentable substances expressed as glucose in 2.5 ml. sample. Curve 1 — *A. oryzae*, 2 — *A. niger*.

on the formation of fermentable substances, especially in the case of malt. The formation of fermentable substances was also affected in the case of the *A. oryzae* preparation, but not in the *A. niger* preparation. This corroborates the results of the previous experiment. Since saccharification lasted only half-an-hour, it is clear that the optimal temperatures tend to be higher.

#### Discussion

Various authors use various saccharification temperatures for the saccharification of starch material by mould preparations. These temperatures vary between 30° and 55° C when *A. oryzae* is used and between 50° and 62° C in the case of *A. niger*. We have not found any systematic study in the literature available

devoted to the problem of optimal temperatures in the saccharification of starch substances by mould preparations under conditions of technological processes. Saccharification temperatures used up to now seem, therefore, to be the result of chance discoveries or in analogy with the use of malt.

In our work, of a theoretical nature, studying the effect of temperature on the activity of enzyme systems during starch hydrolysis by preparations of *A. niger* and *A. oryzae* we have shown the great effect of temperature in the activation of maltase of *A. niger* (Burger and Beran 1956). The validity of the established optimal temperatures during the hydrolysis of a 10% solution of soluble starch after 60 minutes of saccharification (*A. niger* 65° C, *A. oryzae* 55° C) has also been confirmed on potato flake mashes. At these optimal temperatures no evident inactivation of enzymes occurs. As iodine tests show, these temperatures are also in accordance with the optima for dextrination activity of the preparations used.

Optimal conditions for hydrolytic activity of preparations of the moulds *A. niger* and *A. oryzae* differ not only in optimal temperatures, but also in a different optimal pH and in the effect of changes in pH on their dextrination activity. The optimum pH for starch dextrination by the *A. oryzae* preparation is 6.1; when pH changes, particularly which in decreases, activity falls considerably. The behaviour of an enzyme preparation of *A. oryzae* is, therefore, similar to that of malt, the saccharification power which had completely disappeared when pH fell to 3.2, with increasing the temperature to above 55° C, when the temperature also inactivates  $\beta$ -amylase. These findings are in accordance with the well-known fact of the sensitivity of  $\alpha$ -amylase to lower values of pH. For this reason mashes prepared with malt cannot be acidified. Optimum pH for starch dextrination is 4.5 with the *A. niger* preparation

and corresponds therefore to the optimum pH for the activity of mould maltase. This is in accord with our previous findings (Burger and Beran 1956), that in *A. niger* preparations maltase causes hydrolysis of the whole starch molecule in isolation from  $\alpha$ -amylase. Fairly wide changes in pH, too, only have a slight effect on activity. This behaviour of *A. niger* preparations is probably connected with the physiological properties of the *A. niger* mould which is also capable of producing considerable amounts of acid. The possibility of using a lower pH during saccharification of potato mashes is of great importance for agricultural distilleries. It makes a considerable acidification of mashes during saccharification of starchy material possible and the conjoined effect of low pH and relatively high saccharification temperature must be evident in the microbiological purity of the mashes. Even during fermentation a pH of 4.5 affects the course of fermentation favourably and prevents the proliferation of undesirable infection.

#### Summary

The effect of temperature on the formation of fermentable sugars and the effect of pH on dextrination activity during starch and potato mash hydrolysis by enzyme preparations of the moulds, *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* (mould bran), were studied. The following facts were ascertained:

1. When studying the effect of temperature on the formation of fermentable sugars in saccharified potato mashes (time of saccharification 60 minutes), different optimal temperatures of effectiveness were found for each preparation: *A. niger* 65° C and *A. oryzae* 55° C.
2. At these temperatures 46.6% of fermentable substances in proportion to the starch present were found in the case of the *A. oryzae* preparation, 56.1% in the *A. niger* preparation.
3. Optimum saccharification temperature is also in accord with optimum dextrination activity.
4. The optimum pH for starch dextrination by *A. oryzae* preparations is 6.1%; changes in pH (especially a decrease) considerably lower dextrination.
5. The optimum pH for starch dextrination by the *A. niger* preparation is 4.5; changes in pH effect it only slightly.
6. The importance of low pH and relatively high temperature during saccharification of starchy material by the *A. niger* preparation for practical distilling has been ascertained.

#### Literature

- Adams, S. L., Balankura, B., Andreassen, A. A., Stark, W. H.: Submerged Culture of Fungal Amylase. *Ind. Eng. Chem.* 39 : 1615, 1947.
- Beran, K., Burger, M.: Nová gasometrická metoda stanovení cukrů vykvašováním za přítomnosti 2,4-dinitrofenolu. *Chem. listy* 49 : 1693, 1955.
- Burger, M., Beran, K.: K otázce mechanismu hydrolysy dextransu plisňovými enzymatickými preparáty. *Chem. listy* 48 : 1394, 1954.
- Burger, M., Beran, K.: O mechanismu účinku maltázy plisně *Aspergillus niger*. I. Vliv teploty na aktivaci hydrolysy škrobu plisňovými preparáty. *Chem. listy* 50 : 133, 1956.
- Green, S. R., Stone, I.: Fermentability of Wort Trisaccharide, a Factor in Variable Attenuations. *Wallerstein Lab. Comm.* 15, 51 : 347, 1952.
- Lu Cheng Hao, Fulmer, E. I., Underkofler, L. A.: Fungal Amylase as Saccharifying Agents in the Alcoholic Fermentation of Corn. *Ind. Eng. Chem.* 35 : 814, 1943.
- Lu Cheng Hao, Jump, J. A.: Microbiol. Amylase Preparation Conversion Agents for Alcoholic Fermentation. *Ind. Eng. Chem.* 37 : 521, 1945.

- Le Mense, E. H., Lohns, V. E., Corman, J., Blom, R. H., Van Lanen, J. M., Langlykke, A. F.: Grain Alcohol Fermentations: Submerged Mold Amylase as a Saccharifying Agent. *Ind. Eng. Chem.* 41 : 100, 1949.
- Roberts, M., Laufer, S., Stewart, F. D., Laletan, L. I.: Saccharification of Wheat by Fungal Amylases for Alcohol Production. *Ind. Eng. Chem.* 36 : 811, 1944.
- Schwene, L., Fulmer, E. I., Underkofler, L. A.: Saccharification of Starch Grain Mash for the Alcoholic Fermentation Industry. *Ind. Eng. Chem.* 32 : 544, 1940.
- Stárka, J.: Hodnocení amylolytických enzymových preparátů papírovou chromatografií. *Čs. biologie* 3 : 230, 1954.
- Takamine, J. O.: Enzymes of *Aspergillus oryzae* and the Application of its Amyloclastic Enzyme to the Fermentation Industry. *Ind. Eng. Chem.* 6 : 824, 1914.
- Teixeira, C., Andreassen, A. A., Kolachov, P.: Ethyl Alcohol from Casava. *Ind. Eng. Chem.* 42 : 1781, 1950.
- Underkofler, L. A., Fulmer, E. I., Schwene, L.: Saccharification of Starch Grain Mash for the Alcoholic Fermentation. Plant-scale Use of Mold Amylase. *Ind. Eng. Chem.* 38 : 980, 1946.
- Underkofler, L. A., Severson, G. M., Goering, K. J.: Saccharification of Grain Mash for Alcoholic Fermentation. Plant-scale Use of Mold Amylase. *Ind. Eng. Chem.* 38 : 980, 1946.
- Белозерский, А. Н., Проскуряков, Н. И.: Практическое руководство по химии растений. Москва 1951.
- Фениксова, Р. В.: Плесневые грибы из рода *Aspergillus* как продуценты амилазы. *Микробиология* 22 : 28, 1953.
- Климовский, Д. Н., Родзевич, В. З.: Амилолитические ферменты у аспергиллов. *Микробиология* 19 : 60, 1950.

## Изучение оптимальных условий осахаривания картофельных заторов плесневыми энзиматическими препаратами

К. БЕРАН и М. БУРГЕР

### Резюме

В своей предыдущей работе (Бургер и Беран 1956) мы установили, что в некоторых энзиматических препаратах, получаемых путем культивации плесени *Aspergillus niger*, молекулы крахмала подвергаются гидролизу под действием мальтазы. Таким образом, мальтаза в этих препаратах вызывает как декстринизацию, так и декстринолиз. Мы показали также, как велико влияние температуры на активность мальтазы. В настоящей работе мы исследовали оптимальные условия (температуру и рН) для деятельности этих препаратов при осахаривании картофельных заторов, аналогичных применяемым в производстве. Содержание крахмала в заторах доходило до 10%. Одновременно мы изучали оптимальные условия осахаривания картофельных заторов у плесневых препаратов из *Aspergillus oryzae*, содержавших из амилолитических энзимов преимущественно  $\alpha$ -амилазу. Мы исследовали также процесс образования несбраживаемых олигосахаридов при осахаривании картофельных заторов. Было установлено, что:

1. Различие между препаратами *A. niger* и *A. oryzae* в отношении образования сбраживаемых сахаров при 60-минутном осахаривании картофельных заторов проявляется в их оптимальных температурах (для *A. niger* 65° C, для *A. oryzae* 55° C).
2. Под действием препарата *A. oryzae* при этих температурах образовалось 46,6% сбраживаемых веществ, а под действием препарата *A. niger*, соответственно, 56,1% в пересчете на присутствующий крахмал.



3. Оптимальным температурам соответствует оптимальное декстринирующее действие.

4. Для осахаривания крахмала препаратом *A. niger* оптимальным является  $pH = 6,1$ , причем колебания  $pH$ , в особенности в сторону повышения кислотности, вызывает значительное понижение декстринизации.

5. Для осахаривания крахмала препаратом *A. niger* оптимальным является  $pH = 4,5$ , причем колебания  $pH$  оказывают на декстринизацию лишь незначительное влияние.

6. Обсуждается вопрос о значении низкого  $pH$  и сравнительно высокой температуры при осахаривании содержащих крахмал материалов препаратом *A. niger* в практике спиртокуривной промышленности.

## FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc. 6

### Cultivation Characteristics of Sulphate-reducing Bacteria

M. DOSTÁLEK and M. SPURNÝ

Institute of Oil Research, Biochemistry Department, Brno

Received February 15, 1956

Sulphate-reducing bacteria may be regarded as one of the most important groups of micro-organisms present in oil deposits. It has been demonstrated that a low sulphate content and the occurrence of hydrogen sulphide in typical samples of oil field waters is associated with activity of bacteria of the genus *Desulfovibrio* (Ginzburg-Karagičeva 1926, 1933, Bastin 1926, Bastin and Greer 1930, Ginter 1930). Many authors found that these bacteria act on oil hydrocarbons and some are of the opinion that the differences in the character of oil found at varying depths in the same area are connected with the activity of this physiological group of micro-organisms (Uspensky, Gorskaya and Karpova 1947, Tauson, Aleshina 1932, Novelli, ZoBell 1944, ZoBell 1950). An important role is also ascribed to sulphate-reducing bacteria in the genesis of oil (Porfiryev 1948, Radchenko 1951, Jankowski and ZoBell 1944) and in the releasing of oil from oil bearing materials (ZoBell 1947). The present paper sums up the results of experiments for investigating methods of culturing sulphate-reducing bacteria from oil deposits under laboratory conditions.

#### Material and Methods

The following nutrient medium was used for accumulating sulphate-reducing bacteria from samples of water from oil wells and for further cultivation:  $K_2HPO_4$  0.1%,  $NH_4Cl$  0.1%,  $CaCl_2$  0.01%,  $MgCl_2$  0.01%,  $Na_2SO_4$  0.1%,  $Na_2SO_3$  0.02%, ammonium lactate 70%, 0.5 ml./100 ml. nutrient medium, yeast extract 10 mg./100 ml. medium. The initial pH of the solution was adjusted to 7.0, the oxidation reduction potential to  $E_h$  values of about +50 mV. Traces of iron were added to the medium to determine the duration of the lag phase. The cultures were incubated in 50 ml. reagent bottles with glass stoppers. The inocula were taken from a three-day culture of sulphate-reducing bacteria. The inoculum formed 0.5% of the volume of the inoculated medium; 1 ml. of inoculum contained  $10^7$  bacteria. Incubation took place at a temperature of 32 °C, as a rule for six days. The number of bacteria was determined microscopically; these results were verified by comparing with a determination of the number of bacteria ascertained by the dilution method in a nutrient medium containing ammonium lactate. The hydrogen sulphide content of the cultures was determined polarographically, by measuring the anode waves in a medium of 0.1N NaOH (Hemala, Marek, Valčíková 1955).

In order to obtain sufficient material for testing cultivation conditions, sulphate-reducing bacteria were collected from 89 samples of water from oil wells in six different areas. After the fourth progressive re-inoculation of these cultures, the duration of the lag phase attained a certain value, which did not change on further culturing. The largest group contained cultures with a lag phase of about 18 hours and it was from this group that cultures were taken for further experimental work. The microscopic picture of this culture showed typical vibrio forms (figs. 1 and 2). On testing the purity of the culture on meat-peptone agar it was found that bacteria of the genus *Desulfovibrio* were accompanied in the culture by Gram negative sporulating bacteria and Gram positive cocci (figs. 3 and 4). Both accompanying micro-organisms occurred regularly in cultures of sulphate-reducing bacteria on progressive re-inoculation and their concentration was about two orders lower than that of the *Desulfovibrio* bacteria. From the physiological aspect, this mixed culture displayed stable properties under standard conditions of cultivation (length of lag phase, reduction of sulphates, production of hydrogen sulphide).

**Results**

In order to the influence of the initial pH and  $E_h$ , a nutrient medium containing lactate was used. When studying the influence of the initial pH, the oxidation-reduction potential of the medium was not modified ( $E_h + 350$  mV at pH 7) and when studying the influence of the oxidation-reduction potential, the initial pH 7 was maintained. Each experimental series was repeated three times. The results are shown in fig. 5 and tab. 1.

When studying the influence of growth substances, a condensed yeast extract of American origin was used (producer's name not given). After sterilising, a 1% solution of the extract was added to a medium containing lactate. Each experimental series was repeated four times. The results are given in tab. 2. The concentrations of yeast extract are expressed in mg. dry weight/100 ml. nutrient solution.

For ascertaining the influence of the concentration of sulphates on the development of sulphate-reducing bacteria, a nutrient solution containing lactate was used, with graduated amounts of sodium sulphate. The results are given in fig. 6.

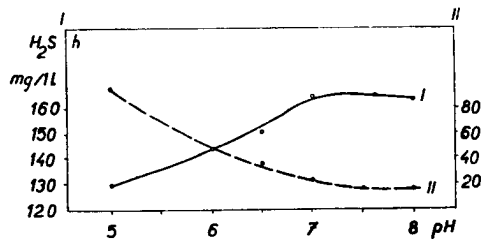


Fig. 5. Influence of initial pH on development of sulphate-reducing bacteria. Curve I: Production of hydrogen sulphide (mg./l) after 6 days. Curve II: Length of lag-phase in hours.

Table 1. Influence of Initial  $E_h$

Initial $E_h$	Length of lag phase in hrs.	Amount of $H_2S$ after 6 days in mg./l.
+ 350	36	149.5 ± 3.5
+ 202	24	151.5 ± 3.1
+ 110	24	165.2 ± 3.1
0	18	167.2 ± 2.8
- 22	18	168.3 ± 3.2
- 40	18	165.2 ± 3.2
- 60	24	165.3 ± 2.9
- 101	24	163.2 ± 3.6

Table 2. Influence of Yeast Extract

Yeast extract mg./100 ml.	Length of lag phase in hrs.	Amount of $H_2S$ after 6 days in mg./l.
0	48	150.4 ± 3.5
0.2	48	149.2 ± 4.2
0.5	48	146.4 ± 3.8
1	24	155.1 ± 3.9
3	24	158.1 ± 4.2
5	18	195.0 ± 5.2
10	18	182.2 ± 4.2
15	18	179.0 ± 4.2
20	18	170.3 ± 3.8
25	18	170.5 ± 3.9
30	18	171.2 ± 2.3
50	18	172.1 ± 4.2
100	18	174.2 ± 3.2

For ascertaining possibilities of evaluating the intensity of the development of sulphate-reducing bacteria, the following growth characteristics were studied in the course of cultivation: 1. The number of bacteria, 2. the amount of hydrogen sulphide produced, 3. changes in the oxidation-reduction potential. The nutrient solution with lactate which was used for these experiments had a pH of 7 and  $E_h$  of +48 mV. Five parallel cultures were observed. The results are shown in fig. 7.

In another experiment the influence of the age of a culture used as an inoculum on the development of sulphate-reducing bacteria was ascertained. The length of the lag phase of the inoculated culture was used as the criterion. In order to obtain values for comparison, 60 cultures of sulphate-reducing bacteria were inoculated simultaneously and incubated at 32° C in a thermostat. At selected time intervals,

sets of four cultures were removed and from these 16 culture bottles containing a medium of the same composition as the solution used for pre-cultivation were inoculated. The results of the experiment are given in tab. 3.

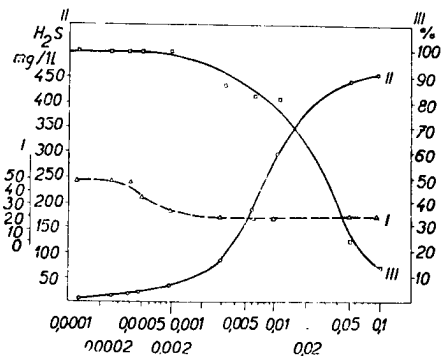


Fig. 6. Influence of concentration of sulphate in medium.  $x$ : log of concentration of  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  M in medium. Curve I: Length of lag phase in hours. Curve II: Production of hydrogen sulphide (mg./l.) after 6 days. Curve III: % sulphate utilisation.

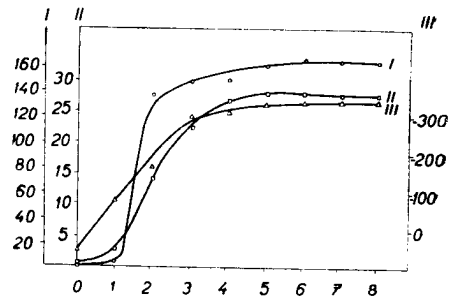


Fig. 7. Growth characteristics of sulphate-reducing bacteria.  $x$ : No. of days. Curve I: Production of hydrogen sulphide in mg./l. Curve II: No. of bacteria in  $10^8$ . Curve III: Oxidation-reduction potential (mV with pH 7).

### Discussion and Summary

A culture of sulphate-reducing bacteria isolated from oil field waters was used. In this culture, bacteria of the genus *Desulfovibrio* were accompanied by microflora not identified in detail. Cultures of this character were obtained by analysing the majority of samples from oil deposits. On progressive reinoculation, these mixed cultures maintained constant physiological properties. On the basis of these findings

it appears probable that a certain physiological relationship exists between sulphate-reducing bacteria and the accompanying microflora. In view of the fact that the action of mixed cultures of sulphate-reducing bacteria under natural conditions (water in oil wells) must also be taken into account, no attempt was made to obtain pure cultures for these experiments. The intensity of development of the culture was evaluated by measuring the production of hydrogen sulphide and by determining the length of the lag phase. Both methods of evaluation were in accord with each other (figs. 5 and 6).

In studying the influence of the initial pH on the development of sulphate-reducing bacteria from oil deposits, the optimum was found to be within the limits of pH 7 to 8 (fig. 5). The initial oxidation-reduction potential did not have any significant influence on the final amount of hydrogen sulphide produced, but had a marked effect on the length of the lag phase of the culture. The optimal medium proved to be one with a value of  $E_h$  within the limits of 0 to  $-40$  mV at a pH of 7 (see tab. 1). In accord with the data of other authors (Stárka 1951), these experiments

Table 3. Influence of Age of Culture

Age of pre-cult. culture in days	Length of lag phase of inoculated culture
2	20 hrs.
3	24 hrs.
4	30 hrs.
5	36 hrs.
6	38 hrs.
7	38 hrs.
10	5 days
12	8 days
16	13 days

show that only a small decrease in the oxidation-reduction potential of the medium is required for good development of sulphate-reducing bacteria (approx. below +150 mV at a pH of 7). The addition of yeast extract had a favourable effect. Discernible stimulation occurred at concentrations of 3—10 mg. extract in 100 ml. nutrient solution. It is difficult to compare this result with those described in the literature (Imshenetsky 1949, Starkey 1948), as these communications do not contain detailed information on the preparation of the yeast extract.

A study of the influence of the concentration of sulphate in the nutrient medium showed that with an increase in the concentration of sulphate there was also an increase in the total amount of hydrogen sulphide produced (fig. 6). A very low concentration of sulphate (0.0001 to 0.001 M) permits development of sulphate-reducing bacteria, but the growth curve of the culture in this medium shows a relatively long lag phase. Within the limits of these concentrations, the sulphate is more or less quantitatively reduced to hydrogen sulphide. As the concentration of sulphate increases, the percentage of utilization progressively decreases. This decrease is particularly evident in concentrations higher than 0.05 M. On the basis of these findings, the optimal nutrient medium may be considered to be one which contains 0.005 to 0.02 M of  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  (0.07 to 0.28%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydrous).

The results of observation of the growth characteristics of the culture showed that all the criteria used are suitable for ascertaining growth curves. In the curves showing the production of hydrogen sulphide and the number of bacteria, there is a marked lag phase lasting for approximately one day. This is not seen in the curve giving the oxidation-reduction potential of the medium. It may be assumed from this result that in the lag phase of proliferation of the bacteria the oxidation-reduction potential is regulated. At the commencement of the logarithmic phase of proliferation of the bacteria and of the production of hydrogen sulphide, the oxidation-reduction potential attains a value of approximately  $E_h - 40 \text{ m}$  at a pH of 7. This value is in accord with the optimal initial values of the oxidation-reduction potential found in previous experiments (see tab. 1). Under the given conditions the logarithmic phase lasts approximately up to the end of the fourth day of cultivation and the stationary phase up to the eighth day.

In the last series of experiments the influence of the length of pre-cultivation on activity of the inoculum was evaluated. It was found that a 2- to 3-day-old culture was the most satisfactory as an inoculum. In pre-cultivation longer than 10 days, the lag phase of the inoculated culture occupies a considerable time, its length varies greatly and the culture is thus unreliable for use in inoculating further cultures. The purpose of this work was to pave the way for a further, more detailed study of sulphate-reducing bacteria in oil deposits.

(Plates XXXVII, XXXVIII)

#### Literature

- Bastin, E. S.: The Presence of Sulphate Reducing Bacteria in Oil Field Waters. *Science* 63 : 21, 1926.
- Bastin, E. S., Greer, F. E.: Additional Data on Sulphate-reducing Bacteria in Soils and Waters of Illinois Oil Fields. *Bull. Am. r. Assoc. Petroleum Geol.* 14 : 153, 1930.
- Ginter, R. L.: Causative Agents of Sulphate Reduction in Oil-well Waters. *Bull. Amer. Assoc. Petroleum Geol.* 14 : 139, 1930.
- Ginzburg-Karagičeva, T. L.: Microflora of Oil Waters and Oil Bearing Formations and Biochemical Processes Caused by it. *Bull. Amer. Assoc. Petroleum Geol.* 17 : 52, 1933.
- Grossman, J. P., Postgate, J. R.: Cultivation of Sulphate Reducing Bacteria. *Nature* 171 : 600, 1953.

- Jankowski, G. J., Zobel, C. E.: Hydrocarbon Production by Sulphate Reducing Bacteria. *J. Bacter.* 47 : 447, 1944.
- Novelli, G. D., Zobel, C. E.: Assimilation of Petroleum Hydrocarbons by Sulphate-reducing Bacteria. *J. Bacter.* 47 : 447, 1944.
- Stárka, J.: Nové poznatky o mikrobiální redukci sulfátů. *Biologické listy* 32 : 408, 1951.
- Starkey, R. L.: Characteristics and Cultivation of Sulphate Reducing Bacteria. *J. Amer. Water Works Assoc.* 40 : 1291, 1948.
- Zobel, C. E.: Bacterial Release of Oil from Oil-bearing Materials. *World Oil* 126 : 36, 127 : 35, 1947.
- Zobel, C. E.: Assimilation of Hydrocarbons by Microorganisms. *Adv. Enzymol.* 10 : 443, 1950.
- Гинсбург-Карагичева, Т. Л.: Микробиологическое исследование серносоленых вод Апшерона. *Азербайджанское нефтяное хозяйство.* № 6—7 : 30, 1926.
- Имшенецкий, А. А.: Оптимальные питательные среды для десульфурствующих бактерий. *Микробиология* 18 : 324, 1949.
- Зубенчик, Л. И.: Сульфатредуцирующие бактерии. Москва 1947.
- Таусон, В. А., Алешина, А. И.: О восстановлении сульфатов бактериями в присутствии углеводов. *Микробиология* 1 : 229, 1932.
- Успенский, В. А., Горская, А. И., Карпова, И. П.: Генезис альгапитов и процессы анаэробного окисления нефти. *Изв. АН СССР, серия геол.* № 4 : 89, 1937.

## Культивационные характеристики десульфурствующих бактерий из нефтяных залежей

М. ДОСТАЛЕК и М. СПУРНЫЙ

### *Резюме*

Изучались предпосылки для лабораторной культивации десульфурствующих бактерий, изолированных из вод нефтяных залежей. Отбор культур был произведен из 89 образцов нефтяных вод, взятых из 6 нефтеносных областей. Для опытов применялись смешанные культуры, содержавшие бактерии рода *Desulfovibrio* с сопровождающей микрофлорой, которая точнее не определялась. Смешанная культура обладала постоянными физиологическими свойствами. Культивация производилась в питательной среде с молочнокислым аммонием. Для оценки развития культур применялись измерения продукции сероводорода (полярографические) и продолжительности латентной фазы культуры (по количеству осаждающегося сернистого железа (II)). Были получены следующие результаты: оптимальное исходное рН для культивации десульфурствующих бактерий лежит в пределах значений 7—8, оптимальный исходный окислительно-восстановительный потенциал питательного раствора — в пределах  $E_h$  от 0 до —40 mV при рН 7. Однако хороший рост культуры наблюдается уже при снижении окислительно-восстановительного потенциала ниже значения 150 mV при рН 7. Прибавление дрожжевого экстракта благоприятно действовало на развитие культуры: дозы в 3—10 мг сухого вещества экстракта дрожжей на +100 мл питательного раствора стимулировали продукцию сероводорода. Концентрация сульфата в питательной среде влияла на продолжительность латентной фазы и на продукцию сероводорода: при низких концентрациях (0,0001—0,001 mol.  $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ) сульфат натрия практически на 100% восстанавливался в сероводород, но латентная фаза культуры значительно удлинялась. Оптимальная концентрация сульфата в питательной среде была нами найдена в пределах 0,07—0,28%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Наблюдая продукцию сероводорода,

количество бактерий и изменение окислительно-восстановительного потенциала в ходе культивации, мы установили сроки длительности отдельных фаз развития культуры в питательной среде с лактатом. Латентная фаза при оптимальных условиях продолжалась 18—24 часа, фаза логарифмического роста 48—72 часа, стационарная фаза начиналась приблизительно с 8-го дня культивации. На кривой изменений окислительно-восстановительного потенциала латентная фаза не отражалась. Отсюда напрашивается вывод, что в течение латентной фазы размножения бактерий регулируется окислительно-восстановительный потенциал. Оптимальная продолжительность предварительной культивации перед дальнейшими пересевами это 48—72 часа. При более продолжительной, чем 10-дневной предварительной культивации латентная фаза культуры после пересева растягивалась на слишком длительные сроки, т. е. культура становилась непригодной для дальнейших пересевов. Произведенные нами работы служат подготовкой для дальнейшего, более подробного изучения десульфуризирующих бактерий нефтяных залежей.

*(Табл. XXXVII, XXXVIII)*

F O L I A B I O L O G I C A

Tom. II. (1956) — Fasc. 6

---

On the Question of Virus Receptors

The Selective Agglutinability of Erythrocytes of the Ground Squirrel  
(*Citellus citellus*)

L. BORECKÝ with the technical assistance of L. MASSOVÁ  
Institute of Virology, Czechoslovak Academy of Science, Bratislava

Received June 27, 1956

The discovery of the phenomenon of virus haemagglutination by Hirst in 1941 made it possible to elaborate various methods for the titration of different viruses or their antibodies. The importance of this discovery is emphasised by the fact that it has been used for a more detailed analysis of the properties of viruses (Burnet, McCrea, Stone 1946, Horvath et al. 1950, Koziński et al. 1953 etc.).

It appeared that this phenomenon is wide-spread among viruses (and also micro-organisms) and not only characteristic for viruses of the group mumps—Newcastle disease—influenza (MNI). The property of haemagglutination has, under suitable conditions, been demonstrated in an increasing number of viruses (Rivers 1952, Gajdamovitch-Shubladze 1954, Sweet 1954 etc.). Even today, after 15 years, a definite explanation for this phenomenon has not been given. Many considerations however, point to an enzymatic process during which, at least in the case of viruses of the MNI group, the receptor substance, situated either at the surface or in the wall of the cell, is disintegrated (Hirst 1942, Burnet, McCrea, Stone 1946, Hanig 1948, Ada, Stone 1950, Gottschalk 1953, Kradolfer 1954).

The phenomenon of haemagglutination is also a frequent subject of research because it is a model for the interaction between virus and cell. Even though it might be objected that the virus (according to present knowledge) does not multiply within the erythrocyte, yet there are many arguments in favour of such studies.

There is no doubt that:

1. Mechanisms preventing agglutination prevent infection (enzyme destroying receptors—RDE—Stone 1948, Fazekas de St. Groth 1948, Gottschalk 1953, polysaccharides—Horsfall, Ginsberg 1949, chlorophyllin—Barnard 1954).

2. Some virus are capable of agglutinating not only erythrocytes but also other animal cells (spermatozoa, fibroblasts, Chu 1953). The above also justifies the present study in which the existence of a specific receptor substance on the surface of erythrocytes of the ground squirrel (*Citellus citellus*) is demonstrated. This substance reacts selectively with some representatives of the group MNI.

*Material and methods*

*Erythrocytes* of the ground squirrel (*Citellus citellus*) were obtained by heart puncture. Their diameter is 5–6  $\mu$ , they have no nuclei and are circular. They differ from red cells of other laboratory animals by being Rh positive and having antigens of group AB. Hen erythrocytes were also obtained by heart puncture. Both kinds of red cells were tested, usually in parallel experiments.



*Virus:* The following were used:

1. Influenza virus type A: Strain PR8, Weiss;  
 type A': FM 1, Rhodes, Sweden, H<sub>2</sub>/52, Čs. 4/54, Čs. 5/54, Čs. 6/54;  
 type B: Lee, Čs. 49, Čs. 1/1952, Čs. 3/1952, Čs. 4/1952;  
 type C: C - 1233 (Taylor), RM 13/53 - Hung, Čs. 1/1952, Čs. 3/52.
2. Swine influenza virus: infl. suis Bratislava - 55 (Sw-55).
3. Mumps virus: Strain-Henle (Mu).
4. Virus of Newcastle Disease: Strain Bratislava (NDV).
5. Vaccinia Virus-Strain "Biogena" (Vakc.).

*The receptor destroying enzyme (RDE):* was prepared from the strain V. cholerae 4Z by passage through the allantois of 12-day-old chick embryos. The titre usually 1 : 512-1024.

*The haemagglutination titres* were determined by the test-tube method (Blaškovič et al. 1953).

*Disintegration of the erythrocyte receptors by the action of the virus* was determined according to White (1953).

*Disintegration of receptors by the action of RDE.* The method of White slightly modified (1953) was used. The degree of disintegration of virus receptors was determined in haemagglutination tests with 6 standard viruses of the group MNI.

The course of absorption and elution of virus on erythrocytes was determined according to Koziński, Mikulaszek and Sitek (1953).

### Results

1. It was ascertained that the ground squirrel erythrocytes are agglutinated by viruses of Influenza type B and C and atypically by the virus of Newcastle Disease (NDV) (the prozone was constantly present). Agglutination of ground squirrel erythrocytes was never observed with the virus of influenza type A, A', the virus of swine influenza, of mumps and of vaccinia. For the B strains of influenza virus, haemagglutination titres (with 0.5% erythrocytes) were about equal for ground squirrel and hen red cells. These titres were 4-8 times lower for ground squirrel than for hen when type C was used. Agglutination of ground squirrel red cells was about the same at 0° C, + 4° C and room temperature but was not observed at 37° C.

Elective agglutinability in the case of 5 B strains was confirmed using virus fluids of 10 different egg passages (strain Lee was from the 154th passage, the other strains from the 11th to 48th passage.) 4 C strains were tested on material from 5 passages (8th to 17th). Repeated tests for agglutinability of ground squirrel red cells with other representatives of the group MNI under different conditions of temperature, duration, incubation were repeatedly negative.

The above indicates the possibility of the practical use of ground squirrel erythrocytes for determining the type of an unknown virus (tab. 1).

2. The characteristics of the virus receptors on ground squirrel erythrocytes were studied with special reference to two virus strains with which the red cells agglutinate: virus Lee (type B) and virus C/Čs. 1952.

Table 1.

Agglutination of ground squirrel erythrocytes	Probable type of virus
+	1. Influenza virus type B 2. Influenza virus type C 3. (Virus of Newcastle disease)
-	1. Virus of influenza type A 2. Influenza virus type A' 3. Swine influenza virus 4. Mumps virus 5. Virus of Vaccinia

Note: ( ) - haemagglutination with the prozone.  
 Schematic Division of Tested Viruses According to Their Ability to Agglutinate Ground Squirrel Erythrocytes.

It was found that virus Lee is nearly quantitatively adsorbed on ground squirrel red cells within half an hour while for virus C the degree of adsorption is proportional to the amount of red cells added to the virus fluid (fig. 1).

Fig. 1B represents the adsorption of virus C on ground squirrel red cells after having been exposed to undiluted RDE. The degree of adsorption is found to be greater

on to red cells thus prepared than on to the same amount of normal ground squirrel erythrocytes. A similar effect of RDE on hen red cells could not be demonstrated.

Fig. 2 shows the course of adsorption and elution of virus Lee and C on to ground squirrel and hen erythrocytes (0.4 ml. of a 50% erythrocyte suspension per 1 ml. virus fluid).

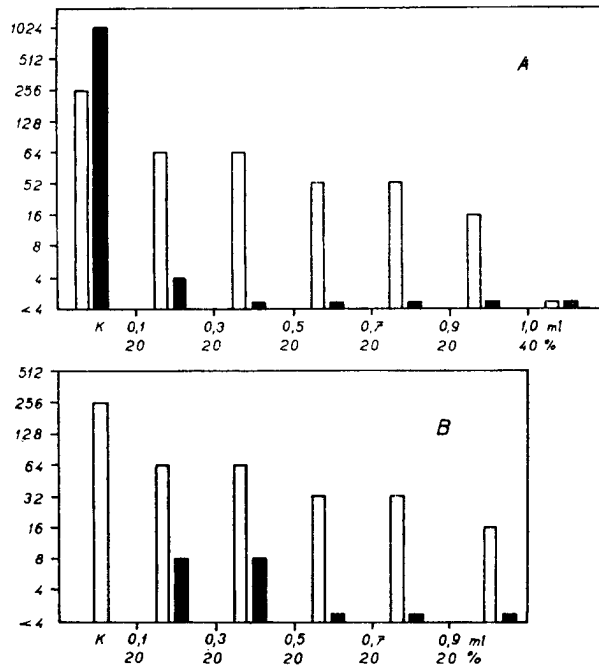


Fig. 1. A. Degree of adsorption of virus Lee and C on to different amounts of ground squirrel erythrocytes at 0° C. White column - virus C. Black column - strain Lee. B. Adsorption of virus C on to ground squirrel erythrocytes after previous action of RDE on the erythrocytes. K - control. White column - virus C. Black column - virus C after RDE. x: erythrocytes in ml. 20 and 40 % conc. y: titre of agglutination.

The curves are the same for both hen and ground squirrel erythrocytes. It can also be seen that preliminary adsorption and elution of virus Lee on to erythrocytes has no effect on adsorption and elution of virus C on to ground squirrel and hen erythrocytes. A similar phenomenon was observed on hen red cells by Hirst (1950).

3. When studying the ability of different viruses of the group MNI to destroy virus receptors on ground squirrel and hen erythrocytes, increased agglutinability

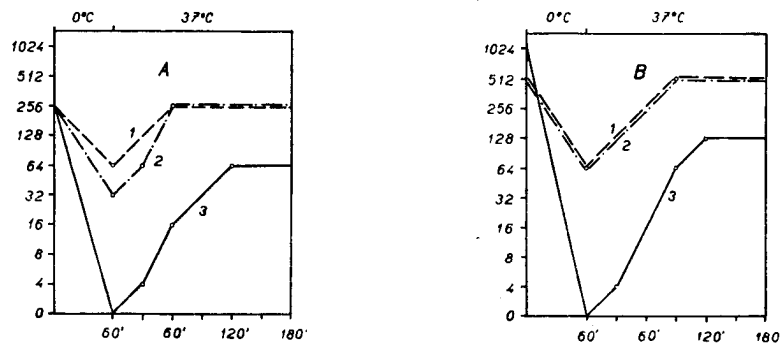


Fig. 2. The course of adsorption and elution of virus Lee and C on to ground squirrel (A) and hen (bird-B) erythrocytes. Curve 1 - C after Lee, 2 - C, 3 - Lee. x: time in min. at 0 and 37°C. y: titre of agglutination.

of ground squirrel erythrocytes by virus C was observed after preliminary treatment of those erythrocytes with virus Lee. This was specific for ground squirrel erythrocytes. A typical experiment is shown in tab. 2 (hen erythrocytes) and tab. 3 (ground squirrel erythrocytes).

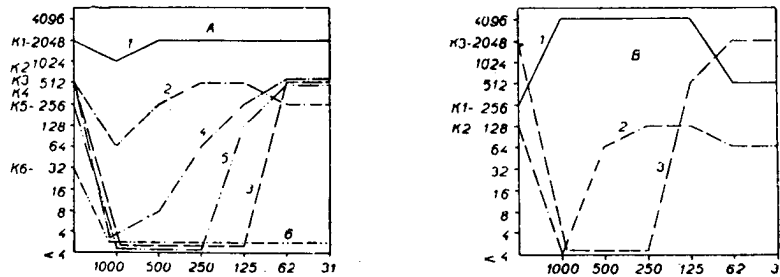


Fig. 3. The effect of RDE on receptors of hen (A) and ground squirrel (B) erythrocytes. Curve 1 — C 52, 2 — Lee, 3 — NDV, 4 — A' 54, 5 — PR 8, 6 — Mw. K — control titre. *x*: RDE units. *y*: titre of agglutination.

The experiments also demonstrate that the action of different viruses on ground squirrel erythrocytes does not affect the elective agglutinability of these erythrocytes (the red cells did not acquire the ability to agglutinate with virus of influenza A, A', mumps and swine influenza).

4. Samples of RDE had an effect similar to virus Lee, i. e. the haemagglutinating titre of ground squirrel erythrocytes with virus C increased considerably after previous incubation with RDE (1000—2500 IU).

Fig. 3 shows the receptor gradient based on the effect of RDE. Results with hen erythrocytes are in agreement with the literature (Burnet, McCrea, Stone 1946, Kozinski, Slonim 1952a, b, fig. 3a) and demonstrate that the method used was correct.

### Discussion

It was demonstrated that ground squirrel erythrocytes agglutinate electively with the viruses B, C and NDV. This can be utilised for diagnostic purposes for newly isolated or unknown virus strains. Comparisons of agglutinating and adsorbing characteristics of different red cells have been made several times (Hirst 1942, Burnet, Stone 1946, Horvath et al. 1950, Farkas 1950, Kozinski 1953 and others) but elective agglutinability within the group MNI was pointed out only by Tamm (1954) using cat erythrocytes. Horvath et al. (1950) mention that hamster red cells can be agglutinated with virus Lee but not with virus PR 8 and NDV

Table 2. Action of Viruses on Hen Erythrocyte Receptors.

Erythrocytes after action of virus	Haemagglutination tests with the viruses						
	PR 8	LEE	A' - 54	C - 52	NDV	Mu	Sw - 55
LEE	256	512*	256	2048	—	—	512
C - 52	512	512	512	—	1024	—	256
NDV	128	256	256	2048	—	—	256
Sw - 55	512	512	512	2048	1024	—	512
Control	512	512	512	2048	2048	64	512

\*) Titre of Lee dropped to 25 % in some cases after the action of virus LEE, in other cases it did not change.

Table 3. Action of Viruses on Ground Squirrel Erythrocyte Receptors

Erythrocytes after action of virus	Haemagglutination tests with the viruses						
	PR 8	LEE	A' - 54	C - 52	NDV	Mu	Sw - 55
LEE	—	128	—	4096	—	—	—
C - 52	—	256	—	—	512	—	—
NDV	—	256	—	256	—	—	—
Sw - 55	—	256	—	256	256	—	—
Control	—	512	—	128	512	—	—

but pay no further attention to this fact. We believe that a study and comparison of erythrocytes with specific receptors, extended by biochemical analysis, may throw further light on the problem of virus substrates and the question of the pathogenesis of virus diseases.

The effect of virus Lee and more concentrated samples of RDE on ground squirrel erythrocytes caused increased haemagglutinating titres when using virus C; an effect not observed before.

It is not possible to give an exact explanation for this phenomenon but our experiments are further confirmation of the conception of Koziński and Slonim (1952a, b, 1953) of the laminar arrangement of virus receptors on the surface of the red cell. These authors base their conception on the successive destruction of the more superficially situated receptors by viruses that are in a more advanced position of the receptor gradient. The present study on ground squirrel red cells indicates that it is correct to accept this conception as undiluted preparations of RDE and the action of virus Lee (situated at the end of the gradient for hen erythrocytes) make it possible to "uncover" receptors for virus C that, otherwise, is covered by certain insufficiently known structures of the cell surface.

This "uncovering" of the receptors is also indicated by the fact that the degree of adsorption of virus C on to ground squirrel erythrocytes is increased by the action of RDE. This was not observed in the case of hen red cells. It was, however, not possible to find an increased adsorption of virus C on to ground squirrel erythrocytes after the action of virus Lee. This question remains open for the time being as also others (Hirst 1950, Horvath et al. 1950) have pointed out that there is no agreement between agglutinability and adsorption power. It may be assumed that although there is a considerable similarity between the effects of virus and RDE, there are certain fine differences that may have played a part in our experiments. This difference has been pointed out by Stone (1947) from the point of view of the successive order of individual representatives of the receptor gradient. Attempts to influence agglutinability of ground squirrel erythrocytes using trypsin and diastase were unsuccessful and therefore are not considered here.

*Remark.* After receiving the virus type D (strain Sendai) we found that this virus was also able to agglutinate ground squirrel erythrocytes.

## Literature

- A da, G. L., Stone, J. D.: Electrophoretic Studies of Virus-red Cell Interaction: Mobility Gradient of Cells Treated with Viruses of the Influenza Group and the Receptor Destroying Enzyme of *V. cholerae*. *Brit. J. Exp. Path.* 31 : 263, 1950.
- B arn ar d, R. D., G o l d m a n, B., S t a n t o n, H. T.: Mechanism of Suppression of Hemagglutinating Viruses. *Science* 119 : 3090, 1954.
- B la š k o v i č, D. a spol.: Laboratorné metódy ve virológii. Bratislava 1953.
- B urn et, F. M., S t o n e, J. D.: The Hemagglutinins of Vaccinia and Ectromelia Viruses. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 24 : 1, 1946.
- B urn et, F. M., M c C r e a, J. F., S t o n e, J. D.: Modification of Human Red Cells by Virus Action. I. The Receptor Gradient for Virus Action in Human Red Cells. *Brit. J. Exp. Path.* 27 : 228, 1946.
- B urn et, F. M., S t o n e, J. D.: The Receptor Destroying Enzyme of *Vibrio Cholerae*. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 25 : 227, 1947.
- C h u, H. P.: The Agglutination of Spermatozoa by Viruses of Influenza, Mumps and Newcastle Disease. *Riass. delle comunicaz. VI. Congr. internaz. di microbiol. Roma* 2 : 20, 1953.
- F a r k a s, E.: Characterisation of Virus Strain Based on Their Action on Red Blood Cells. *Acta Physiol. Hung.* 2 : 87, 1950.
- F a z e k a s de S t. G r o t h, S.: Destruction of Influenza Virus Receptors in the Mouse Lung by an Enzyme from *V. Cholerae*. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 26 : 29, 1948.
- G a r e n, A., P u c k, T. T.: The First Two Steps of the Invasion of Host Cells by Bacterial Viruses. II. *J. Exp. Med.* 94 : 174, 1951.
- G o t t s c h a l k, A.: The Initiation of Cellular Infection by Viruses from: The Dynamics of Virus and Rickettsial Infections. New York 1953.
- H a n i g, M.: Electrokinetic Change in Human Erythrocytes During Adsorption and Elution of PR 8 Influenza Virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 68 : 385, 1948.
- H i r s t, G. K.: The Agglutination of Red Cells by Allantoic Fluid of Chick Embryos Infected with Influenza Virus. *Science* 94 : 22, 1941.
- H i r s t, G. K.: Adsorption of Influenza Hemagglutinins and Virus by Red Blood Cells. *J. Exp. Med.* 76 : 495, 1942.
- H i r s t, G. K.: The Relationship of the Receptors of a New Strain of Virus to those of the Mumps-NDV-Influenza Group. *J. Exp. Med.* 91 : 177, 1950.
- H i r s t, G. K.: Cited in T. Rivers. Philadelphia 1952.
- H o r s f a l l, F., G i n s b e r g, H.: The Chemotherapy of Virus Infections from: Evaluation of Chemotherapeutic Agents. New York 1949.
- H o r v a t h, I., S z o l l ö s y, E., I v á n o v i c s, C.: Distribution of the Receptor Substance of the Influenza and Related Viruses in the Tissue-Elements of Different Animal Species. I. The Virus Adsorbing Capacity and Agglutinability of the Erythrocytes of Various Vertebrates. *Acta Phys. Hung.* 3 : 77, 1950.
- K o z i ň s k i, A. W., M i k u l a s z e k, E., S i t e k, K.: Badania nad gradientem receptorowym. *Med. dosw. i mikr.* 5 : 457, 1953.
- K o z i ň s k i, A. W., S l o n i m, D.: Vliv endotoxických komplexů *S. typhosa* na virusovou haemagglutinaci. *Čas. lék. českých* 91 : 1054, 1952a.
- K o z i ň s k i, A. W., S l o n i m, D.: Vplyv frakceji komórkových *S. typhosa* na haemagglutinaeji wirusowa. *Med. dosw. i mikr.* 2 : 217, 1952b.
- K r a d o l f e r, F r.: Fermenthemmung und Virushemmung. *Schw. Zschr. Path. Bact.* 17 : 520, 1954.
- R i v e r s, T.: Viral and Rickettsial Infection of Man. Philadelphia 1952.
- S l o n i m, D.: Přispěvek ke studiu vzájemných vztahů mezi buňkou a virusy skupiny parotitis—newcastelská nemoc—chřipka. *Čs. hyg. epid. mikrobiol.* 2 : 176, 1953.
- S t o n e, J. D.: Lipid Hemagglutinins. *Austr. J. Exp. Biol. Med.* 74 : 501, 1946.
- S t o n e, J. D.: Comparison of the Action of *V. cholerae* Enzyme and Viruses on the Red Cell Surface. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 25 : 437, 1947.
- S t o n e, J. D.: Prevention of Virus Infection with Enzyme of *V. cholerae*. I. Studies with Viruses of Mumps influenza Group in Chick Embryos. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 26 : 49, 1948.
- S w e e t, B. H.: Properties and Antigenic Relationship of Hemagglutinins Associated with the Dengue Viruses. *J. Immunol.* 73 : 363, 1954.
- T a m m, I.: Influenza Virus-Erythrocyte Interaction. I. Reversible Reaction between Lee Virus and Cat Erythrocytes. *J. Immunol.* 73 : 4, 180, 1954.
- W h i t e, J.: The Position of Taylors 1233, Strain of Virus in the Human Red Cell Receptor Gradient. *Brit. J. Exp. Path.* 43/6 : 668, 1953.
- Г а й д а м о в и ч - Ш у б л а д в е, А. К.: Краткий курс практической вирусологии. Москва 1954.

К вопросу вирусных рецепторов. Об элективной склеиваемости эритроцитов суслика *Citellus citellus*

Л. БОРЕЦКИЙ

*Резюме*

Мы установили, что эритроциты суслика (*Citellus citellus*) агглютинируются вирусами группа типа В и С и вирусом ньюкальской болезни, но не агглютинируются вирусами типа А, А<sup>1</sup>, паротита, гриппа свиней и вакцинии. Наши заключения опираются на положительные результаты реакции гемагглютинации (протекавшей при +4 °С, при 0° С и при комнатной температуре) с 5 штаммами типа В, 4 штаммами типа С и 1 штаммом вируса ньюкальской болезни, а также на отрицательные результаты, полученные при тех же условиях с 2 штаммами типа А, 7 штаммами типа А<sup>1</sup>, 1 штаммом вируса гриппа свиней, 1 штаммом вируса паротита и 1 штаммом вируса вакцинии. Этим явлением можно пользоваться как диагностическим пособием при определении типа неизвестного штамма.

В деле решения вопроса размещения вирусных рецепторов на поверхности кровяных телец мы установили, что рецепторы для вируса типа С отчасти перекрываются клеточными структурами, которые можно удалить, воздействуя на них вирусами Lee и RDE, и этим «обнажить» рецепторы. «Обнажение» рецептора вируса С проявлялось повышением гемагглютинационного титра, а под влиянием фермента, разрушающего рецепторы (RDE) — и усилением адсорбции на кровяные тельца.

*Примечание.* После получения вируса гриппа типа D (штамм Sendai) мы убедились, что этот вирус также агглютинирует эритроциты суслика.

## FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc. 6

### The Action of Streptomycin on the Flagellate *Euglena gracilis* Klebs

J. VÁVRA

Protozoology Laboratory, Czechoslovak Academy of Science, Praha

Received April 13, 1956

In studying apochlorosis caused by streptomycin in *E. gracilis*, it was first of all necessary to investigate the toxicity of streptomycin for this protozoon. Toxicity is closely related to inhibition of growth of a culture, both factors actually coinciding with each other. In the further work we shall therefore distinguish: a) immediate toxicity (24 hours), as *toxicity* and b) protracted toxicity (over 24 hours) as *inhibition*. The first part of this communication deals with *toxicity*, the second with *inhibition*.

#### I. The Toxicity of Streptomycin

As stated by Jirovec (1949), the toxicity of streptomycin for *Euglena gracilis* is very small; even 25% streptomycin does not display any toxic action in a 24-hour experiment.

For our experiments, various strains of *E. gracilis* were used, which had been cultured in the Protozoology Laboratory of the Czechoslovak Academy of Science (Provasoli strain = *E. gracilis*, var. *urophora*). The culture medium was composed of 2 g. Na acetate, 5 g. peptone, 0.5 g. Difco yeast extract, 1,000 ml. redistilled water, pH 6.8. The cultures were kept in a lighted thermostat at a temperature of 25° C. The following series of dilutions were tested: 100,000 units/ml., 50,000 units/ml., 25,000 units/ml., 10,000 units/ml., 5,000 units/ml. Toxicity was studied in a normal 24-hour experiment as described by Jirovec (1947). Streptomycin partially inactivated by boiling was used as control. It was found that *E. gracilis* reacted to these high concentrations of streptomycin chiefly by complete, or at least partial, loss of motility. In a number of *Euglenas* this loss is reversible and after a time some of them regained their motility and swam normally, even in the highest concentrations. It was further found that different strains react differently to large doses of streptomycin. The six strains tested can be divided roughly into two groups. The group of the Mainx, Dusi II and Provasoli strains lose little of their motility and soon regain it. The Dusi I, Pringsheim and Lwoff strains lose their motility to a far greater degree and have difficulty in regaining it. These two groups also differ in other of their physiological properties (the first group grow at 28° C and are bleached by streptomycin, the second group do not grow at 28° C and are not ordinarily bleached by streptomycin). It was further found that after large doses of streptomycin, the majority of *Euglenas* remained alive and retained their ability to proliferate. Osmotic pressure does not probably participate in the changes described, since with a concentration of 100,000 units/ml. it does not quite reach 5 atmospheres, whereas *E. gracilis* just tolerates 0.2 M saccharose, the osmotic pressure of which is precisely 5 atmospheres. The morphological picture of the action of streptomycin and of high osmotic pressure also differ.

## II. Inhibition of Growth of Cultures by Streptomycin

As ascertained by Jirovec (1949), the action of streptomycin on protozoa is mainly of an inhibitory character. In *E. gracilis*, inhibition is approximately the same in the light as in the dark. Provasoli et al. (1948) came to different conclusions. In experiments with *E. gracilis* var. *bacillaris* they observed that streptomycin retarded growth in the light, not in the dark. In their experiments, some types of *Astasia* were likewise not inhibited even with doses of 5,000  $\mu\text{g./ml.}$  streptomycin.

### Material and Method

The observations were carried out in the same strains as used in the experiments for toxicity, which were also cultured under the same conditions. The amount of streptomycin tested was the same in all the experiments, viz. 1,000  $\mu\text{g./ml.}$  dihydrostreptomycin sulphate. Care was taken that the amount of each individual strain inoculated was always the same; inoculation was therefore carried out quantitatively by the method described by Vávra (1956, in press). The organisms were counted in a Bürker chamber. The number resulting from division of the average number of organisms in an untreated culture by the average number of organisms in a culture treated with streptomycin was taken as the inhibition index, i. e. control under specific conditions/ experiment under the same conditions = index of inhibition. Index 1.0, therefore, means that inhibition has not occurred. The same applies to indices less than 1.0 (which means that there are actually more cells in the culture treated with streptomycin than in the control). Indices up to 1.1 indicate weak inhibition, which may still be within the limits of experimental error. If the index rises, inhibition also rises, and vice versa.

### Results

The Mainx, Dusi II and Provasoli strains (var. *urophora*), cultured in the light: in all these strains, discernible inhibition occurs in the light. The inhibition index is small at first, but in time increases (tab. 1).

It is interesting to compare the inhibition index with the dose of streptomycin which causes bleaching of the various strains. The lower the inhibition index, the less the possibility of bleaching (i. e. larger doses of streptomycin are required) and thus the chloroplast remnants are retained longer.

Table 1.

Inhibition Index		
Strain	5 days	7 days
Mainx	1.2	1.8
Dusi II	1.0	1.4
Provasoli	1.7	5.0

Table 2.

Inhibition Index		
Strain	6 days	8 days
Mainx	0.8	1.0
Dusi II	0.9	1.0
Provasoli	1.0	0.8

The Mainx, Dusi II and Provasoli strains cultured in the dark: in all these strains inhibition does not occur in the dark. The average number of organisms in cultures without and with streptomycin is approximately the same—there are actually even more cells in cultures treated with streptomycin (tab. 2).

From the facts given above it may be concluded that in the Mainx, Dusi II and Provasoli strains true inhibition does not occur (in the sense of protracted toxicity), either in the light or dark. The result in the dark is absolutely clear, but in light there still remains the fact that the density of the *Euglena* population is far greater in cultures not treated with streptomycin. This, however, may be explained by the



phenomenon that owing to the action of the streptomycin these strains lose their chloroplasts, as a result of which they also lose the advantages of photosynthesis. Their proliferation is therefore slower as compared with the green control Euglenas. The increase in the inhibition index may be explained partly by exhaustion of nutrient material from the culture, as a result of which the conditions for Euglenas which have lost their capacity for photosynthesis are worsened still further. The cytological picture of the loss of chloroplasts in these strains may also explain an increase in inhibition. As will be demonstrated in further communications, the chloroplasts are lost by not completing their growth on division and thus becoming progressively fewer. In Euglenas affected by streptomycin, therefore, the capacity for photosynthesis decreases and their division is thereby retarded.

Streptomycin acts on these strains, therefore, in a similar manner to transfer into the dark.

The Dusi I, Pringsheim and Lwoff strains, cultured in the light: In these conditions, the inhibition index reaches higher values at the outset of the experiment than in the further course of growth of the culture, i. e. in an opposite manner from the other strains (tab. 3).

In checking the growth of these strains, longer periods had to be selected, because of their slow growth.

Dusi I, Pringsheim and Lwoff strains cultured in the dark: Under these conditions strong inhibition was found (tab. 4).

Table 3.

Inhibition Index		
Strain	12 days	19 days
Dusi I	3.1	1.5
Pringsheim	1.6	1.1
Lwoff	1.2	1.0

Table 4.

Inhibition Index		
Strain	14 days	21 days
Dusi I	growth insuff.	3.0
Pringsheim	growth insuff.	6.4
Lwoff	1.8	2.3

These strains do not become apoplastidic through the action of streptomycin. We assume that in these strains streptomycin interferes in some metabolic processes by means of which the organism utilizes organic substances from the environment for its nutrition, much as described by Umbreit (1951). This is evidently the reason why there is at first only small inhibition in the cultures kept in the light, since these cannot very well utilize organic substances from the environment; their photosynthetic capacity is not, however, damaged and they therefore grow quite well. In the green cells of the controls, proliferation is at first more rapid; in this case the Euglenas are both photosynthetic and also utilize organic substances. In time, however, the organic substances are exhausted and further proliferation is therefore retarded. Euglenas treated with streptomycin, however, continue to be photosynthetic and in time the number of cells in the control culture and in the culture treated with streptomycin equalize. In a decrease in the inhibition index, however, disintegration of the streptomycin or adaptation of the organism may play a part. The inhibitory effect is far more evident in cultures in the dark, since it is not concealed by photosynthesis.

### *Discussion*

It is evident that the apparently contrasting results of Jírovec and Provasoli do not basically conflict with each other and that the results obtained by these two authors do not exclude each other. The lack of agreement may be explained by the physiological variability of the various strains of *E. gracilis*.

### *Summary*

True inhibition of growth of cultures of *E. gracilis* by the toxic action of streptomycin was found only in the strains Dusi I, Pringsheim and Lwoff. This inhibition was clearly evident only in culturing these strains in the dark, when it was not concealed by photosynthesis. Inhibition in the strains Mainx, Dusi II and Provasoli in light is only apparent and is due to the fact that the Euglenas of these strains become apochloroplastidic owing to the streptomycin and thus lose the advantages of photosynthesis and therefore proliferate more slowly than the green control Euglenas. This inhibition is therefore secondary and non-specific (darkness produces a similar effect). When the Mainx, Dusi II and Provasoli strains are cultured in the dark, the action of streptomycin dose not cause inhibition.

### Literature

- J í r o v e c, O.: Použití nálevníka *Glaucoma pyriformis* k testování ve farmakologii. Věst. zool. spol. 11 : 206, 1947.
- J í r o v e c, O.: Der Einfluss des Streptomycins und Patulins auf einige Protozoen. *Experientia* 5 : 74, 1949.
- J í r o v e c, O.: Účinek antibiotik na některé prvoky. Věst. Čs. zool. spol. 13 : 216, 1949.
- N a r d o n e, M. N., B l a s c z y n s k i, J. H.: Growth Effects Induced in *Tetrahymena pyriformis* by Streptomycine and its Components. *J. Exp. Zool.* 125 : 419, 1954.
- P r o v a s o l i, L., H u n t e r, S. H., S c h a t z, A.: Streptomycin-induced Chlorophyll-less Races of *Euglena*. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 69 : 279, 1948.
- P r o v a s o l i, L., H u n t e r, S. H., P i n t n e r, I. J.: Destruction of Chloroplasts by Streptomycin. *Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol.* 16 : 113, 1951.
- P r o v a s o l i, L.: The Phytoflagellates. In Lwoff: *Biochemistry and Physiology of Protozoa*. New York 1951.
- R o s e n, W. G.: Plant Growth Inhibition by Streptomycine and Its Prevention by Manganese. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 85 : 385, 1954.
- U m b r e i t, W. W., S m i t h, P. H., O g i n s k y, E. L.: The Action of Streptomycin. V. The Formation of Citrate. *J. Bact.* 61 : 595, 1951.

## Действие стрептомицина на жгутиковых *Euglena gracilis* Klebs

Ю. ВАВРА

### *Резюме*

#### Токсичность стрептомицина

За токсичность стрептомицина принималась только токсичность, проявлявшаяся при краткосрочном опыте в течение 24 час. Испытывались разведения: 100.000 ед/мл, 50.000 ед/мл, 25.000 ед/мл, 10.000 ед/мл и 5.000 ед/мл. Использовались различные штаммы *Euglena gracilis* (штамм Provasoli это *E. gracilis* var. *ugorhoga*). Было установлено, что на такие высокие концентрации стрептомицина *Euglena* реагирует, главным образом, полной — или по крайней мере

частичной — утратой подвижности. Но у части особей это явление обратимое, и через некоторое время эти клетки *Euglena* даже при максимальной из исследуемых концентраций становятся подвижными и плавают нормально. Далее было установлено, что различные штаммы *E. gracilis* различно реагируют на действие больших доз стрептомицина. В общем все 6 исследовавшихся штаммов можно разделить на 2 группы: группа штаммов Mainx, Dusi II, Provasoli теряет подвижность в очень незначительной степени и вскоре снова ее приобретает, тогда как штаммы Dusi I, Pringsheim, Lwoff теряют ее в гораздо более значительной степени и вновь приобретают с трудом. Обе группы отличаются друг от друга и в других отношениях (первая группа растет при 28 °С и хорошо обесцвечивается стрептомицином, вторая группа этих признаков не имеет). Было установлено также, что большая часть *Euglena* выживает и под действием больших концентраций стрептомицина и сохраняет способность к размножению. Повидимому, осмотическое давление не влияет на описываемые изменения, так как при 100.000 ед/мл стрептомицина оно не достигает 5 атмосфер, тогда как *E. gracilis* переносит 0,2 м сахарозу, где осмотическое давление составляет 5 атм. Морфологические картины действия стрептомицина и высокого осмотического давления также неодинаковы.

#### Подавление роста культуры под действием стрептомицина

За меру подавления была принята длительная (больше 24 час.) токсичность стрептомицина, отражающаяся на скорости роста культуры. Опыты производились с постоянным количеством стрептомицина — 1000 ед/мл дигидрострептомицинсульфата. За *индекс подавления* была принята дробь, возникающая от деления среднего количества клеток контрольной культуры на среднее количество клеток культуры, подвергавшейся действию стрептомицина. Чем выше этот индекс подавления, тем больше тормозится рост культуры исследуемым веществом. У штаммов Mainx, Dusi II, Provasoli (*E. gracilis* var. *ugrophaga*), выращиваемых на свету, наблюдается заметное и с течением времени повышающееся подавление. У отдельных штаммов этой группы индексы подавления роста различны. Чем меньше индекс, тем меньше и обесцвечивание и тем дольше удерживаются остатки хлоропластов. При выращивании этих штаммов в темноте угнетение не наблюдается. Мы полагаем поэтому, что токсическое действие стрептомицина не угнетает роста культур этих штаммов, но так как под влиянием стрептомицина эти штаммы теряют хлоропласты, то клетки, пораженные стрептомицином, лишаются преимуществ фотосинтеза и принуждаются размножаться медленнее. Итак, стрептомицин действует на эти штаммы таким же образом, как и помещенные в темноту.

При выращивании на свету штаммов Dusi I, Pringsheim, Lwoff индекс подавления роста вначале достигает значительных величин и постепенно снижается. При культивации в темноте у этих штаммов наблюдается сильное угнетение роста. Под действием стрептомицина эти штаммы не утрачивают пластиды. Поэтому мы полагаем, что стрептомицин влияет на какие-то процессы обмена, с помощью которых организм использует для питания органические вещества среды. В темноте подавление роста культуры оказывается гораздо сильнее, так как здесь оно не завуалировано фотосинтезом. Итак, очевидно, что между мнимо противоречивыми результатами работ Йировца (1949) и Provasoli (1948) нет принципиальных противоречий и что данные обоих авторов не исключают друг друга. Различия могут объясняться значительной физиологической изменчивостью штаммов *E. gracilis*.

## FOLIA BIOLOGICA

Tom II. (1956) — Fasc. 6

### Bemerkungen zur Interferenz der Tabak-Mosaikvirusstämme

C. BLATTNÝ

Biologisches Institut der Tschechl. Akademie der Wissenschaften, Praha

Eingelangt am 10. 4. 1956

Der Befund von Mc Kinney (1929) und Thung (1931), dass die in allen Teilen mit einem milden Tabak-Mosaikvirusstamm (VTM) infizierten Tabakpflanzen an einem strengen Stamm desselben Virus nicht mehr erkranken, ist zum Gemeingut der Pflanzenvirologie geworden und dient der Feststellung des Verwandtschaftsverhältnisses von Viren. Diese Erscheinung war bereits Gegenstand umfassender Berichte (Benett 1951, Ryžkov 1935, Bawden 1950) und gab Anlass zu wichtigen Folgerungen. So hat Matthews (1949) nachgewiesen, dass diese Gesetzmässigkeit in bestimmten Grenzen ihre Gültigkeit besitzt: bei zehn Stämmen derselben Virusart stellte er fest, dass diese Stämme die Pflanze bei Kreuzinokulation desto mehr schützten, je näher sie serologisch verwandt waren. Die auf den angeführten Befunden gegründeten Schlüsse waren unserer Meinung nach allzu sehr von tiervirologischen Gesichtspunkten beeinflusst. Den Anschauungen des Akademikers Némec (mündliche Mitteilung 1955) beipflichtend, dass Tiere und Pflanzen nur die grundlegendsten Funktionen gemeinsam haben, erachteten wir auch einen nur teilweisen Vergleich immunologischer Vorgänge bei Pflanzen und Tieren als nicht befriedigend. In den Jahren 1953—1955 hatten wir Gelegenheit, mit mehreren VTM-Stämmen zu experimentieren, wobei teilweise Resultate erzielt wurden, die sich von den bisherigen unterscheiden. Unsere Arbeitsergebnisse aus den Jahren 1953 und 1954 haben wir bereits zusammengefasst (Blattný 1955) und verweisen auf die in dieser Arbeit angeführten Einzelheiten. Im Jahre 1955 konnten wir diese Befunde an Hand weiterer Versuche, über die hier berichtet wird, bestätigen.

#### Material und Methodik

*Material.* 1. Der Stamm eines gewöhnlichen Tabak-Mosaikvirus (weiter VTM Typ), der aus Zigaretten der Marke „Partyzánky“ isoliert wurde und daher wahrscheinlich slowakischen Ursprungs war, beeinflusste das Wachstum der Tabakpflanzen wenig und verursachte auch bei den jüngsten Pflanzen niemals ein Absterben. An den Blättern rief er neben ungleichmässig grünen oder grünen „Blasen“ grössere oder kleinere Deformationen hervor.

2. Der aus *Physalis franchettii* isolierte Alke-Stamm VTM (weiter VTM AL) verursachte bei dieser Pflanze und bei *Physalis alkekengi* weisse Flecke, grüne Blasen und Deformationen. Bei *N. tabacum* Samsun erscheinen dieselben Symptome, jedoch sind hier die Deformationen weniger umfangreich, und die Infektion verläuft bei jungen Pflanzen tödlich. Bei *N. sylvestris* kommt es zu einem Absterben des Vegetationspunktes und bei systemischer Erkrankung zu einer sekundären Nekrose der Blätter, bei älteren Pflanzen zur Bildung weisser Flecken (Blattný 1955).

3. Der VTM-Stamm C (weiter VTM C), der uns freundlicherweise von Prof. Klinkowski zur Verfügung gestellt wurde, stammt von Kassanis (Rothamsted). In den Symptomen ähnelt er dem vorgenannten Stamm und bewirkt wie dieser bei *Physalis alkekengi* und *P. franchettii* Dekolorationserscheinungen. Die beim Goldenen Virginientabak auftretenden Symptome sind unterschiedlich. Die Wirkung dieses Stammes auf *N. tabacum* ist wesentlich milder als die von VTM AL.

4. Der „Streifen“-Stamm (weiter VTM S) wurde von Svobodová (1954, mündliche Mitteilung 1955) aus VTM AL durch Kultivierung auf den in Erlenmeyerschen Kolben auf Agar gezogenen Tabakpflanzen und Übertragung auf Pflanzen in normalem Milieu gewonnen. Es handelt sich um einen milden und auf das Wachstum der Tabakpflanzen noch schwächer wirkenden Stamm als der in unseren Versuchen verwendete Stamm VTM Typ. Bei *N. tabacum* ruft er typische „Streifen“-Dekolorationen hervor.

**Methoden.** A. Inokulation mit einem Stamm und nach Eintritt der Initialsymptome einer systemischen Infektion Inokulation des zweiten Stammes.

B. Inokulation mit einem Stamm und vor dem Auftreten der Initialsymptome einer systemischen Infektion Inokulation mit dem zweiten Stamm.

C. Inokulation mit einem Stamm und nach Manifestation der systemischen Erkrankung der ganzen Pflanze Inokulation mit dem zweiten Stamm.

D. Inokulation eines Gemisches zweier Stämme in verschiedenen Konzentrationen.

E. Zur Detektion der „farbigen“, d. h. der durch Dekoloration in Erscheinung tretenden Stämme VTM AL und VTM S wurden junge Sämlinge von *Physalis alkekengi* verwendet, bei denen sich jeder dieser Stämme auf unterschiedliche Weise manifestierte. VTM AL wirkt auf die Pflanzen am vehementesten, sie gehen teilweise ein, teilweise verkümmern sie und auch die jüngsten Blätter werden weiss. Ähnlich, aber schwächer wirkt VTM C, wobei die jüngsten Blätter gleichfalls dekoloriert werden. VTM S verursacht schwach gelbliche Dekolorationen, doch bleiben, besonders zu Beginn der systemischen Erkrankung, die jüngsten Blätter grün. Für VTM Typ ist *Physalis alkekengi* (und *P. franchetii*) ein symptomloser Träger.

In allen Fällen wurde das Inokulum in die mit einem Abrasionsmittel (Karbonrundpulver 320-Mesh.) lädierte Blattepidermis von *N. tabacum* Samsun appliziert, und zwar zunächst in der Phase der 2–8 echten Blätter am 1. bis 4. echten Blatt, hierauf auf dem nächstfolgenden Blatt. In jeder Serie wurden Pflanzen der gleichen Wachstumsphase und zur Inokulation Blätter der gleichen Wachstumsklasse verwendet. Die bei jeder Versuchskategorie gleich grossen Versuchsserien umfassten 5–50 Pflanzen. Zur Detektion dienten Sämlinge von *Physalis alkekengi* mit 2 Paaren echter Blätter, die Serien zählten 5–20 Pflanzen. Die Versuche dauerten von Ende Mai bis Ende Juli an, also in der Zeit mit einem für das Auftreten der Symptome des VTM sehr günstigen Licht- und Wärmegenus (16–26 °C).

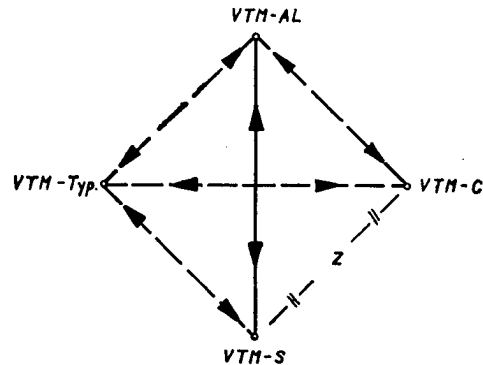


Diagramm der wechselseitigen „Schutz“-Wirkung von VTM-Stämmen. ----- Fehlende oder scheinbare „Schutz“-Wirkung. ————— Tatsächliche „Schutz“-Wirkung. Pfeile bezeichnen den gegenseitigen „Schutz“. z = nicht durchgeführter Versuch. Verwendete Stämme: VTM Typ, VTM AL, VTM C, VTM S.

### Ergebnisse

1. Bei Anwendung der Methoden A und B stellten wir fest, dass zwischen VTM AL und VTM C keine wechselseitige Schutzwirkung besteht.

2. Bei Anwendung der Methode B wurde das Fehlen einer wechselseitigen Schutzwirkung zwischen VTM C und VTM Typ festgestellt.

3. Bei Anwendung der Methoden A, B und C stellten wir fest, dass VTM AL und VTM S wechselseitig schützend wirken.

4. Bei Anwendung der Methoden A, B und C beobachteten wir, dass VTM Typ weder gegen VTM AL noch gegen VTM S schützt. Sofern bei der Methode C VTM AL oder VTM S symptomatisch nicht in Erscheinung traten, konnte die Anwesenheit dieser Stämme in der Tabakpflanze durch Inokulation auf *Physalis alkekengi* nachgewiesen werden.

5. Bei Anwendung der Methoden A, B und C konnten wir schliesslich feststellen, dass VTM L A und VTM S gegenüber VTM Typ, der sich mit charakteristischen Symptomen manifestierte, keine Schutzwirkung ausübte.

Daraus kann auf eine nahe Verwandtschaft zwischen VTM AL und dem aus ihm hervorgegangenen Stamm VTM S geschlossen werden und ebenso auf eine weniger

nahe Verwandtschaft von VTMA L und VTMS mit VTM Typ sowie zwischen VTMA L und VTM C, obwohl letztere sich symptomatisch sehr ähnlich sind.

Wenn bei einigen Pflanzen die Infektion mit einem nichtfarbigen Stamm (VTM Typ) vor Erkrankung an einem farbigen Stamm (VTMA L oder VTM C) „schützte“, so konnte durch Detektionsokulation auf *Physalis alkekengi* festgestellt werden, dass diese Schutzwirkung nur scheinbar war. Wurde nämlich der Saft von Pflanzen, die nur die Symptome einer Infektion mit dem Stamm VTM Typ aufwiesen, mittels RT-Methode unter Verwendung von Karborundumpulver auf *Physalis alkekengi* übertragen, so löste er ein für die Stämme VTMA L und VTM C charakteristisches Krankheitsbild (weisse Flecke u. dgl.) aus.

Es scheint, dass eine tatsächliche Schutzwirkung vor VTMA L durch Infektion mit VTM S erzielt werden kann, da solche Pflanzen nach Impfung mit einem VTMA L-Stamm keinerlei Anzeichen der Anwesenheit dieses Stammes aufwiesen. Durch Inokulation des Saftes dieser Pflanzen auf *Physalis alkekengi* wurden nur die für den VTM S-Stamm charakteristischen Symptome (grünes jüngstes Blatt, die untersten Blätter mit gelbgefärbten Adern und nicht begrenzten helleren Flecken) hervorgerufen und keinesfalls das für eine Infektion mit dem VTMA L-Stamm typische Krankheitsbild (weisse, begrenzte Fleckenbildung, Blasen, aufgewölbte Flächen zwischen den Adern, manchmal auch Blattdeformationen).

II. Bei Anwendung der Methoden A, B und C stellten wir bei einigen Pflanzen nach einem veränderlichen Verlauf der komplexen Erkrankungen in dem Auftreten der Symptome ein Übergewicht des einen Stammes über den anderen fest. Bei Kombination von VTMA L und VTM Typ, oder VTM C und VTM Typ oder VTM S und VTM Typ war es regelmässig der VTM Typ-Stamm, der in der Mehrzahl der Fälle symptomatisch vorherrschte.

Der Gesamtverlauf und das Endstadium der Erkrankungen war in solchen Fällen leichter als nach alleiniger Infektion mit einem schweren Stamm (VTMA L oder VTM C), sodass man von einer symptomatologischen „Verdrängung“ des einen Stammes durch den anderen sprechen könnte, wenn nicht eine Detektionsokulation auf *Physalis alkekengi* zeigen würde, dass es sich nur um eine scheinbare Verdrängung handelt. Die Stämme VTMA L oder VTM C waren auch weiterhin in der Pflanze anwesend, nur blieben ihre Symptome verdeckt. Bei einem Übergewicht von VTM Typ über VTM S war der Krankheitsverlauf im Endstadium schwerer als nach alleiniger Erkrankung am VTM S-Stamm.

VTM C und besonders VTMA L sind für die Tabakpflanze schädlicher als VTM Typ, aber (besonders VTMA L) etwas weniger ansteckend als VTM Typ (Blatný 1955). Auch VTM S ist weniger ansteckend als VTM Typ. Auf die im Verhältnis zu VTM Typ geringere Übertragbarkeit von VTMA L (Blatný 1955) schliessen wir aus drei Gründen: a) bei gleichem Inokulationsmodus ist die Zahl der positiv verlaufenden Infektionen bei Verwendung von VTM Typ grösser als bei VTMA L; b) die Zahl der Läsionen bei *N. glutinosa* ist bei Inokulation von VTM Typ grösser als bei jener mit VTMA L; c) die Verdünnungsgrenze des Rohsaftes nach Impfung von *N. tabacum* und *Lycopersicon esculentum* liegt bei VTMA L tiefer als bei VTM Typ. Das Vorherrschen eines Stammes könnte seinen Ursprung gerade in seiner höheren Infektiosität haben, die sich innerhalb des Pflanzenindividuums ebenso geltend machen kann wie bei einer Übertragung zwischen einzelnen Individuen.

III. Wurde nach unserer Methode D als Inokulum das Gemisch zweier Stämme benützt, z. B. VTMA L und VTM Typ oder VTM C und VTM Typ oder die Kombination eines strengen und weniger strengen Stammes (z. B. VTMA L und VTM C), so kam es zu einer Erkrankung, deren Symptome die Anwesenheit beider Stämme und in einigen Fällen das Vorherrschen von VTM Typ erkennen liess.

Auch bei dem Vorherrschen der für VTM Typ charakteristischen Symptome konnte die Anwesenheit von VTM AL oder VTM C durch Detektionsinokulation auf *Physalis alkekengi* nachgewiesen werden. Der gesamte Krankheitsverlauf und das Endstadium war bei Infektion mit dem Gemisch eines strengen und milden Stammes oft leichter als nach alleiniger Infektion mit einem strengen Stamm. Auch die Zahl der Läsionen bei *N. glutinosa*, die durch Inokulation des Saftes aus den auf diese Weise komplex erkrankten Pflanzen von *N. tabacum* Samsun hervorgerufen wurden, pflegte kleiner zu sein als die Zahl der Läsionen bei Kontrollpflanzen, die lediglich an VTM AL oder VTM C oder VTM Typ erkrankt waren.

IV. Bei Beobachtung des Krankheitsverlaufes an *N. tabacum* Samsun stellten wir fest, dass die scheinbare „Verdrängung“ in beträchtlichem Masse von klimatischen Bedingungen abhängig war. Der VTM-Typ, mit dem experimentiert wurde, trat symptomatisch am charakteristischsten bei Temperaturen von 18 bis 25 °C in Erscheinung, VTM AL bei minimal 20 °C, weitaus am besten aber bei Temperaturen über 30 °C. Diese Umweltsbedingungen sind dann massgebend dafür, inwieweit bei derselben Pflanze die Symptome dieses oder jenen Stammes, und zwar auch vorübergehend auftreten.

#### Diskussion

Die Stämme VTM AL und VTM C sind strengere, d. h. für die Pflanze gefährlichere Stämme als die Stämme VTM Typ oder VTM S, doch besitzt VTM Typ gegenüber VTM AL und VTM C keine Schutzwirkung. Der Stamm VTM S, der für die Pflanze weniger gefährlich ist als der Stamm VTM Typ, schützt nicht vor diesem Stamm. *Physalis alkekengi*, die bei Detektionsinokulation den Nachweis der latenten Anwesenheit der beiden erwähnten „farbigen“ Stämme ermöglicht, zeigte, dass der Schutz symptomatisch nur in jenen Fällen ist, in denen die Symptome des „farbigen“ Stammes nicht in Erscheinung treten. Ein effektiver „Schutz“ oder sein Fehlen liesse sich mit dem Verwandtschaftsverhältnis der Stämme erklären. Eine tatsächliche Schutzwirkung konnten wir nur bei VTM S vor VTM AL feststellen.

Best (1954) hatte bei seinen Versuchen mit Kreuzinokulation milder und strenger Stämme von *Lycopersicum virus 3* (TSW-tomato spotted wilt) festgestellt, dass der milde Stamm E die Pflanze zwar vor dem strengen Stamm B schützt, dass es aber trotz diesem „Schutz“ zu einer bedeutenden Verminderung des Ernteertrages kommt, der allerdings bei diesen „geschützten“ Pflanzen höher ist, als bei den lediglich am strengen Stamm erkrankten Pflanzen. Dieselbe Feststellung machte der Autor bei Inokulation eines Gemisches beider Stämme.

Nach der herkömmlichen Theorie sollte die an einem milden Stamm erkrankte und gegen einen strengen Stamm geschützte Pflanze überhaupt eine unverminderte Ernte einbringen. Bei Best war dies nicht der Fall, und in unseren Versuchen war die Pflanze bei einem Vorherrschen des milderen Stammes und nach Inokulation des Gemisches von schwerem und mildem Stamm sogar weniger beschädigt als bei alleiniger Infektion mit einem strengen Stamm.

Die Tatsache, dass in Pflanzen Gemische von Virusstämmen bestehen können, ist unbestreitbar und kann damit erklärt werden, dass neue Stämme durch Veränderung eines Teiles der Viruspartikel entstehen oder dass nach vorangegangener Infektion mit einem Stamm eine Neuinfektion mit einem weiteren Virusstamm hinzukommt. Es kann mit Grund angenommen werden, dass der zweite Weg häufiger ist. Nach den in der Natur gewonnenen Erfahrungen zu schliessen, kann eher eine Koexistenz mehrerer Stämme als die Existenz eines einzelnen Stammes in der Pflanze erwartet werden. Es ist daher anzunehmen, dass eine bereits viruskranke Pflanze mit grösserer Wahrscheinlichkeit noch an einem zweiten Stamm erkrankt, als dass eine solche weitere Erkrankung nicht eintritt.

Für die Erklärung des Vorhandenseins oder Nichtvorhandenseins einer Koexistenz von Virusstämmen dürfte der Hinweis auf die Verwandtschaft der Stämme kaum ausreichen. Beide Stämme VCM 1, der grüne und weisse, sind zweifelsohne miteinander verwandt und es sollte daher bei Kreuzinokulation der eine Stamm vor dem anderen schützen. Bei einer Übertragung mit Hilfe von *Cuscuta* sp. (Schmelzer-mündliche Mitteilung 1955) ist dies nicht der Fall, da auf dieselbe Pflanze zunächst der gelbe und dann auch der grüne Stamm übertragen werden kann. Hier macht sich wahrscheinlich eine historisch gegebene Beziehung, eine uralte Angewohnheit beider Stämme an die Koexistenz geltend. Wir nehmen daher an, dass diese Erscheinungen komplizierter sind, als früher angenommen wurde, und ein weiteres Studium erforderlich machen.

#### *Zusammenfassung*

Mc Kinney und Thung haben nachgewiesen, dass bei Tabakpflanzen, die mit einem milden VTM-Stamm infiziert waren, ein anderer, kräftig wirkender Stamm desselben Virus keine Erkrankung mehr hervorruft, sofern der milde Virusstamm bereits in alle Pflanzenteile eingedrungen ist. Mathews erbrachte den Beweis, dass bei Kreuzinokulation der Schutz der Pflanzen von der serologischen Verwandtschaft der Stämme desselben Virus abhängt. Best wies darauf hin, dass ein milder Stamm des *Lycopersicon virus 3* zwar Pflanzen vor einem schweren Stamm schützt, trotzdem aber eine bedeutende Ertragsverminderung bewirkt, die allerdings geringer ist als bei den nur mit einem schweren Virusstamm infizierten Pflanzen.

Es wurde mit den Stämmen VTM Typ, VTM C, mit dem neuen „farbigen“ Alke-Stamm des VTM (weiter VTM AL) und mit dem aus letzterem entstandenen „Streifen“-Stamm (weiter VTM S) experimentiert. Je näher das Verwandtschaftsverhältnis der Stämme war, desto grösser war die Schutzwirkung der Kreuzinokulation für die Pflanzen. Eine wechselseitige Schutzwirkung bestand nur zwischen den Stämmen VTM A1 und VTM S, nicht aber zwischen den Stämmen VTM Typ und VTM AL und ebensowenig zwischen VTM C und VTM AL, obwohl sich die beiden letzteren Stämme symptomatisch ähnlich sind. Wo es dennoch zu einem „Schutz“ kam, war dieser nur scheinbar; eine echte Schutzwirkung ergab sich nur zwischen den Stämmen VTM AL und VTM S.

Bei Kombination zweier Stämme (VTM AL plus VTM Typ, VTM C plus VTM Typ, VTM S plus VTM Typ) kam es bei Kreuzinokulationen zum Vorherrschen der Symptome eines der beiden Stämme, in der Regel des VTM Typ. (Die Kreuzinokulationen wurden vor oder nach Manifestation der Initialsymptome der systemischen Infektion oder nach systemischer Erkrankung der ganzen Pflanze an dem zuerst inokulierten Stamm durchgeführt.) Das Endstadium der Erkrankung verlief in diesen Fällen leichter als nach alleiniger Infektion mit dem schweren Stamm. In allen Fällen, wo ein Stamm scheinbar von einem anderen „verdrängt“ wurde und wo VTM AL, VTM C oder VTM S bei der vorher mit VTM Typ inokulierten Pflanzen keine charakteristische Symptome hervorriefen, konnte die Anwesenheit dieser Stämme in der Pflanze mit Detektionsinokulation auf *Physalis alkekengi* nachgewiesen werden, die später typische Dekolorationserscheinungen aufzeigte. Die von den Umweltbedingungen abhängige „Verdrängung“ des einen oder anderen Stammes war oft nur von vorübergehender Art.

Wurde für das Inokulum ein Gemisch zweier Stämme verwendet, so trat die Anwesenheit beider Stämme im Krankheitsverlauf symptomatisch in Erscheinung, wobei in einigen Fällen die Symptome des VTM Typ vorherrschten. Auch hier konnte die Anwesenheit des VTM AL und VTM C-Stammes durch Inokulation auf *Physalis alkekengi* nachgewiesen werden. Der Erkrankungsverlauf war bei Inokulation mit dem Gemisch eines schwach und kräftig wirkenden Stammes im Endstadium oft



leichter als nach alleiniger Infektion mit einem kräftigen Stamm. Die Zahl der Läsionen bei *Nicotiana glutinosa* war bei Inokulation gemischter Stämme gewöhnlich niedriger als bei Inokulation eines einzigen Stammes.

Die Tatsache, dass in Pflanzen Gemische von Virusstämmen bestehen können, ist unbestreitbar und kann damit erklärt werden, dass ein Teil der Viruspartikel sich verändert oder dass nach vorangegangener Infektion mit einem Stamm eine Neuinfektion mit einem weiteren Virusstamm hinzukommt.

Für die Erklärung des Vorhandenseins oder der Koexistenz verschiedener Stämme dürfte der Hinweis auf die Verwandtschaft der Stämme nicht ausreichen. Aus einigen Erfahrungen kann geschlossen werden, dass sich auch ein historisch gegebenes Verhältnis, eine uralte Angewohnheit der Stämme, bei ihrer Koexistenz geltend machen kann.

(Bildtafeln XXXIX, XL)

#### L i t e r a t u r

- B a w d e n, F. C.: Plant Viruses and Virus Diseases. Waltham 1950.  
B e n e t t, C. W.: Interference Phenomena between Plant Viruses. An. Rev. Microbiol. 5 : 295, 1951.  
B e s t, R. J.: Cross Protections by Strains of Tomato Spotted Wilt Virus and a New Theory to Explain it. Austr. J. Biol. Sci. 7 : 415, 1954.  
B l a t t n ý, C.: Alke-kmen viru obyčejné tabákové mosaiky (VTM 1). Sborník prác o tabáku. Bratislava 1955 (S. 231).  
M a t t h e w s, R. E. F.: Criteria of Relationship between Plant Virus Strains. Nature 163 :175, 1949.  
M c K i n n e y, H. H.: J. Agric. Res. 39 : 557, 1929 (ex ref.).  
S v o b o d o v á, J.: Pěstování rostlin na mikrozáhonu a asepticky na agaru (in vitro) jako příspěvek k metodice změny virů. Čs. biologie 3 : 371, 1954.  
T h u n g, T. H.: Z. Ned. Indisch. Natuurwetensch. Congr. Bandoeng. Java, 450, 1931 (ex ref.)  
Р ы ж к о в, В. Л.: Вирусные болезни растений. Москва 1935.

### Замечания по вопросу интерференции штаммов вируса табачной мозаики

Ц. БЛАТТНЫЙ

#### Резюме

McKinney (1929) и Thung (1931) нашли, что растения табака, заболевшие умеренным штаммом вируса табачной мозаики (VTM), не заболевают уже другой, тяжелой формой того же вируса. Это открытие используется для определения родственности вирусов. Matthews (1949) доказал, что, чем штаммы одного и того же вируса серологически взаимно ближе друг к другу, тем больше они защищают растение при перекрестной прививке. Мы изучаем этот вопрос у некоторых штаммов VTM с 1953 г. Настоящее сообщение об этих работах является предварительным.

Материалом нам служили 4 штамма: обыкновенная мозаика табака (типичный VTM — ТУР); Alke-штамм (VTM-AL), выделенный из *Physalis franchettii*; образующий полосы штамм (VTM-C), полученный путем изменения Alke-штамма Свободовой, и С-штамм (VTM-C), любезно предоставленный нам Клиновским, от Кассаниса из Ротамштедта. Так же, как и VTM-AL и VTM-C, он вызывает сильное обесцвечивание (побеление) у *Physalis alkekengi* и *Physalis franchettii*. VTM-S вызывает у *Physalis alkekengi* только легкое желтоватое

обесцвечивание. Для ВТМ-ТУР *Physalis alkekengi* является бессимптомным носителем.

Применялись следующие методы прививки: *А*. Прививка одним штаммом, перерыв до появления первичных признаков и прививка вторым штаммом. *Б*. Прививка одним штаммом и еще до появления первичных признаков прививка вторым штаммом. *В*. Прививка одним штаммом и после появления системического заболевания прививка вторым штаммом. *Г*. Прививка смесью двух штаммов в различных концентрациях.

Применялся абразив, — нормальный карборундовый порошок. Количество привитых растений при различных опытах колебалось от 20 до 50 растений *Nicotiana tabacum* Samsun. Для перезаражения применялся всегда карборунд и в различных случаях по 10—20 растений *Physalis alkekengi*.

Для детекции «цветных штаммов» (ВТМ-АЛ, ВТМ-С, ВТМ-S) применялись молодые сеянцы *Physalis alkekengi*. Наиболее губительно на них действует Аке-штамм.

#### *Результаты*

1. а) При использовании методов *А* и *Б* оказывалось, что ВТМ-АЛ не защищает от ВТМ-С, а ВТМ-С не защищает от ВТМ-АЛ.

б) При использовании метода *Б* было установлено, что ВТМ-С не защищает от ВТМ-ТУР, а ВТМ-ТУР не защищает от ВТМ-С.

в) При применении методов *А*, *Б*, *В* выяснилось, что ВТМ-АЛ защищает от ВТМ-S, а ВТМ-S защищает от ВТМ-АЛ.

г) При использовании методов *А*, *Б*, *В* было установлено, что ВТМ-ТУР не защищает ни от ВТМ-АЛ, ни от ВТМ-S. Если с помощью метода *В* признаки ВТМ-АЛ или ВТМ-S не проявлялись, то присутствие этих штаммов в растении табака можно бывало выявить с помощью перевивки на *Physalis alkekengi*.

д) При использовании методов *А*, *Б*, *В* было найдено, что ВТМ-АЛ и ВТМ-S не защищают от ВТМ-ТУР.

Из сказанного можно сделать заключение о близкой родственности АЛ-штамма и S-штамма (возникшего из АЛ-штамма) и, напротив, о менее близкой родственности АЛ-штамма и S-штамма с ВТМ-ТУР, как и АЛ-штамма с С-штаммом, хотя оба последние очень похожи друг на друга по симптомам (но не по физиологии: АЛ-штамм гораздо опаснее для растений, чем С-штамм).

2. При использовании методов *А*, *Б* и *В* в ряде случаев было установлено преобладание одного штамма над другим. В комбинации с АЛ-штаммом, S-штаммом или с С-штаммом в большинстве случаев побеждал ВТМ-ТУР. Течение заболевания при таких комбинациях бывало в конце концов слабее, чем при заболевании одним только сильным штаммом (АЛ-штаммом или С-штаммом). Симптоматологическое «вытеснение» одного штамма другим бывало только кажущимся. Это показала детекционная прививка на *Physalis alkekengi*: в растении содержались и АЛ-штамм и С-штамм, но их признаки были скрыты. Если же ВТМ-ТУР преобладал в сравнении с S-штаммом, то течение заболевания в конечном счете бывало тяжелее, чем при заболевании одним только образующим полоски штаммом. Причиной превалирования одного штамма (ВТМ-ТУР) могла бы быть его более высокая заразность в сравнении с другими, взятыми для опытов штаммами (хотя АЛ-штамм и С-штамм для растения опаснее, а S-штамм, напротив, менее опасен, чем ВТМ-ТУР).

3. При методе *Г* (смесь умеренного и опасного штаммов или опасного и менее опасного штаммов) развивавшееся заболевание носило признаки обоих штаммов. Если в смеси присутствовал ВТМ-ТУР, то иногда его признаки преобладали.

Но и в этих случаях наличие AL-штамма или С-штамма можно было доказать путем прививки на *Physalis alkekengi*. Течение заболевания смесью сильного и слабого штаммов в конечном счете бывало часто слабее, чем заболевание одним только сильным штаммом. Количество пятен на листьях *Nicotiana glutinosa*, привитой соком комплексно зараженных растений *Nicotiana tabacum* Samsun, бывало также меньше, чем количество пятен от сока контрольных растений, зараженных только штаммами ВТМ.

Best (1954) установил, что у «бронзовости» томатов «умеренный» штамм Е, хотя и защищает растение от «тяжелого» заболевания штаммом В, но при такой «защите» все же наблюдается значительное снижение урожайности. При этом урожай «защищенных» таким образом растений бывал все же выше, чем урожай растений, больных одним только «тяжелым» штаммом. Такое же действие наблюдалось и при прививке смесью обоих штаммов.

По старой теории, урожай растения, зараженного умеренным штаммом, защищающим его от заболевания тяжелым штаммом, практически совсем не должен был бы падать. При наших опытах, если умеренный штамм побеждал тяжелый, как и при прививке смесью умеренного и тяжелого штаммов, растение бывало даже меньше поражено, чем при прививке одним только тяжелым штаммом.

Факт, что существуют смеси штаммов вирусов в растениях, непровержим. Такие смеси могут возникать или путем изменения части вирусных частиц, или скорее путем заражения новым штаммом после предварительного заражения первым штаммом. По опыту с растениями в природе, скорее можно предполагать в растении сосуществование нескольких штаммов, чем присутствие только одного штамма. Но поэтому также можно ожидать, что зараженное одним штаммом растение после инфекции вторым штаммом скорее тоже им заболевает (чем что оно не заболевает).

За или против сосуществования в растении различных штаммов одного и того же вируса едва ли можно высказываться на основании только одного критерия родственности. Желтый и зеленый штаммы близко родственны между собой. Но Schmelzer (1955) перенес на одно и то же растение *Cuscuta* sp. сначала желтый, а потом зеленый штамм. Можно предполагать, что здесь проявляются и исторически сложившиеся отношения, давняя приспособленность обоих штаммов к сосуществованию.

Во всяком случае, эти явления свидетельствуют о наличии особых форм сосуществования в растении различных штаммов одного и того же вируса. Имея и общее, и практическое значение, они заслуживают дальнейшего изучения.

## FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc. 6

### Anatomisch-zytologische Studie über die Plastiden der Vegetationspunkte

V. SOSNOVÁ

Biologisches Institut der Tschl. Akademie der Wissenschaften, Abteilung für Pflanzenphysiologie, Praha

Eingelangt am 25. 8. 1956

Eine notwendige Voraussetzung für das Studium der Photosynthese ist die Kenntnis der Morphologie, Physiologie und Genetik der Chloroplasten. Auch wenn die ältere und neuere Literatur reich an Arbeiten ist, die sich mit der Verteilung der Chloroplasten in den verschiedenen Pflanzenorganen, vor allem in den Blättern befassen, so gibt es nur wenig Arbeiten, die den Chloroplasten in den Zellen der Vegetationspunkte im Verlaufe der Pflanzenentwicklung gewidmet sind. Unsere Arbeit ist bemüht, die Beziehung zwischen den Chloroplasten und dem morphologischen Zustand des Vegetationspunktes von der Keimbildung bis zur Entstehung der Reproduktionsorgane zu untersuchen.

#### Methodik

Die Lösung der hier gestellten Aufgabe beruht auf der Methodik. Vor allem war es die Unterscheidung der Chloroplasten von den Leukoplasten, welche die erste Voraussetzung bildete für die weitere Forschung, d. i. für die Untersuchung der Chloroplasten in den Vegetationspunkten.

1. *Mikrochemische Chlorophyllprüfungen.* Als Versuchsmaterial diente *Triticum vulgare* Vill., Sorte „Chlumecká 12“; Testpflanzen waren *Chlorophytum cornosum* var. *variegatum* Hort., *Agapanthus umbellatus* L'Herit, *Begonia semperflorens nobilis* Ldl. Die Unterscheidung der Plastiden und Chloroplasten erfolgte auf mehrere Arten. Unser hauptsächlichstes Bestreben war darauf gerichtet, das Chlorophyll in den Plastiden in Gestalt einer unlöslichen Verbindung zu fixieren, die den späteren mikrotechnischen Operationen standhalten würde. Zur Gewinnung von Phaeophytin benützten wir verschiedene Säuren (Essig-, 20%ige Trichloressig-, Oxalwein-, Chlorwasserstoff- und Pikrinsäure, gesättigte Wasserlösung), zur Chlorophyllgewinnung Hydroxyde (Baryum-, Kalzium- und Aluminiumhydrat). Als Fixierungsmittel wurden auch die Salze von Schwermetallen (Uranylazetat, Uranyl nitrat, Bleioxydazetat, Kadmiumchlorid-Kisser 1940) benützt. Ausprobiert wurden auch kombinierte Fixierungen nach Ripart-Petit, Temper, Holland, ferner Gemische von Pikrinsäure-Sublimat und Formol-Ammoniak sowie eine physikalische Fixierung (sog. freezing-drying), über die bereits berichtet wurde (Uhlík 1955). Sämtliche Fixierungen wurden in den verschiedensten Kombinationen geprüft.

Nach den oben erwähnten Fixierungen wurde eine Reihe von Überführungsmitteln angewendet, und zwar 96%iger Äthylalkohol, Azeton, tertiäres Butanol, Dioxan, Isopropylalkohol, n-Butanol, Tetrachlor, Toluol, Xylen, Anilin, Benzen, Chloroform und Terpentin. Die verarbeiteten Präparate wurden in Paraffin, Karbowax R 1000 (Wade 1952) und in verschiedene Seifentypen oder in Stearsäure eingebettet.

Von den Fixierungen bewährte sich am besten eine kochende Lösung von Kaliumbichromat (Neumayer 1922), das mit dem Chlorophyll einen weder in Alkohol noch in Xylen löslichen Niederschlag abscheidet. Auch in Paraffin ist dieser Niederschlag stabil. Der Nachteil dieser Methode besteht in der wenig deutlichen grünen Farbe in den Chloroplasten und teilweise auch in einer Deformation der Zellen durch den Sud.

Alle diese Methoden waren jedoch wenig befriedigend, da keine bei Fixierung, Einbettung u. dgl. vollkommen beweiskräftig und ohne mögliche Fehler war. Wir wandten uns daher schliesslich der bisherigen Standardmethode mit dem Fluoreszenzmikroskop zu, die allgemein zum Chlorophyllnachweis verwendet wird. Wir sind uns allerdings dessen bewusst, dass auch diese Methode das Unterlaufen von Fehlern nicht ausschliesst (Radley 1939).

2. *Untersuchung des Chlorophylls in den Vegetationspunkten.* Als Versuchsmaterial dienten vier Weizengattungen des tschech. Sortiments, und zwar „Požehnaná“ als Winterfrucht, „Chlumecká 12“ als Halbwintersaat, „Niva“ als Sommergetreide und „Česká přesívka“ (Wechselweizen). Das Material wurde einerseits zu mikroskopischen Dauerpräparaten verarbeitet, andererseits unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Bei dem ersten Bearbeitungsmodus wurden die Muster fortlaufend jeden zweiten Tag entnommen und aus jeder Serie fünf Sprossvegetationspunkte auspräpariert, die durch 24 Stunden mit dem Gemisch nach Helly fixiert; auf 48 Stunden in gesättigte Kaliumbichromatlösung (37 °C) eingebracht, 24 Stunden in fließendem Wasser ausgewaschen und mit der tertiären Butanolreihe in Paraffin überführt wurden. Die Befreiung der Präparate von Paraffin erfolgte mit der Xylol-Alkoholreihe in die eine Jodlösung in 70 %igem Alkohol und eine 2%ige unterschwellige Natriumthiosulfatlösung eingebracht wurde. Die Präparate wurden mit dem Regaudschen Hämatoxylin gefärbt. Die Differenzierung wurde derart gelenkt, dass die Körner vollkommen schwarz und die Körnchen in ihnen unsichtbar blieben. Bei der Sorte „Chlumecká 12“ wurde ausserdem noch eine Modifikation angewandt, indem die Präparate der Vegetationspunkte nach Beizung in 5%igem Alaun mit 1%iger Bordeaux R-Wasserlösung durch 30 Minuten vorgefärbt [subtraktive Färbungsmethode nach Heidenhain (Wolf 1954)] und erst dann mit dem Regaudschen Hämatoxylin behandelt wurden. Als Überführungsmittel in Balsam wurde n-Butanol und Xylen benutzt.

Die zweite Verarbeitungsmethode bestand darin, dass die ebenfalls jeden zweiten Tag entnommenen Sprossvegetationspunkte auspräpariert und unter dem Reichertschen Standard-Fluoreszenzmikroskop „Lux UV“ untersucht wurden. Die Chlorophyllstrahlung wurde farbig eingezeichnet.

Auf Grundlage der im Jahre 1954 erzielten Ergebnisse arbeiteten wir im folgenden Jahre nur mit der Sorte „Niva“, um durch Verwendung einer grösseren Zahl von Präparaten die zytologische Forschung zu vertiefen. Das Material wurde wiederum auf zweifache Weise verarbeitet, nur erhöhte sich die Zahl der entnommenen und untersuchten Vegetationspunkte auf das Doppelte. Gleichzeitig wurden immer 10 Vegetationspunkte mit dem Gemisch nach Helly (gleicher Vorgang wie i. J. 1954) und 10 Vegetationspunkte mit dem Gemisch nach Zirkle unter Beisatz von Formaldehyd (O'Brien 1951) fixiert, und zwar zum Vergleich beider Fixierungen, da zwischen ihnen ein gewisser Unterschied festzustellen war. Wir nehmen an, dass dieser Unterschied durch das Quecksilber bedingt ist, der die Eiweissstoffe ausfällt. Die Färbung der Präparate erfolgte mit dem Regaudschen Hämatoxylin, mit einem Gemisch von Hämatoxylin und Bordeaux R, nach Milovidov (1928), nach Altmann (Romeis 1948) und mit Silberimprägnierung, die Überführung in Balsam mit Isopropylalkohol und Xylen.

Nach festgestellter Übereinstimmung der mikroskopischen Dauerpräparate und der Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde der Versuch so angeordnet, dass die kurz mit dem Fluoreszenzmikroskop untersuchten Vegetationspunkte fixiert und aus ihnen farbige Dauerpräparate angefertigt wurden. Diese Methode ist allerdings derart schwierig, dass sie nach Ausscheidung der mechanisch und durch UV-Bestrahlung beschädigten Präparate nur in wenigen Fällen erfolgreich war.

### *Experimentelles*

Die im Jahre 1954 begonnenen Versuche an vier Sorten mit verschieden langer Vegetationsdauer erbrachten folgende Ergebnisse.

Die Sorte „Niva“ besitzt morphologisch gut ausgeglichene Vegetationspunkte, in denen aber das Chlorophyllvorkommen sehr unregelmässig ist. So macht sich z. B. am 1. 6. in den Vegetationspunkten eine deutliche Differenzierung der Ährchen und eine intensive Rotfluoreszenz fast in der ganzen Achsenlänge bemerkbar. Manchmal sind die Plastiden an der Basis des Vegetationspunktes anwesend, bei anderen reichen sie bis zur Hälfte der Ährenlänge. Daneben kommen aber auch Vegetationspunkte derselben Serie vor, die zwar gleichfalls Ährchen aufweisen, aber unter dem Fluoreszenzmikroskop überhaupt nicht rot leuchten. In der Serie vom 5. 6. befand sich gleichfalls ein ziemlich differenzierter, aber nicht rotleuchtender Vegetationspunkt.

Die Sorte „Chlumecká 12“ besitzt morphologisch gut ausgeglichene Vegetationspunkte mit einem ziemlich regelmässigen Chlorophyllvorkommen, das schon in der Serie vom 1. 6. deutlich in Erscheinung tritt. Die Serie vom 15. 6. weist bereits eine Differenzierung der Ährchenanlagen auf und die Rotfluoreszenz erstreckt sich fast bis zum Ende des Vegetationspunktes, an dessen Basis Plastiden erscheinen. Alle Vegetationspunkte mit differenzierten Ährchenanlagen leuchten rot.

Bei der Sorte „Česká přesívka“ ist die Entwicklung der Sprossvegetationspunkte ziemlich unausgeglichen. Die Rotfluoreszenz war erst bei der Serie vom 17. 6. wahrnehmbar, wo die Vegetationspunkte in ihrer ganzen Länge rot leuchteten. Bei den mikroskopischen Dauerpräparaten aus dieser Serie wurden Plastiden bis zu einem Viertel der Länge des Vegetationspunktes beobachtet.

Die Sorte „Požehnaná“ weist eine gänzlich andersgeartete Entwicklung auf, da die Vegetationspunkte während der ganzen Versuchsdauer im Zustand der Ausbildung von Blattanlagen verharrten. Eine Rotfluoreszenz wurde überhaupt nicht beobachtet.

Im folgenden Jahre (1955) konzentrierte sich die Forschung auf die Sorte „Niva“, um die Frage der Plastidenentwicklung eingehender beantworten zu können.

#### *Beschreibung der einzelnen Beobachtungen*

Die Untersuchung der Vegetationspunkte mit dem Fluoreszenzmikroskop begann am 20. Tage nach der Aussaat (25. 4.), an dem die Blätter bereits die Koleoptilen durchbrochen hatten. Das Leuchten war klar blau. Bei den Dauerpräparaten aus dieser Serie wurden mitochondriale Strukturen gefunden.

Die zweite Beobachtung erfolgte erst am 2. 5. Die einzelnen Vegetationspunkte unterscheiden sich voneinander und können in drei charakteristische Gruppen eingeteilt werden. In der ersten Gruppe befinden sich solche, die von den ersten Blättern eingeschlossen sind, in der zweiten sind die Blattanlagen auf der sich verlängernden Achse des Vegetationspunktes sichtbar. Die dritte Gruppe unterscheidet sich von der zweiten durch eine grössere Verlängerung des Stengels. Die Fluoreszenz ist bei allen Vegetationspunkten blau. Bei der zytologischen Verarbeitung der Dauerpräparate wurden Mitochondrien und in zwei Fällen in den Basalzellen des Vegetationspunktes Gebilde festgestellt, die als Proplastiden angesehen werden können.

Die dritte Serie wurde am 4. 5. verarbeitet. Die Vegetationspunkte verlängerten sich und die Fluoreszenz war bei den einzelnen Vegetationspunkten unterschiedlich, da diese in sechs Fällen klar blau, in drei Fällen an der Basis rot leuchteten. In einem Falle reichte die Rotfluoreszenz bis zur Hälfte der Gesamtlänge.

Die Serie des nächstfolgenden Tages (5. 5.) befand sich praktisch auf derselben Stufe der morphologischen Entwicklung. Fünf Vegetationspunkte leuchteten klar blau, bei zweien war ein rotes Leuchten an der Basis bemerkbar, zwei weitere leuchteten bis zur Hälfte ihrer Länge orange, ein weiterer praktisch in der gleichen Länge rot. Bei den Dauerpräparaten liessen sich zytologisch charakteristische Mitochondrien bestimmen. In einem Falle wurden an der Basis Proplastiden in Form verdickter Stäbchen beobachtet. Bei einem Vegetationspunkt wurden Plastiden in den Zellen ungefähr bis zu seiner halben Länge gefunden.

Die Serie vom 6. 5. war unter dem Fluoreszenzmikroskop ziemlich unausgeglichen. In sechs Fällen leuchteten die Vegetationspunkte klar blau, in zweien an der Basis rot und in einem reichte die Rotfluoreszenz bis zu einem Drittel der Länge.

Am 7. 5. war bereits eine wesentliche Verlängerung der Vegetationspunkte bemerkbar, die wiederum unausgeglichen fluoreszierten, und zwar leuchteten sechs blau, zwei an der Basis gelborange, einer an der Basis rot und ein weiterer bis zu einem Drittel der Länge ebenfalls rot. In den basalen Zellen eines Vegetationspunktes wurden zytologisch hörnchenförmige Proplastiden festgestellt, bei einem anderen kamen diese Proplastiden in den Zellen eines Drittels der Länge vor.

Bei der Serie vom 8. 5. machte sich bei vier Vegetationspunkten ein gelb-oranger Leuchten bemerkbar, ein weiterer leuchtete rot in zwei Dritteln seiner Länge, zwei fluoreszierten rot in ihrer ganzen Länge und schliesslich zwei andere blau.

In den Zellen der Dauerpräparate waren Proplastiden von verschiedener Form wahrnehmbar.

Die Vegetationspunkte vom 9. 5. waren praktisch in ihrer morphologischen Entwicklung gleichbleibend. In vier Fällen konnte eine Rotfluoreszenz überhaupt nicht verzeichnet werden, die übrigen Vegetationspunkte leuchteten rot, und zwar drei an der Basis, einer in drei Vierteln der Länge und zwei in der ganzen Länge. Die zytologische Untersuchung zeigte wie am Vortage wiederum verschieden geformte Plastiden.

Bei der Serie vom 10. 5. leuchtete ein Vegetationspunkt unter dem Fluoreszenzmikroskop überhaupt nicht rot, die anderen fluoreszierten rot, davon sechs an der Basis, zwei ziemlich schwach in zwei Dritteln und einer sehr intensiv in der ganzen Länge. Die zytologische Untersuchung der Dauerpräparate erbrachte bei dieser Serie zum ersten Male an der Basis völlig typische Plastidenformen.

Am 11. 5. fluoreszierte ein Vegetationspunkt wiederum nicht rot, sieben schwach in ihrer ganzen Länge, zwei im gleichen Ausmass sehr intensiv. In den Zellen der Dauerpräparate konnten an der Basis charakteristische Plastiden, am Ende des Vegetationspunktes verschieden geformte Proplastiden beobachtet werden (Abb.1).

Bei der Serie vom 12. 5. leuchtete ein Vegetationspunkt nicht rot, die anderen rot, und zwar zwei an der Basis, drei zur Hälfte und fünf intensiv in der ganzen Länge. Die charakteristischen Plastiden befanden sich an der Basis und rückten von hier entlang der Sprossachse bis zu einem Drittel der Länge vor.

Am 13. 5. leuchteten rot alle Vegetationspunkte bis zu drei Vierteln der Länge mit Ausnahme eines einzigen, der nur an der Basis leuchtete. Ein Vegetationspunkt fluoreszierte überhaupt nicht rot. Das zytologische Bild war dasselbe wie bei der Serie des Vortages.

Bei der Serie vom 14. 5. begannen sich bei den Vegetationspunkten Ährchenanlagen (sog. double ridges) zu differenzieren. In vier Fällen konnte eine Rotfluoreszenz in der ganzen Achsenlänge, in zwei Fällen ein schwaches Leuchten in zwei Dritteln, in zwei weiteren an der Basis beobachtet werden. Das zytologische Bild blieb im allgemeinen unverändert, nur breiteten sich die fertigen Plastiden bis zur Hälfte der Vegetationspunktes aus.

Die Serie vom 16. 5. zeigte unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einem Vegetationspunkt ein gelbes Leuchten in der halben Länge, drei Vegetationspunkte leuchteten schwach rot zu drei Vierteln und weitere drei intensiv rot in der ganzen Länge. In einem Falle erschien eine Rotfluoreszenz auch bei den sich entwickelnden Ährchen entlang ihrer Achsen. Typische Plastiden in den Zellen konnten in der ganzen Länge des Vegetationspunktes beobachtet werden.

Auch bei der Serie vom 18. 5. leuchtete ein Vegetationspunkt nicht rot, ein weiterer nur schwach bis zur Hälfte; die übrigen fluoreszierten rot in ihrer ganzen Achsenlänge. Das zytologische Bild war dasselbe wie am Vortage (Abb. 2).

Bei der Serie vom 20. 5. konnte bei allen Vegetationspunkten eine intensive Rotfluoreszenz beobachtet werden. In sieben Fällen war eine Zickzackkrümmung der Achse bemerkbar. Bei den zytologischen Präparaten konnten wiederum verschiedene Plastidenformen in den Zellen der Ährchenanlagen beobachtet werden.

Die letzte Serie vom 23. 5. enthielt Vegetationspunkte, die in ihrer ganzen Länge rot fluoreszierten und eine betonte Zickzackkrümmung der Achse aufwiesen. Das zytologische Bild war mit dem der Serie vom 20. 5. übereinstimmend (Abb. 7—10).

Ein Vergleich der Beobachtungen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit dem gleichen fixierten und gefärbten Präparat bestätigte unsere früheren Befunde bei Präparaten derselben Serie. Das zytologische Bild ist allerdings unmerklich gestört, sodass sich teilweise eine Verklumpung der Mitochondrien und Plastiden bemerkbar macht, die etwas an die Fixierung nach Helly erinnert. An der Achse ist in der Höhe

der ersten Blattanlage zum Unterschied von den Mitochondrien eine Verdickung der Plastiden bemerkbar. Das Chlorophyllvorkommen in diesem Zeitpunkt dürfte den Befunden von Alvarado (1923), Jutta von Loui (1930), Guilliermond (1941) und Strugger (1950) entsprechen.

#### *Diskussion und Zusammenfassung*

Abschliessend kann gesagt werden, dass wir irgendeinen einfachen Zusammenhang zwischen dem morphologischen Zustand des Vegetationspunktes und dem Chlorophyllvorkommen nicht feststellen konnten, wie dies vielleicht auf den ersten Blick vorausgesetzt werden könnte. Zwar sind in der Mehrzahl der Fälle die Vegetationspunkte bereits zur Zeit der Differenzierung der Ährchenanlagen chlorophyllhaltig, doch fanden wir, besonders bei der Sorte Niva, auch Ausnahmen. Diese Tatsache weist darauf hin, dass die Beziehung zwischen dem Erscheinen des Chlorophylls und der weiteren Entwicklung der Ähre nicht so einfach ist, wie Melnikov (1936, zit. nach Gjubbenet 1953) annahm. Seiner Ansicht nach müsste das Chlorophyll in den Vegetationspunkten immer bereits vor Differenzierung der Ährchenanlagen enthalten sein. Andererseits kommt dem Chlorophyll in der Entwicklung des Vegetationspunktes eine zweifellos wesentliche Bedeutung zu, wie bei der Sorte „Požehnaná“ gezeigt wurde, wo in keinem einzigen Falle Chlorophyll in den Vegetationspunkten nachgewiesen werden konnte. Daraus kann auf eine weitaus breitere Einbeziehung der Chloroplasten in den gesamten Stoffwechsel geschlossen werden.

Bemerkenswert ist die Unausgeglichenheit der Rotfluoreszenz bei den einzelnen Vegetationspunkten derselben Serie. Man könnte annehmen, dass dies durch die geringe Zahl der untersuchten Individuen (n) verursacht ist, doch es verhält sich nicht so. Abgesehen davon, dass die anspruchsvolle Methodik die Verarbeitung einer grösseren Zahl nicht zulässt, ist dies auch für die Zwecke einer zytologischen Untersuchung gar nicht notwendig. Das Kriterium der Ausgeglichenheit bildete der anatomisch-morphologische Zustand der Vegetationspunkte. Experimentell wurde festgestellt, dass die Zahl der untersuchten Vegetationspunkte zur Genüge die morphologische Variationsbreite erfasste. Die fortlaufende Beobachtung und Kontrolle schliesst auch eine Verursachung der Unausgeglichenheit durch ökologische Faktoren aus. Wird in Betracht gezogen, dass die Vegetationspunkte bei einer morphologischen Unausgeglichenheit auch eine Unausgeglichenheit der Fluoreszenzstrahlung aufweisen, so lässt dies auf ein kompliziertes physiologisches Geschehen schliessen, das eine spezielle Forschung notwendig erscheinen lässt.

Die zytologische Untersuchung der Chloroplastenentwicklung in der vorliegenden Arbeit ist eine einleitende Studie zur Genetik der Plastiden (Newcomer 1940, 1951, Weier-Stocking 1938, 1952, Correns und Wettstein 1937). Das Studium der panaschierten Pflanzen verweist auf eine genetische Kontinuität der Plastiden sowohl in den männlichen als auch weiblichen Reproduktionszellen (Michaelis 1954, 1955a, 1955b, Ruhland und Wetzel 1924). Die Frage der Kontinuität der Plastiden ist aber oft verbunden mit der Frage des Ursprungs der Plastiden und ihrer Entwicklung (Lewitsky 1911, Schimper 1883, Mevius und Duvel 1954). Einige Autoren (Guilliermond 1941, Rezende-Pinto 1952, O'Brien 1951, Sorokin 1941, 1955, Strugger 1951, 1954a, b, Kaja 1954, Grave 1954) bemühten sich, unter Anwendung verschiedener Methoden einen Unterschied zwischen Mitochondrien und Proplastiden zu finden. Diese methodisch sehr schwierige Unterscheidung ist aber letzten Endes vom Gesichtspunkt der Kontinuität der Plastiden aus gesehen unwesentlich, da unserer Meinung nach die Proplastiden Partikel sui generis von spezifischer Charakteristik sind.

*(Bildtafeln XLI, XLII)*



## Literatur

- Alvarado, S.: Die Entstehung der Plastiden aus Chondriosomen in den Paraphysen von *Mnium cuspidatum*. Ber. deutsch. bot. Ges. 41 : 85, 1923.
- Gjubbnet, E. R.: Rostliny a chlorofyl. Praha 1953.
- Grave, G.: Studien über die Entwicklung der Chloroplasten bei *Agapanthus umbellatus*. Protoplasma 44 : 273, 1954.
- Guilliermond, A.: The Cytoplasm of Plant Cell. Chronica Bot. 1941.
- Kaja, H.: Untersuchungen über die Entwicklung und Struktur der Moosplastiden. Ber. deutsch. bot. Ges. 67 : 93, 1954.
- Kisser, J.: Voraussetzungen und Methodik für die Konservierung der Farbe grüner Pflanzenteile. Zschr. wiss. Mikrosk. 57 : 38, 1940.
- Leyon, H.: The Structure of Chloroplasts. IV. The Development and Structure of the Aspidistra Chloroplasts. Exp. Cell Res. 7 : 265—273, 1954.
- Lewitsky, G.: Die Chloroplastanlagen in lebenden und fixierten Zellen von *Elodea canadensis* Rich. Ber. deutsch. bot. Ges. 29 : 697, 1911.
- Louivon, J.: Fluoreszenzmikroskopische und zytologische Untersuchungen über die Frage der Individualität der Plastiden. Planta 12 : 191, 1930.
- Mevius, W., Duvel, D.: Zur Entwicklung der Chloroplasten. Naturwiss. 41 : 219, 1954.
- Michaelis, P.: Wege und Möglichkeiten zur Analyse des plasmatischen Erbgutes. Biol. Zbl. 73 : 353, 1954.
- Michaelis, P.: Über Gesetzmässigkeiten der Plasmon-Umkombination und über eine Methode zur Trennung einer Plastiden-, Chondriosomen-, resp. Sphaerosomen- und einer Cytoplasmavererbung. Cytologia 21 : 320, 1955a.
- Michaelis, P.: Modellversuche zur Plastiden- und Plasmavererbung. Züchter 25 : 209, 1955b.
- Milovidov, P.: Sur les methodes de double coloration du chondriome des graines d'amidon. Arch. Anat. Microsc. 24 : 9, 1928.
- Neumayer, H.: Eine Methode zur Herstellung von Mikrotomschnitten mit natürlicher Farbe der Chloroplasten. Ber. deutsch. bot. Ges. 40 : 41, 1922.
- Newcomer, E. H.: Mitochondria in Plants. I. Bot. Rev. 6 : 85, 1940. Mitochondria in plants II. Bot. Rev. 17 : 53, 1951.
- O'Brien, J. A.: Plastid Development in the Scutellum of *Triticum aestivum* and *Secale cereale*. Am. J. Bot. 38 : 684, 1951.
- Radley, I. A.: Fluorescence Analysis in Ultraviolet Light. New York 1939.
- Rezende-Pinto, M. C.: Über die Genese und die Struktur der Chloroplasten bei den höheren Pflanzen. Protoplasma 41 : 336, 1952.
- Romeis, B.: Mikroskopische Technik. München 1948.
- Ruhland, W., Wetzel, K.: Der Nachweis von Chloroplasten in den generativen Zellen von Pollenschläuchen. Ber. deutsch. bot. Ges. 42 : 3, 1924.
- Schimper, A. F. W.: Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. Bot. Ztg. 41 : 105, 121, 137, 153, 1883.
- Sorokin, H.: The Distinction between Mitochondria and Plastids in Living Epidermal Cell. Am. J. Bot. 28 : 475, 1941.
- Sorokin, H.: Mitochondria and Sphaerosomes in the Living Epidermal Cell. Am. J. Bot. 42 : 225, 1955.
- Strugger, S.: Über den Bau der Plastiden und Chloroplasten. Naturwiss. 37 : 166, 1950.
- Strugger, S.: Die Strukturordnung in Chloroplasten. Ber. deutsch. bot. Ges. 54 : 69, 1951.
- Strugger, S.: Die Proplastiden in den jungen Blättern von *Agapanthus umbellatus* L'Hérit. Protoplasma 53 : 120, 1954a.
- Strugger, S.: Über die Struktur der Proplastiden. Ber. deutsch. bot. Ges. 66 : 439, 1954b.
- Uhlik, J.: Rozlišení chloroplastů od ostatního plastidomu na stálých řezaných preparátech metodou mrazové sublimace. Čs. biologie 4 : 312, 1955.
- Wade, H. W.: Notes on the Carbowax Methods of Making Tissue Sections. Stain Techn. 27 : 71, 1952.
- Weier, T. E., Stocking, C. R.: The Chloroplast. I. Bot. Rev. 4 : 487, 1938. The Chloroplast. II. Bot. Rev. 18 : 14, 1952.
- Wolf, J.: Mikroskopická technika. Praha 1954.
- Мелников, А. Н.: О световой стадии в развитии злаков. Соц. растениеводство, сер. А, 19 : 29, 1936.
- Углик, Я.: Выделение хлоропластов из остального пластидома на зафиксированных резанных препаратах с помощью метода сублимации замораживанием. Fol. biol. (Praha) 1 : 242, 1955.

Анатомическо-цитологические исследования пластидов  
в точках роста

В. СОСНОВА

*Резюме*

В работе исследуется, во-первых, вопрос хлоропластов и морфологических отношений в точке роста, — начиная с прорастающего зародыша и вплоть до зарождения органов размножения, — а во-вторых, переходных форм от протопластидов к типичным пластидам в клетках вегетационной верхушки. Двух-летние опыты с *Triticum vulgare* (разновидности Нива, Хлумецкая 12, Благословенная, Чешская пересевка, но главным образом — Нива), для которых материал отбирался ежедневно, показали, что непосредственной связи между анатомическо-морфологическим состоянием точки роста и наличием хлорофилла в клетках этой вегетационной верхушки (что можно было бы, быть может, предполагать) не существует. Не было установлено и существование зависимости от экологических факторов, которые исследовались во все время опыта. Это указывает на наличие сложных внутренних физиологических процессов, при которых хлоропласты связаны, вероятно, более всесторонне с общим обменом веществ. Цитологические исследования показывают, что по истечении определенного времени на основании точки роста появляются, кроме митохондрий, и протопластиды различных форм, которые при дальнейшем развитии постепенно превращаются в типичные пластиды. Отличить протопластиды от митохондрий в начальном периоде развития весьма затруднительно, но в конце концов это (с точки зрения преемственности пластидов) не существенно, так как разница заключается в их генетическом основании.

(Табл. XLI, XLII)

## FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc. 6.

### Untersuchungen mitochondrialer Strukturen bei Reis und Weizen

I. HRŠEL

Biologisches Institut der Tschech. Akademie der Wissenschaften, Abteilung für Pflanzenphysiologie,  
Praha

Eingelangt am 23. 8. 1956

Die Befunde von enzymatischen Atmungssystemen und ihr Zusammenhang mit photosynthetischen Prozessen veranlassten uns zum Studium der mitochondrialen Strukturen in den sich entwickelnden Reis- und Weizenzellen.

#### *Methoden und Material*

Bei den Untersuchungen am keimenden Reis wurde die Fixierung nach Helly mit 36stündiger Chromierung der Mitochondrien in gesättigtem Kaliumbichromat (Baker 1951) durchgeführt. Als Färbungsmittel dienten Eisenhämatoxylin nach Regaud, Kristallviolett nach Benda, Anilinlichtgrün nach Harman (1950). Die Unterscheidung der Mitochondrien und Polysaccharide erfolgte mit der von Milovidov (1928) empfohlenen Färbungsmethode, die Bestimmung von Lipiden nach Ciaccio-Lison unter Benützung von Paraffinschnitten durch Färbung mit Sudan-schwarz (Fettschwarz „Geigy“-Lison 1936). Für die Reaktion auf Polysaccharide wurde Perjodsäure-Schiff'sches Reagens (Mc Manus und Cason 1950) und die Färbung mit Tannin-Eisenaun nach Salazar (Wallraff 1951) benützt. Zu Vergleichszwecken wurden auch Untersuchungen in vivo angestellt und beim Weizen die Fixierung nach Erliki-Zirkle, als Überführungsmittel tertiäres Butanol und als Färbungsmittel Eisenhämatoxylin nach Regaud, Sudan-schwarz und Altmann'sches Säurefuchsin-Tannin-Methylgrün (Milovidov 1928) verwendet.

#### *Ergebnisse*

Unsere Untersuchungen an dem unter verschiedenen physiologischen Bedingungen (unter Wasser, in feuchtem Milieu, im Dunkeln und im Licht) keimenden Reis im Verlauf der ersten acht Tage haben gezeigt, dass die mitochondrialen Strukturen auf anaerobe und aerobe Bedingungen reagieren. Von normalen Verhältnissen (teilweise unter Wasser gezüchteter Reis) am unterschiedlichsten verlief die Entwicklung bei den im Dunkeln unter Wasser gezogenen Keimlingen. Die mitochondrialen Elemente waren in ihrer Entwicklung zu Plastiden stark verspätet und erreichten nur das Aussehen hantelförmiger Gebilde. Das Zytoplasma der Zelle war stark vakuolisiert und in den Vakuolen eine Vermehrung der Eisweisskörperchen, der sog. Sphäroplasten (Hršel 1955) zu beobachten, die sichtlich die mitochondrialen Plastiden ersetzen. In der Blattzelle, die normal aus mitochondrialen Strukturen hervorgegangene Plastiden besitzt, befinden sich nur ein oder zwei Sphäroplasten, die manchmal auch zerfallen. Die zu den Sphäroplasten und zu den Strukturen der Golgi-Zone gehörenden Elemente wurden erstmalig von Němec (1901) als sogenannte centrosomähnliche Gebilde beobachtet.

Die ersten Phasen der Plastidenentwicklung verlaufen beim Reis über kugelige Mitochondrien (mitochondria), die auf kappenartige vakuolare oder zytoplasmatische Gebilde aufsitzen. Diese Gebilde befinden sich in unmittelbarer Nähe des Kerns und wurden gleichfalls von Němec (1901) beschrieben. Unseren Beobachtungen nach zu schliessen, gehören sie ebenfalls zu den Strukturen der Golgi-Zone. Die Mitochondrien dehnen sich centrosomoseähnlich aus, teilen und vergrössern sich

und schreiten in ihrer Umwandlung zu Plastiden fort. Nach Steiner (1954) sind die stäbchenartigen Formen der Mitochondrien in der Phase der Eiweissynthese anwesend.

Beim Weizen wurde das Verhalten mitochondrialer Strukturen im Verlauf der ersten Keimungsphasen durch 48 Stunden hindurch beobachtet. Eine Stunde nach Beginn der Ankeimung wurden im Zytoplasma der Zellen des Vegetationspunktes sowie des ersten und zweiten Blattes ungleich grosse, mit Säurefuchsin nach Altmann und Eisenhämytoxylin färbbare Körnchen festgestellt, die im weiteren Verlauf, d. i. 2 Stunden nach dem Ankeimungsbeginn, bis auf 1—3 der grössten Körnchen im Vegetationspunkt verschwinden. Ansonsten enthält das Zytoplasma keine sichtbare Inklusionen. Nach weiteren 36 Stunden erscheinen im Zytoplasma des Vegetationspunktes und des ersten und zweiten Blattes an der Grenze der Sichtbarkeit eine Menge mikrosomatischer Grana, die sich ausdehnen, vergrössern und faserige Mitochondrien ausbilden und sich dann weiter zu Plastiden differenzieren. Im dritten Blatt sind die Plastidenanlagen bei der Ankeimung fertig und — ähnlich wie beim Reis — in der Golgi-Zone auf dem zytoplasmatischen und vakuolaren Gebilde in der Nähe des Kerns konzentriert. O'Brien (1942, 1951) beschreibt diese Gebilde als sogenannte Aggregationsmasse, aus der sich im Verlaufe der weiteren Entwicklung die Plastiden loslösen und im ganzen Zytoplasma ausbreiten. Das angehäuften Zytoplasma differenziert sich später sichtlich zu Sphäroplasten. Die in den Zellen unmittelbar nach der Ankeimung (1 bis 11 Stunden) beschriebenen Körnchen erachten wir als mitochondriales ergastisches Material, da sie in der stimulierten (d. i. excitierten) Zelle verschwinden. Dieses ergastische Material enthält wahrscheinlich Eiweissstoffe, die vom Grundzytoplasma bei Entwicklung der Mitochondrien verbraucht werden. Das Zytoplasma färbt sich unmittelbar vor und bei dem Erscheinen der mikrosomatischen Gebilde mit Hämatoxylinpräparaten dunkel. Die Zellen unterhalb des Vegetationspunktes enthalten in grösserer Mengen Aleuronkörner, die mit Säurefuchsin nach Altmann und Eisenhämatoxylin färbbar sind, später vakuolisieren und in kleine, granaähnliche Mitochondrien zerfallen. Die Vakuolen enthalten Fettstoffe, die durch Färbung mit Sudanswarz nachgewiesen werden, und auch der Vegetationspunkt ist reich an fettartigen Stoffen, woraus auf die Möglichkeit einer Teilnahme mitochondrialer Strukturen an der Fettstoffbildung geschlossen werden kann.

Die Aleuronkörner in den Scutellarzellen enthalten Vakuole mit Polysaccharidinklusionen, wie mit der Färbung nach Milovodov festgestellt wurde. Die Zellen des Scutellarepithels weisen 1 bis 2 Stunden nach dem Ankeimungsbeginn kleine kugelige Mitochondrien auf, die sich vergrössern und 11 Stunden nach dem Ankeimungsbeginn stellenweise die Grösse von Aleuronkörnern erreichen. Später zerfallen sie wieder. Die Zellen des Scutellarepithels enthalten eine Menge von Fettstoffen, die Aleuronkörner des Scutellarepithels gleichfalls Vakuolen mit Polysaccharidinklusionen, die auch frei im Zytoplasma gelagert sind. Der Charakter der Aleuronkörner im Scutellum und Scutellarepithel beim Weizen weist auf ihren mitochondrialen Ursprung hin, der auch durch ihre Färbbarkeit mit Janusgrün unterstützt wird. Guilliermond (1941) leitet die Aleuronkörner vom Kolloidgehalt der Vakuolen ab, eine Annahme, die mit der häufigen Vakuolisierung der Mitochondrien und Aleuronkörner erklärt werden kann. Die Aleuronkörner im Scutellum und Scutellarepithel sind sichtlich an der Überführung der Polysaccharide aus dem Endosperm in den Keim beteiligt, bei der anscheinend auch bestimmte Koazervationsprozesse eine wichtige Rolle spielen. Die Anschauungen einiger Autoren (Horning 1933) von der Diastasefähigkeit der Mitochondrien im Scutellum und Scutellarepithel und ihrer Beteiligung an der Polysaccharidversorgung des Keims werden durch unsere Versuche unterstützt. Die inneren Endospermzellen enthalten zu Beginn ihrer Entwicklung sehr kleine mikrosomatische Gebilde, die sich unter dem optischen Mikro-

skop an der Grenze der Sichtbarkeit befinden. In den Endospermzellen hebt sich gut die Grundstruktur des Zytoplasmas, also die mikrosomatischen, durch Fäden verbundenen Gebilde hervor. Eine ähnliche Beobachtung machte auch Duvick (1955). Ausser den mikrosomatischen mitochondrialen Strukturen sind im Zytoplasma ebenso kleine Grana vorhanden, die mit Tannin-Methylgrün nach Milovidov färbbar sind, sich vergrössern und zu Stärkekörnern anwachsen. Ob sich diese Grana unter Teilnahme mikrosomatischer mitochondrialer Strukturen bilden oder ob sie selbständige Gebilde vom Charakter der Glykoproteine sind, kann vorläufig nicht mit Bestimmtheit gesagt werden. In den Randzellen der Aleurone des Endosperms stellen wir übereinstimmend mit Mottier (1921) bereits stäbchen- und fadenartige mitochondriale Gebilde, stellenweise auch junge Plastiden ähnlich jenen in den Blattzellen fest, doch ist ihre Färbbarkeit weitaus weniger intensiv. Sie vakuolisieren oft sehr stark und nehmen eine kugelige Form an.

#### *Diskussion*

Auf Grund unserer Beobachtungen und der heutigen Ansichten über die Mitochondrien können wir nun die Aufgabe und Funktion der Mitochondrien im Pflanzenorganismus andeuten. Nach Millerd und Bonner (1953) ermöglicht der Fortschritt in der Kenntnis von den Funktionen der pflanzlichen Mitochondrien einen tieferen Einblick in den gesamten Charakter des Pflanzenorganismus. Insbesondere gilt dies für die mit der Atmung der Pflanzen verbundenen physiologischen Prozesse. Pflanzliche Gewebe oder Organe, die an bestimmten biologischen Schöpfungsprozessen beteiligt sind, atmen bekanntlich intensiver als dieselben Organe im Ruhezustand. Die enzymatischen Systeme vermitteln die Überführung der in den Mitochondrien enthaltenen Phosphate und sind daher vor allem an den Oxydations- und Phosphorylationsprozessen beteiligt. Unsere Beobachtungen unterstützen die Ansichten über die Beziehung der Mitochondrien zum Umsatz der Zucker und Fettstoffe in den keimenden Pflanzen sowie im entstehenden Endosperm und stimmen gleichfalls mit den Ansichten über die Regulationsfunktion der Mitochondrien in den grundlegenden Prozessen der physiologischen Aktivität überein. Die Umwandlung von Stärke in lösliche Zucker vom Pektintypus, der Transport der Pektinsubstanzen in den Keim, die Ablagerung und Bildung von Fettstoffen und Stärke im Endosperm gehören zu jenem physiologischen Geschehen, das von den Phosphorylationsprozessen der Mitochondrien geleitet und reguliert wird. Die Kenntnisse von den Eiweissstoffen und Lipiden der Mitochondrien und anderen Elemente sind allerdings noch sehr unvollkommen. Die Feststellung bestimmter enzymatischer Systeme in den Mitochondrien bewirkte, dass sämtliche enzymatischen Gewebefunktionen zu Unrecht ausschliesslich den Mitochondrien zugeschrieben wurden (Schneider 1953). Die zytoplasmatische mikrosomatische Struktur umfasst gleichfalls Enzyme der Atmungsvorgänge, da auch nach Beseitigung der Mitochondrien die Atmung des Zytoplasmas, auch wenn bereits weniger intensiv als bei ihrer Anwesenheit, nicht aufhört (Literatur hierüber siehe bei Monné und Harde 1952). Es scheint, dass die Mitochondrien die Zentren wichtiger Atmungs- und anderer Enzyme sind, die vom Zytoplasma aufgebaut werden und im Verlaufe der Zellentwicklung die physiologische Regulation der Zellen übernehmen.

Auf Grund der angeführten Erkenntnisse können wir, in Übereinstimmung mit Cowdry (1953), die Mitochondrien folgend charakterisieren: 1. Sie sind die Grundelemente des Zellzytoplasmas. 2. Sie besitzen eine umfangreiche Oberfläche, die eine gute Berührung mit dem umgebenden Zytoplasma ermöglichen. 3. Sie sind aus Lipoprotein zusammengesetzt. 4. Sie sind Zentren des schöpferischen Metabolismus, kleine Einrichtungen, die viele für die Zelle lebensnotwendige Produkte erzeugen.

*(Bildtafeln XLIII, XLIV, XLV, XLVI)*

L i t e r a t u r

- Baker, J. R.: Cytological technique. London 1951.
- Cowdry, E. V.: Historical Background of Research on Mitochondria. J. Histochem. Cytochem. 1 : 183, 1953.
- Duvick, D. N.: Cytoplasmic Inclusions of the Developing and Mature Maize Endosperm. Am. J. Bot. 42 : 717, 1955.
- Guilliermond, A.: The Cytoplasm of the Plant Cell. Waltham 1941.
- Harman, J. W.: The Selective Staining of Mitochondria. Stain Technol. 25 : 69, 1950.
- Horning, E. S.: The Enzymatic Function of Mitochondria. Erg. Enzymforsch. 2 : 336, 1933.
- Hršel, I.: Vliv různých fyziologických podmínek na vývoj cytoplasmatických struktur v buňkách rostlinných a živočišných. (Rozpravy ČSAV, 1957.)
- Lison, L.: Histochemie animale. Paris 1936.
- McManus, J. F. A., Cason, J. E.: Carbohydrate Histochemistry by Acetylation Techniques. J. Exp. Med. 91 : 651, 1950.
- Millerd, A., Bonner, J.: The Biology of Plant Mitochondria. J. Histochem. Cytochem. 1 : 254, 1953.
- Milovidov, P. F.: Sur les méthodes de double coloration du chondriome et des grains d'amidon. Arch. Anat. micros. 24 : 9, 1928.
- Monné, L., Harde, S.: Changes in the Protoplasmic Properties Occuring upon Stimulation and Inhibition of the Cellular Activities. Ark. for Zool. 3 : 289, 1952.
- Mottier, D. M.: On Certain Plastids with Special Reference to the Protein Bodies of Zea, Ricinus and Conopholis. Ann. Bot. 35 : 349, 1921.
- Němec, B.: Über centrosomähnliche Gebilde in vegetativen Zellen der Gefäßpflanzen. Ber. deutsch. bot. Gesellsch. 19 : 301, 1901.
- O'Brien, J. A.: Cytoplasmic Inclusions in the Glandular Epithelium of the Scutellum of Triticum sativum and Secale cereale. Am. J. Bot. 29 : 479, 1942.
- O'Brien, J.: Plastid Development in the Scutellum of Triticum sativum and Secale cereale. Am. J. Botany 38 : 684, 1951.
- Schneider, W. C.: Biochemical Constitution of Mammalian Mitochondria. J. Histochem. Cytochem. 1 : 212, 1953.
- Steiner, M.: Hinweise auf eine Längsverdopplung von Mitochondrien bei Oospora lactis. Naturwissenschaften 41 : 191, 1954.
- Wallraff, J.: Über ein Verfahren zur Darstellung des Idiosom, des Akrosom und Kopfkappen der Samenzellen. Z. Wiss. Mikr. 60 : 30, 1951.

Исследования митохондриальных образований у риса и пшеницы

И. ГРШЕЛЬ

Резюме

Задачей настоящей работы было исследование развития митохондриальных структур у риса, прорастающего при различных физиологических условиях (под водой, во влажной среде, на свету, в темноте). Были установлены и описаны различия в развитии митохондриальных структур при прорастании в темноте, под водой и во влажной среде. У пшеницы митохондриальные структуры изучались нами в эпителии щитка зародыша, в щитке, в точке роста, в зачатках листьев и в образующемся эндосперме. Была отмечена значительная морфологическая изменчивость митохондриальных образований в различных типах клеток, зависящая от физиологического состояния клетки в различных фазах прорастания и образования эндосперма. В отличие от прежних взглядов относительно происхождения алейроновых зерен из вакуолей, — по нашим наблюдениям, алейроновые зерна также происходят из митохондриальных структур. Но митохондриальные образования часто подвергаются вакуолизации и другим морфологическим изменениям, которые связаны с физиологическим состоянием клетки и не должны обязательно быть признаком повреждения. — В заключении излагается взгляд на значение и функцию митондриев в растительной клетке, основанный на собственных наблюдениях и на данных современной науки.

(Табл. XLIII, XLIV, XLV, XLVI)

## FOLIA BIOLOGICA

Tom. II. (1956) — Fasc. 6

### Die Feststellung der Lebensfähigkeit von Mutterkornpilzkonidien mittels Vitalfärbungsmethode

P. MILOVIDOV

Forschungsinstitut für Heilpflanzen, Praha

Eingelangt am 5. 9. 1956

Die Wirksamkeit von Mutterkornpilz-Impfsuspensionen, in denen lebende Konidien ein wesentliches Element vorstellen, wurde bisher mit einer ziemlich arbeitsreichen und langwierigen Methode kontrolliert, die in der Feststellung der Keimfähigkeit von Konidien auf festen Nährböden in Petri-Schalen bestand (Kybal und Vavroušková 1955). Ich habe daher eine Färbungsmethode der Mutterkornpilzkonidien mit Neutralrot ausgearbeitet, die eine schnelle Orientierung und sogar eine ziemlich genaue Bestimmung des Prozentsatzes lebender Konidien bei verschiedenen in der Praxis verwendeten Impfstoffen ermöglicht. Diese Methode, die gegenüber dem herkömmlichen Untersuchungsmodus eine Reihe von Vorteilen aufzuweisen hat, stützt sich auf die bekannte Erfahrung, dass das Neutralrot in der lebenden Pflanzenzelle nur die Elemente des Vakuoms färbt (P. A. und P. Dangeard 1919, 1923a, b, Guilliermond 1927, 1929a, b, 1930).

#### *Experimentelles*

Es wurden 30 Standardversuche mit drei Mutterkornpilz-Impfstoffarten vorgenommen, und zwar mit den in Reagensgläsern auf Agar gezüchteten Kulturen, mit getrocknetem Material und mit Kulturen, die sich in Flaschen auf Roggenkorn-Substrat entwickelten. Untersucht wurden Ergotoxin- und Ergotaminkulturen, gemischte, gewöhnliche und Monokonidienkulturen, und zwar sowohl völlig gesunde und gut entwickelte als auch unentwickelte oder sehr alte, manchmal auch kontaminierte Kulturen im Alter von 36 bis 222 Tagen (siehe Tab. I). In einem Versuch wurden annähernd 200 bis 1000 Konidien gezählt. Die Verdünnung betrug bei dem Trockenmaterial (100 g) 50 bis 100 l, bei den auf Agar gezüchteten Kulturen 100 ml oder mehr, bei den Flaschen-Kulturen 100 l; im allgemeinen wurde sie aber so gewählt, dass eine Suspensionskonzentration von 4–5 Konidien in einem Rechteck der Bürkerschen Zählkammer erzielt wurde.

Die Färbung erfolgte durch Beigabe von 25 mg Farbstoff in substantia in 50 ml Konidien-suspension (= 0,05%-ige Lösung), die ungefähr 5 Min. geschüttelt und 3–4 Stunden (manchmal auch weniger) unter Laboratoriumstemperatur stehen gelassen wurde. Vor Gebrauch wurde dann die Suspension neuerlich geschüttelt und in die Bürkersche Zählkammer eingebracht. Gezählt wurden regelmässig 100 Rechtecke in 4 Feldern (2×2), wobei auch tote Konidien beachtet wurden, sodass sich sowohl der Prozentsatz als auch die Gesamtzahl der lebenden Konidien im geprüften Muster leicht feststellen liess. Ein Teil der Konidien wurde zur Parallelbestimmung der Keimungsfähigkeit nach den Grundsätzen der bisherigen Methode (Kybal, Vavroušková 1955) verwendet. Die in % festgestellten Maximalwerte wurden dann miteinander verglichen.

Die von einer eingearbeiteten Kraft zur Durchführung eines Versuchs nach dieser Methode benötigte Zeit beträgt ungefähr einen halben Tag (5 Stunden), während die bisherige Methode mindestens 3 Tage erforderte. Die eigentliche zahlenmässige Bestimmung von lebenden Konidien unter dem Mikroskop dauert ungefähr ½ Stunde. Die neue Methode ist also bedeutend kürzer, einfacher und zur Bestimmung der Zahl lebender Konidien in der Kultur geeignet. Sie ist auch billiger, da die Verwendung von Agar ausfällt.

In vereinzelt Fällen kommt es vor, dass die Färbung der Konidien mit Neutralrot auch nach 3–4 Stunden, manchmal auch nach 24 Stunden unzureichend ist und dass sich die Konidien erst nach

Beigabe einer weiteren Menge des Färbungsmittels (Konzentrationserhöhung) zu färben beginnen. Das hauptsächlichste Hindernis besteht darin, dass der Farbstoff von den Agarteilchen absorbiert wird, die während der Suspensionszubereitung beim Passieren des Inhaltes der Reagensgläser in das Wasser gelangen, wodurch die Färbung der Objekte vereitelt wird.

Die Färbbarkeit der Konidien steigt, wenn diese von dem Agar vorsichtig abgekratzt und mit Wasser abgespült werden. Bei diesem Bearbeitungsmodus färben sich die Konidien optimal bereits nach 1 Stunde.

### Ergebnisse und Diskussion

Die Neutralrotlösung färbt, wie bekannt, in den lebenden Zellen das Vakuolensystem diffus rosa oder bringt in den Vakuolen rot gefärbte Körnchen zum Niederschlag. Diese Färbung ist für den Vakuoleninhalt elektiv, da sich weder das Zytoplasma noch der Zellkern färbt. Manchmal färbt sich in den Vakuolen sowohl ihr Inhalt (rosa) als auch die Körnchen (rot) (vgl. Guilliermond). Dagegen tritt in den

Tab. I. Ergebnisse der Versuche mit Neutralrotfärbung

Ver- suchs- zahl	Art des Alka- loids	Art des Ausgangs- materials für Impfstoffe	Alter der Kultur in Tagen	Prozentsatz der lebenden Konidien	Prozentsatz der keimenden Konidien	Unterschied zwischen beiden Methoden in %
1	Ex	Roggenkorn-Pilzkultur	36	85,3	88,3	- 3,0
2	Em	"	45	76,3	65,1	+ 11,2
3	Ex	"	48	74,0	71,8	+ 2,2
4	Ex	"	48	81,7	81,5	+ 0,2
5	Em	"	55	68,4	66,2	+ 2,2
6	Ex	"	78	71,1 <sup>1)</sup>	78,4	- 7,3
7	Ex	"	84	71,5	71,1	+ 0,4
8	Ex	"	87	66,2	75,2	- 9,0
9	Em	"	98	46,0	39,4	+ 6,6
10	Ex	"	106	39,2 <sup>2)</sup>	45,4	- 6,2
11	Em	"	110	12,5	7,4	+ 5,1
12	Em	"	118	2,9	3,6	- 0,7
13	Ex	Roggenkorn-Pilzkultur	62	72,2	66,5 <sup>3)</sup>	+ 5,7
14	Ex	"	73	48,4	62,9	- 14,4
15	Ex	"	80	66,0	63,0	+ 3,0
16	Ex	"	183	13,5	12,5	+ 1,0
17	Ex	"	222	5,2	einzeln	+ 5,2
18	Ex	Agar-Pilzkultur	40	83,8	81,5	+ 2,3
19	Ex	"	44	91,7	84,4	+ 7,3
20	Em	"	49	77,2 <sup>4)</sup>	76,3	+ 0,9
21	gemischt	"	51	88,7 <sup>3)</sup>	80,2	+ 8,5
22	Em	"	65	78,0	70,6	+ 7,4
23	Ex	"	80	72,2	74,5	- 2,3
24	Ex	"	83	71,2	77,3	- 6,1
25	Em	"	86	74,1	73,5	+ 0,6
26	Ex	"	91	59,1	63,5	- 4,4
27	gemischt	"	97	65,0	65,4	- 0,4
28	Ex	"	105	56,7	70,7	- 14,0
29	gemischt	"	103	71,3	70,6	+ 0,7
30	Ex	"	111	76,1	7,2	- 0,1
Arithmetischer Gesamtdurchschnitt						± 4,6

Bemerkung: <sup>1)</sup> Durchschnitt aus 5 Bestimmungen; <sup>2)</sup> Durchschnitt aus 3 Bestimmungen; <sup>3)</sup> Durchschnitt aus 2 Bestimmungen; <sup>4)</sup> Durchschnitt aus 2 Angaben nach zwei Färbungsmethoden. Ex = Ergotamin; Em = Ergotamin.



beschädigten und absterbenden Zellen eine Inversion der Färbung ein; das Vakuolensystem wird entfärbt, während sich Zellkern und Zytoplasma intensiv färben und die Strukturen im Zellkern sichtbar werden. Tote Konidien färben sich zur Gänze und intensiv; sie sind zusammengeschrumpft. Längst abgestorbene (leere) Konidien färben sich nicht mehr. In Standardsuspensionen ist zu ersehen, dass bei lebenden Konidien sich nur die Vakuoleninklusionen (eine oder mehrere) rot färben, die gewöhnlich die typische Brownsche Molekularbewegung aufweisen. Während der Beobachtung sterben dann einige Konidien ab, wobei die erwähnte Färbungsinversion eintritt. Auch keimende Konidien nehmen die Farbe sehr gut an, und die farbigen Körnchen sind dann sowohl in der Spore selbst als auch im Keim und dann im Fadenmyzel sichtbar.

In sehr alten Kulturen (bis zu 1 Jahr) färben sich lediglich vereinzelte Zellen oder auch besonders grosse, auf den Hyphen entstandene Gebilde, gewissermassen „Dauersporen“, die aber keine besonders dicke Membran besitzen. Auch in diesen sphärischen Gebilden färben sich die Körner und es handelt sich also um lebende Zellen. Das Überleben solcher grossen kugeligen Sporen in alten Kulturen entspricht der Erfahrung, dass aus solchen Kulturen vereinzelte Konidien keimen können. Sie verdienen als Entwicklungsstadium des Pilzes Aufmerksamkeit, dessen Zweck die Arterhaltung unter ungünstigen Bedingungen ist. In einigen Konidien sind neben rot gefärbten Körnchen noch stark lichtbrechende runde Körperchen zu finden, deren chemischer Charakter unbekannt ist und die möglicherweise als Riboflavin angesprochen werden kann, das bei Pilzen sehr verbreitet ist. Diese tropfenartigen Körperchen werden nach Färbung mit Neutralrot (und auch mit Methylenblau) öfters gelb bis rotgelb. Es tritt eine Doppelfärbung ein: der Vakuoleninhalt färbt sich diffus rosa oder die Färbung lokalisiert sich in den Körnchen, während das zweite tropfenartige Körperchen gelb wird.

Die Zahl der lebenden, mit Neutralrot gefärbten Konidien erreicht ihr Optimum ungefähr zwischen der 2. und 4. Stunde und sinkt stark nach der 24. Stunde. Es bestehen jedoch Ausnahmen, besonders bei den auf andere Weise verarbeiteten Agarkulturen.

Aus den in Tabelle I angeführten Versuchangaben ist zu ersehen, dass die minimale Abweichung im Vergleich zu der alten Methode — 0,1%, die maximale dann —14,4 % (kontaminierte Kultur) oder + 11,2 % (gesunde Kultur) beträgt. Der Gesamtdurchschnitt aus allen 30 Versuchen beträgt  $\pm 4,6$  %, übersteigt also nicht 5,0 %. Die Genauigkeit dieser schnellen Methode ist also hinreichend gross und die erzielten Ergebnisse entsprechen voll auf den Ergebnissen, die mit der bisherigen Methode zur Feststellung der Keimfähigkeit gewonnen wurden. Einen grossen Nachteil bedeutet das Fehlen einer verlässlichen Vergleichsmethode, da die Keimmethode, obzwar grundsätzlich sehr gut, in praktischer Hinsicht aus mehreren Gründen nicht als genau anzusehen ist. 1. Die keimenden Konidien werden auf 2 Agarplatten in Petri-Schalen gezählt, und zwar bei jeder an 20 Stellen. Diese Stellen enthalten nicht selten nur sehr wenige Konidien, sodass die Gesamtzahl der Konidien völlig unzureichend ist. Ausserdem sind diese Konidiengruppen auf der Platte gewöhnlich sehr ungleichmässig verteilt (Klumpenbildung). 2. Die Endzahl der auskeimenden Konidien ist in der Regel niemals bekannt, da die Agarplatte, besonders gegen Versuchsende zu (am 3.—4. Tag, manchmal noch früher), sehr stark von Pilzhypen überwuchert ist und die genaue Bestimmung der Zahl von keimenden Konidien dadurch unmöglich gemacht wird. Die Endzahl muss daher entweder annähernd geschätzt werden, was völlig ungenau ist, oder es wird die zuletzt festgestellte genaue Zahl als endgültige Zahl angesehen. Wir haben in der Regel diese zweite Möglichkeit benützt.

Aus dem oben gesagten schliessen wir, dass die Methode der Färbung von Konidien in vivo mit Neutralrot entweder mit 0,05%-iger Wasserlösung (Gesamtkonzentration der Suspension) oder mit dem der Suspension beigegebenen Farbstoff in substantia gute Ergebnisse bringt und zur Orientierung sowie auch zu einer genaueren Feststellung der Zahl von lebenden Konidien im Impfstoffe empfohlen werden kann.

#### *Zusammenfassung*

Der Verfasser beschreibt eine von ihm ausgearbeitete schnelle Methode zur Feststellung der Zahl von lebenden Konidien in verschiedenen Arten von Mutterkornpilz-Impfstoffen zum Zwecke ihrer Wirksamkeitsbestimmung. Die einfache und sehr schnelle Methode ist auf der Möglichkeit aufgebaut, lebende Konidien in der Suspension durch Vitalfärbung mit Neutralrot unterscheiden zu können. Das Neutralrot färbt in den lebenden Konidien den gesamten Vakuoleninhalt diffus rosa und die Vakuolenkörperchen elektiv rot. In toten Zellen färben sich distinkt das ganze Zytoplasma und der Zellkern mit seinen Strukturen; die Zelle schrumpft zusammen. Die optimale Dauer der Färbung mit 0,05%-iger Farbstofflösung beträgt 3 bis 4 Stunden. Nach 24 Stunden nimmt die Zahl von lebenden Konidien in der Suspension stark ab. Die Angaben der neuen und der bisher angewandten Methode über die Zahl von keimenden Konidien differieren um weniger als 5 % (Mittelwert aus 30 Versuchen). In sehr alten Pilzkulturen wurden besondere Gebilde gefunden, die sich an den Pilzhyphen bilden („Dauersporen“), typisch mit Neutralrot färben und lebendig sind. Ihre Anwesenheit gibt eine Erklärung für die Möglichkeit, aus sehr alten Kulturen ein neues Myzel kultivieren zu können.

#### *L i t e r a t u r*

- D a n g e a r d, P. A.: Nouvelles recherches sur le système vacuolaire. Bull. Soc. Bot. France, 1916a.
- D a n g e a r d, P. A.: La métachromatine chez les Mucorinées. Bull. Soc. Mycol., 1916b.
- D a n g e a r d, P. A.: Sur la distinction du chondriome des auteurs en vacuome, plastidome et sphérome. C. R. Acad. Sci. Paris 169 : 1005, 1919.
- D a n g e a r d, P.: Recherches sur l'appareil vacuolaire dans les végétaux. Le Botaniste sér. 15, 1923a.
- D a n g e a r d, P.: Etudes de biologie végétale: l'évolution du système vacuolaire chez les plantes. Le Botaniste 15 : 1, 1923b.
- G u i l l i e r m o n d, A.: Sur l'action du rouge neutre sur les cellules végétale et sur la coloration vitale du vacuome. Bull. d'Histol. appl. 4 : 1, 1927.
- G u i l l i e r m o n d, A.: The Recent Development of our Idea of the Vacuome of Plant Cells. Amer. J. Bot. 16 : 1, 1929a.
- G u i l l i e r m o n d, A.: Sur le développement d'un Saprolegnia dans des milieux additionnés de colorants vitaux et la coloration du vacuome pendant la croissance. C. R. Acad. Sci. Paris 188 : 1621, 1929b.
- G u i l l i e r m o n d, A.: Culture d'un Saprolegnia en milieux nutritifs additionnés de rouge neutre. Valeur de la méthode de coloration vitale. Bull. d'Histol. appl. 7 : 97, 1930.
- K y b a l, J., V a v r o u š k o v á - Z a d i n o v á, K.: Žitné obilky, vhodný substrát pro kultivaci konidií Claviceps purpurea, účinné složky očkovací látky pro polní pěstování námele. Čs. biologie 4 : 550, 1955.

Определение жизнеспособности конидий спорыньи по методу  
прижизненного окрашивания

П. МИЛОВИДОВ

*Резюме*

Автор разработал новый метод быстрого подсчета количества живых конидий в суспензиях спорыньи для искусственной инфекции, служащий для определения их эффективности. Метод, — очень простой и быстрый, — основан на возможности отличить живые конидии во взвеси путем их прижизненной окраски нейтральным красным: в живых конидиях этот краситель окрашивает или диффузно все одержимое вакуолей в розовый цвет, или же только вакуолярные осадки — в красный цвет. В мертвых клетках нейтральный красный окрашивает явственно всю протоплазму и ядро со структурами, причем клетка сморщивается. Оптимальная продолжительность окрашивания 0,05% раствором красителя — 3—4 часа. Через 24 часа количество живых конидий во взвеси значительно уменьшается. Разница между данными, получаемыми с помощью нового метода окрашивания, и данными применявшегося до сих пор метода определения количества проросших конидий составляет меньше 5% (среднее из 30 опытов). В очень старых культурах грибка были найдены особые образования, возникающие на гифах, — своеобразные «покоящиеся споры», для которых типично окрашивание как у живых клеток. Их присутствием объясняется возможность вырастить из старых культур новый мицелий.

Краткие сообщения

Brief Reports

Kurze Mitteilungen

Передающийся лизис клеток *Escherichia coli*, вызываемый  
рентгеновским облучением

Ф. ГЕРЧИК

Биофизический институт ЧСАН, Брно

*Поступило в редакцию 27 IV 1956*

Бактерии *Escherichia coli*, после воздействия на них соответственной дозой ультразвука, подвергаются лизису, причем распадаются на множество однородных шариков, диаметром в 200—300 Å (Градечная 1956а). Ультрафильтрат распавшихся таким образом клеток вызывает лизис у здоровых клеток того же штамма. Этот лизис оказывается переносным (Градечная 1956б).

Задачей настоящей работы было установить, способно ли рентгеновское облучение вызывает подобный лизис и не является ли он также переносным. До сих пор было произведено более 68 опытов, результаты которых приводятся в настоящем предварительном сообщении.

Мы производили облучение с помощью трубки Chaoul-я, 56 kV, 3 mA, 0,15 мм Cu, приток  $111 \text{ г} \cdot \text{м}^{-1}$ . Дозу облучения мы измеряли абсолютно, с помощью компенсационного метода с применением камеры Taylor-Stoneburner-a (Герчик 1948). Мы использовали для облучения 3 штамма *E. coli*. Большинство опытов было произведено со штаммом *E. coli* В, который нам любезно предоставил доц. Келленбергер из Биофизического института Женевского университета. Это не лизогенный штамм. Мы облучали в пробирках, с соблюдением строго стерильных условий, культуры различного возраста (от 1 до 24 часов, большей частью 3-часовые). Для облучения мы пользовались взвесью бактерий с концентрацией в  $10^7$  в 1 мл бульона. Густота взвеси бактерий измерялась турбидометрически. После облучения мы фильтровали бактерии через коллоидный фильтр со средним диаметром пор в 620 мμ. Мы прибавляли 5 мл фильтрата к 24-часовой взвеси необлучавшихся бактерий в бульоне. В качестве контроля служили необлучавшиеся бактерии, 5 мл фильтрата которых мы также прибавляли ко взвеси необлучавшихся бактерий из 24-часовой культуры. В обоих случаях концентрация бактерий бывала приблизительно  $10^6$  в 1 мл.

Из общего количества 68 опытов 22 было позитивных, т. е. удавалось или при первом же, или при некотором из следующих пассажей путем прибавления фильтрата вызвать полное прояснение культуры. Фильтрат проясненной культуры опять-таки содержал литическое начало. Производилось до 9 пассажей. Титрация при третьем пассаже показала наличие литического начала в титре  $10^6$ — $10^7$ . Служивший в качестве контроля фильтрат необлучавшихся бактерий лизиса не вызывал. Электронномикроскопические препараты лизата представляли распавшиеся клетки с типичными однородными шариками, диаметром приблизительно в 300 Å. Произведенные нами до сих пор опыты свидетельствуют о том, что для возбуждения лизиса требуется определенная оптимальная доза рентгеновского облучения. При измерениях в воздухе она колеблется от 75 до 300 г. Нетрудно вычислить, что при дозе в 300 г в бактерии с объемом в  $0,5 \mu^3$  возникает приблизительно 600 случаев ионизации. На один шарик приходится  $4 \cdot 10^{-1}$  ионизации. Таким образом ионизируется каждый 250-ый шарик. Встречаемость этого явления не постоянна и зависит, повидимому, от физиологического состояния бактерии, от оптимальной дозы и от других, пока не изученных факторов.

Обобщая, можно сказать, что рентгеновское облучение вызывает лизис у нелизогенных бактерий *E. coli* и что этот лизис оказывается переносным.

#### Literatura

- Herčík, F.: Analýza vlnového činitele s hlediska kvantově biologického. Spisy lék. fak. MU, 12, čís. 3, 1948.  
 Herčík, F.: Problém bakteriofága. Praha 1953.  
 Hradečná, Z.: Rozpad bakterií v uniformní globuly pod vlivem ultrazvuku. Čs. biologie 5 : 117, 1956a.  
 Hradečná, Z.: Lysa bakterií Escherichia coli vyvolaná filtrátem ozvучených bakterií. Čs. biologie 5 : 241, 1956b.

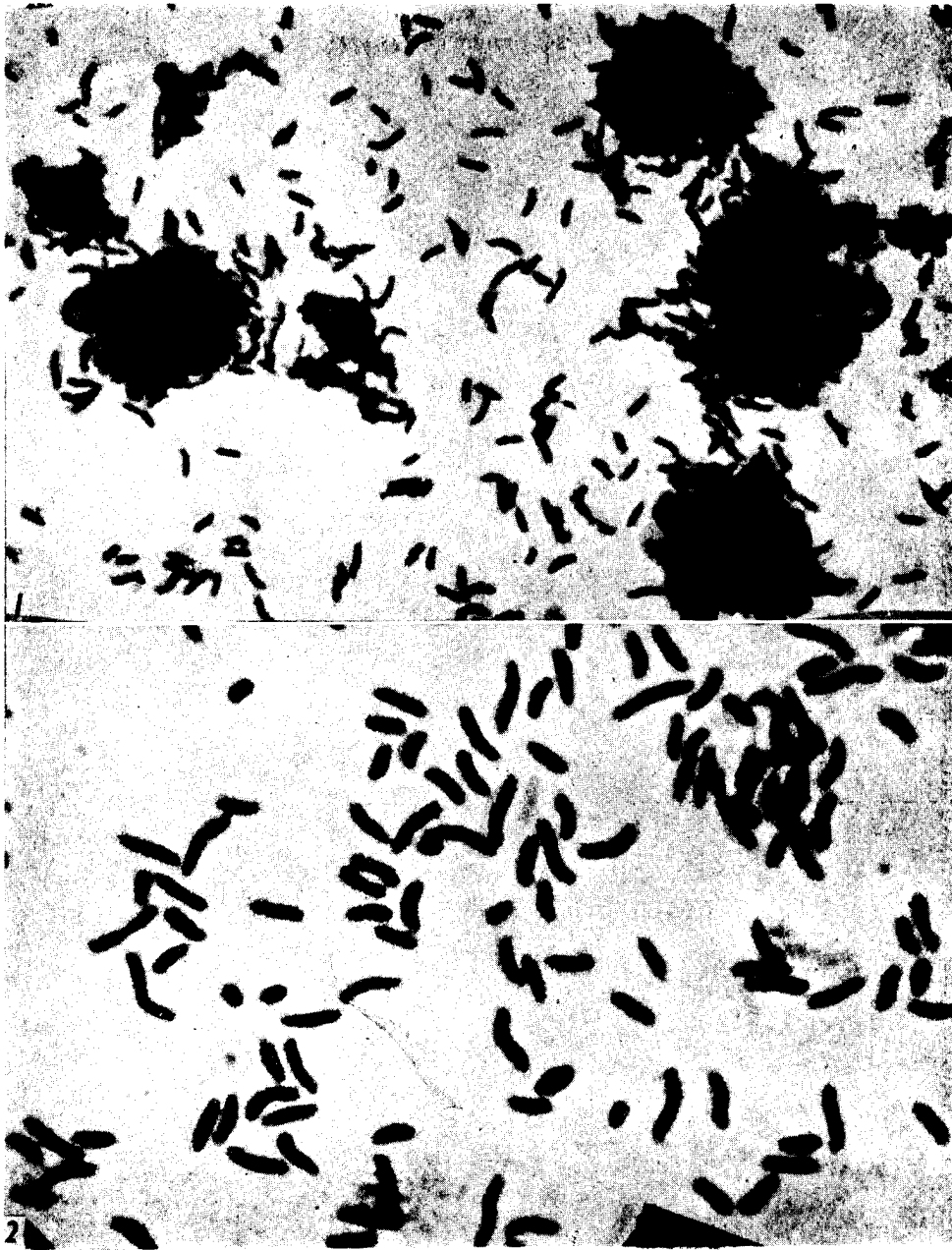


Fig. 1. Colony of sulphate-reducing bacteria on thigmotaxic agar after 24 hrs. cultivation. Stain - carbofuchsin, magnification 1,000x.

Fig. 2. Bacteria of genus *Desulfovibrio* from 24-hour culture in lactate medium. Thigmotaxic preparation, carbofuchsin stain, magnification 1,000x.

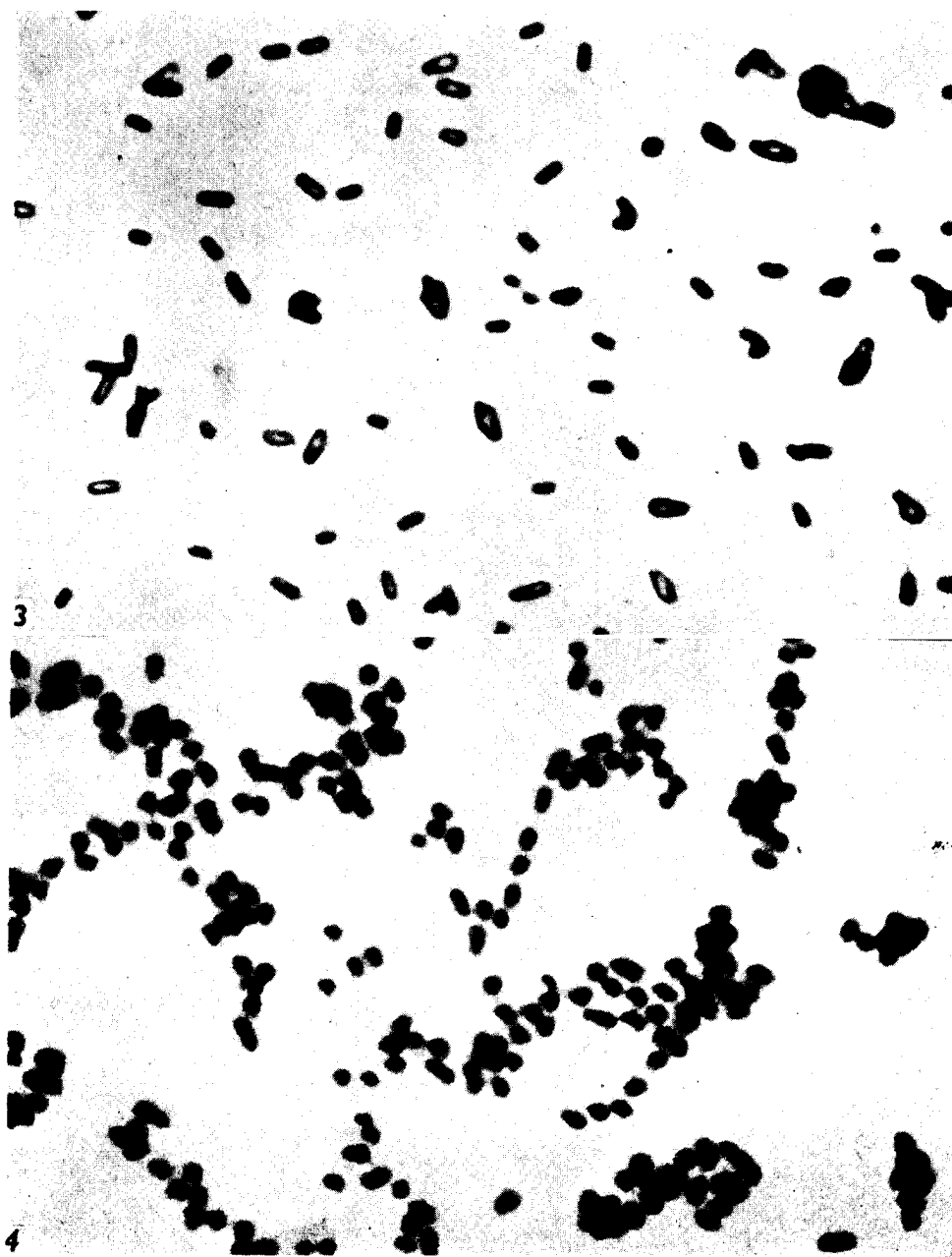


Fig. 3. Sporulating Gram negative accompanying bacteria from cultures of sulphate-reducing bacteria. Lactate agar. Stain — carbolfuchsin, magnification 1,000.

Fig. 4. Coccoid Gram positive accompanying bacteria from culture of sulphate-reducing bacteria. Lactate agar. Stain — carbolfuchsin, magnification 1,800.

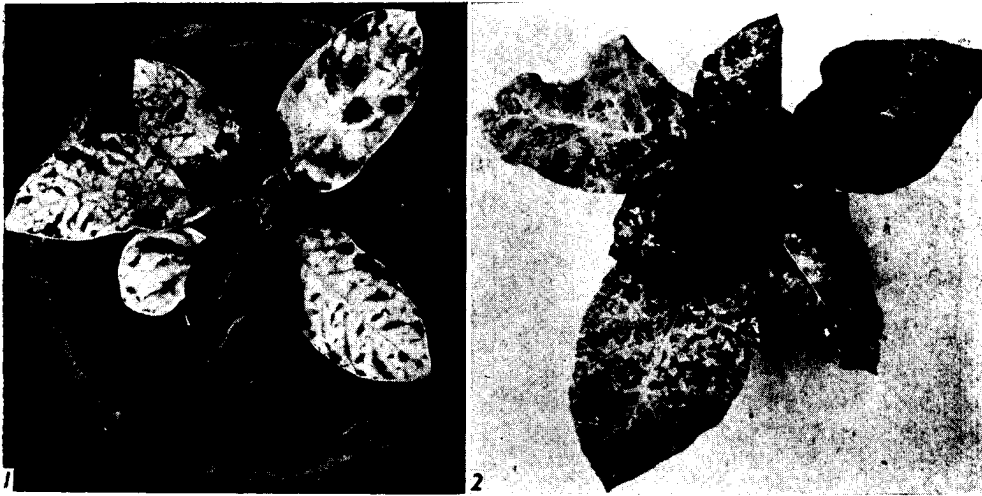


Abb. 1. *N. tabacum* Samsun, systemisch erkrankt an einem VTM AL-Stamm. Versuchsjahr 1955.

Abb. 2. *N. tabacum* Samsun, systemisch erkrankt an einem VTM S-Stamm. Versuchsjahr 1955.



Abb. 3. *N. tabacum* Samsun, systemisch erkrankt an einem VTM Typ-Stamm. Versuchsjahr 1955.  
Blätter schwach dekoloriert, stark deformiert und verbeult.

Abb. 4. *N. tabacum* Samsun. Die an einem VTM S-Stamm systemisch erkrankte Pflanze wurde später mit VTM Typ geimpft. Die für den VTM S-Stamm charakteristischen Symptome an den unteren Blättern treten allmählich bei den weiteren Blättern zurück, während die Symptome des VTM Typ-Stammes überhandnehmen. An den jüngsten Blättern erscheinen nur noch die Symptome des VTM Typ-Stammes.  
Versuchsjahr 1955.

Abb. 5. *N. tabacum* Goldener Virginier. Die an einem VTM Typ-Stamm systemisch erkrankte Pflanze wurde später mit VTM AL geimpft. Symptome der Anwesenheit beider Stämme (Deformationen, Dekolorationen) sind auch an den jüngsten Blättern wahrnehmbar. Versuchsjahr 1954.



Abb. 6. *N. tabacum* Samsun. Die mit VTM AL infizierte Pflanze wurde vor Manifestation der Symptome mit VTM Typ geimpft. Der VTM AL-Stamm wurde durch den VTM Typ-Stamm scheinbar „verdrängt“, die jüngsten Blätter sind ohne Dekolorationen, jedoch deformiert. Versuchsjahr 1955.

Abb. 7. *N. tabacum* Samsun. Die Pflanze mit Initialsymptomen einer systemischen Erkrankung an VTM AL wurde mit VTM Typ geimpft. Der VTM AL-Stamm wurde durch den VTM Typ-Stamm scheinbar „verdrängt“, die jüngsten Blätter sind ohne Dekolorationen, jedoch deformiert. Versuchsjahr 1955.

Abb. 10. Ähnlicher Fall wie auf Abb. 9. Die Symptome der Anwesenheit des VTM AL-Stammes sind sehr schwach, der VTM Typ-Stamm macht sich durch starke Deformationen und sehr schwache Dekoloration bemerkbar. Die „Verdrängung“ ist ebenfalls nur „scheinbar“. Versuchsjahr 1955.

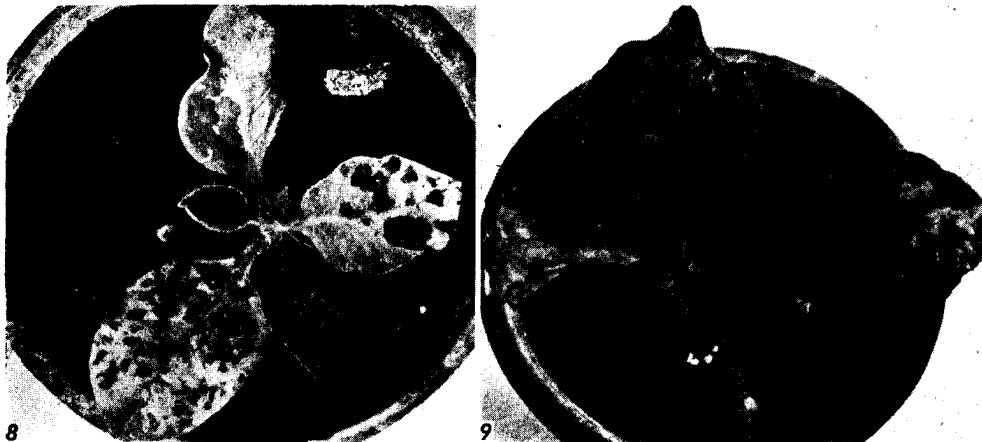


Abb. 8. *N. tabacum* Samsun. Die an einem VTM AL-Stamm systemisch erkrankte Pflanze wurde nachträglich mit einem VTM Typ-Stamm geimpft. VTM AL ist scheinbar durch VTM Typ „verdrängt“; die älteren Blätter mit typischen Symptomen des VTM AL-Stammes sind stark dekoloriert, die jüngsten Blätter deformiert, aber nur sehr schwach entfärbt. Versuchsjahr 1955.

Abb. 9. *N. tabacum* Samsun. Mit einem Gemisch von VTM Typ und VTM AL geimpfte Pflanze. Die typischen, aber im Vergleich zu den nur mit VTM AL geimpften Kontrollen schwächeren Symptome des VTM AL-Stammes treten auf den jüngsten Blättern allmählich zurück. Der VTM Typ-Stamm herrscht vor, der VTM AL-Stamm ist scheinbar „verdrängt“. Versuchsjahr 1955.



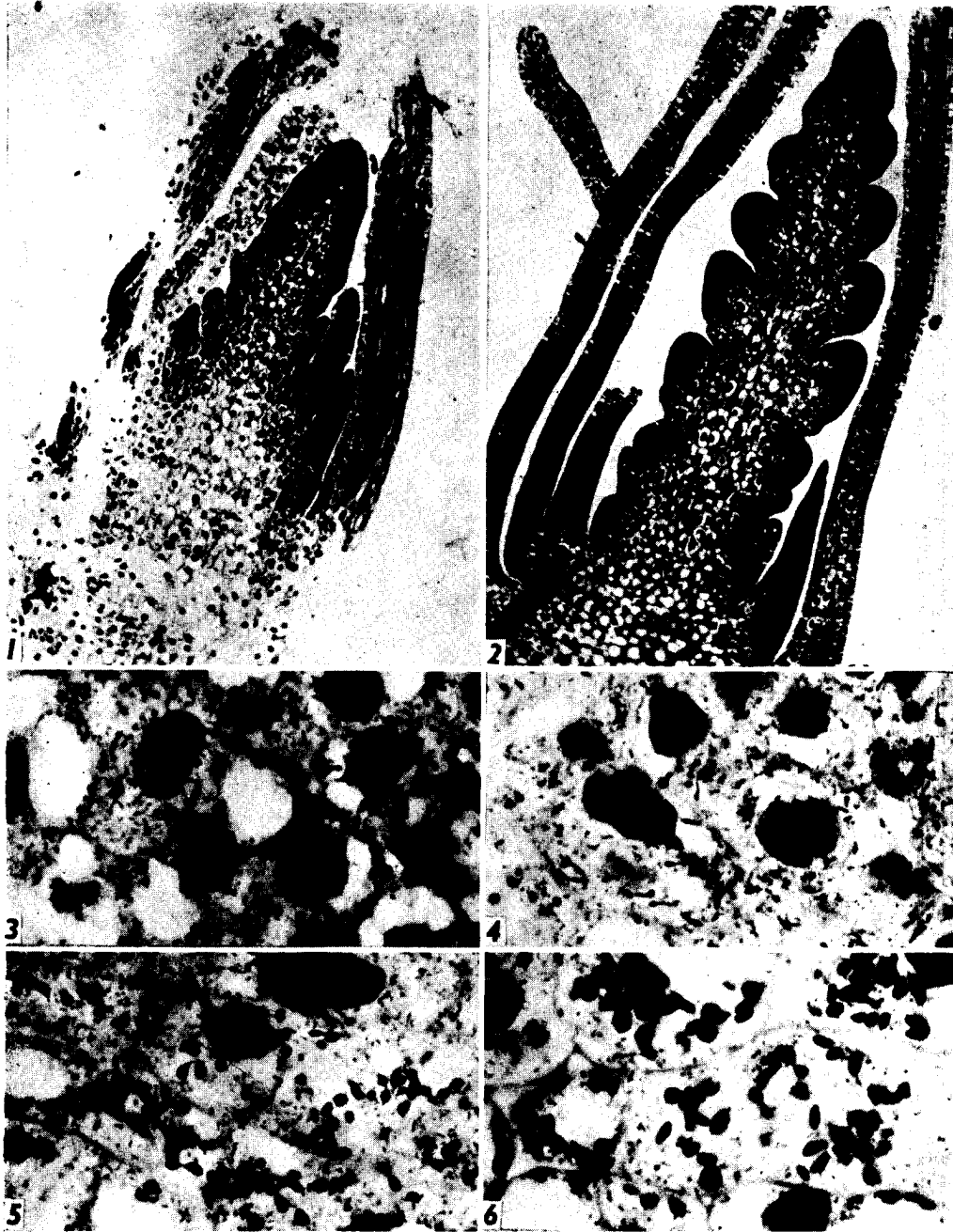


Abb. 1, 2. Der Vegetationspunkt bei *Triticum vulgare*, Sorte Niva, vom 11. 5. (1) und 18. 5. (2). Fixiert nach Zirkle-Formol, gefärbt mit dem Regaudschen Hämatoxylin. Vergröss.  $85\times$ .

Abb. 3-6. Die Entwicklung der Plastiden. Fixiert nach Zirkle-Formol, gefärbt mit dem Regaudschen Hämatoxylin und Bordeaux R. Vergröss.  $1000\times$ .

V. Sosnová: Anatomisch-zytologische Studie über die Plastiden  
der Vegetationspunkte.

Bildtafel XLII.

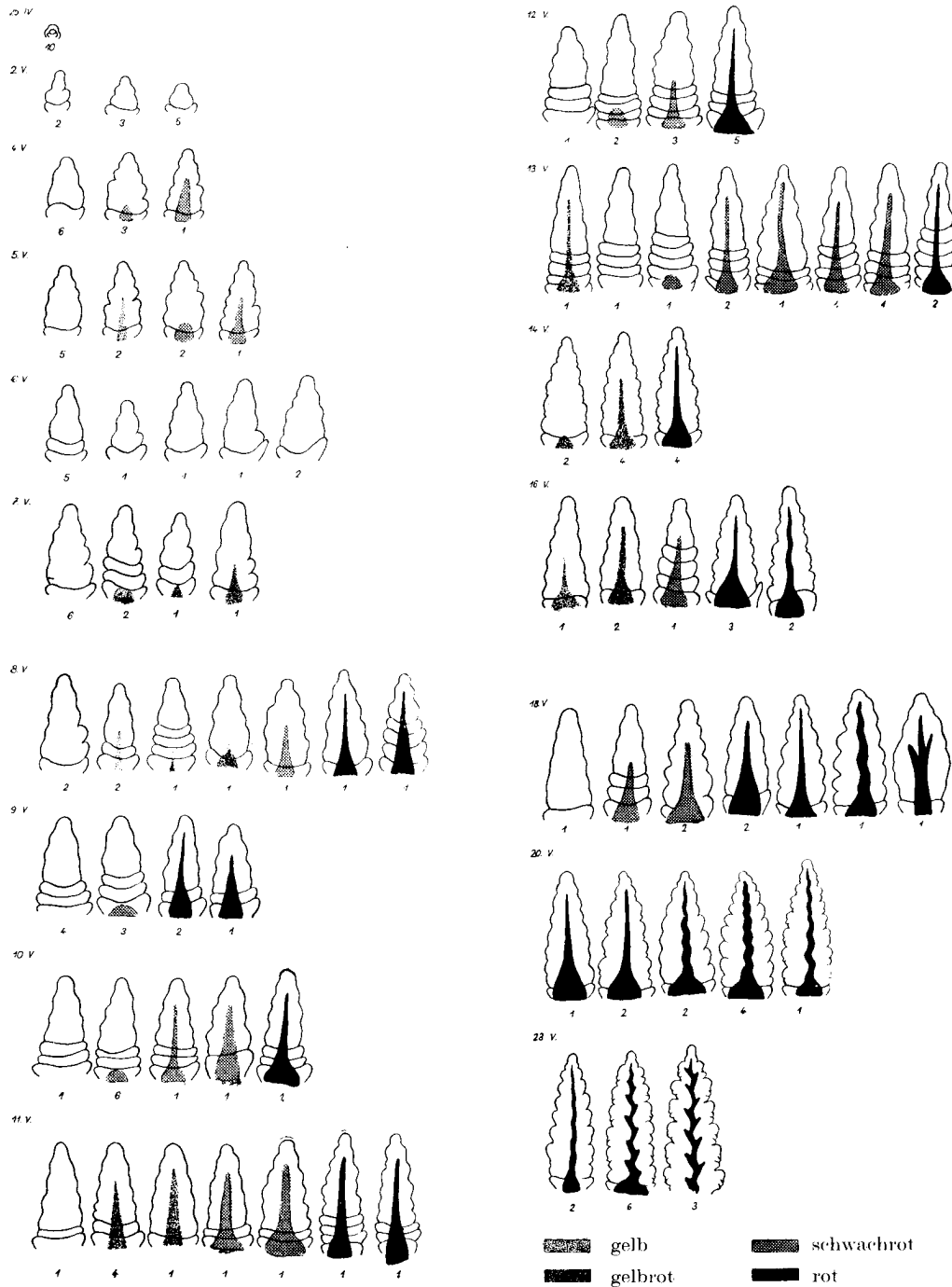


Abb. 7—10. Schema der Entwicklung der Vegetationspunkte und die Chlorophyllstrahlung unter dem Standard-Fluoreszenzmikroskop (Reichert). Das Datum bezeichnet den Tag der Beobachtung, die bei Nummer den Vegetationspunkten die Zahl der gleichen Beobachtungen.

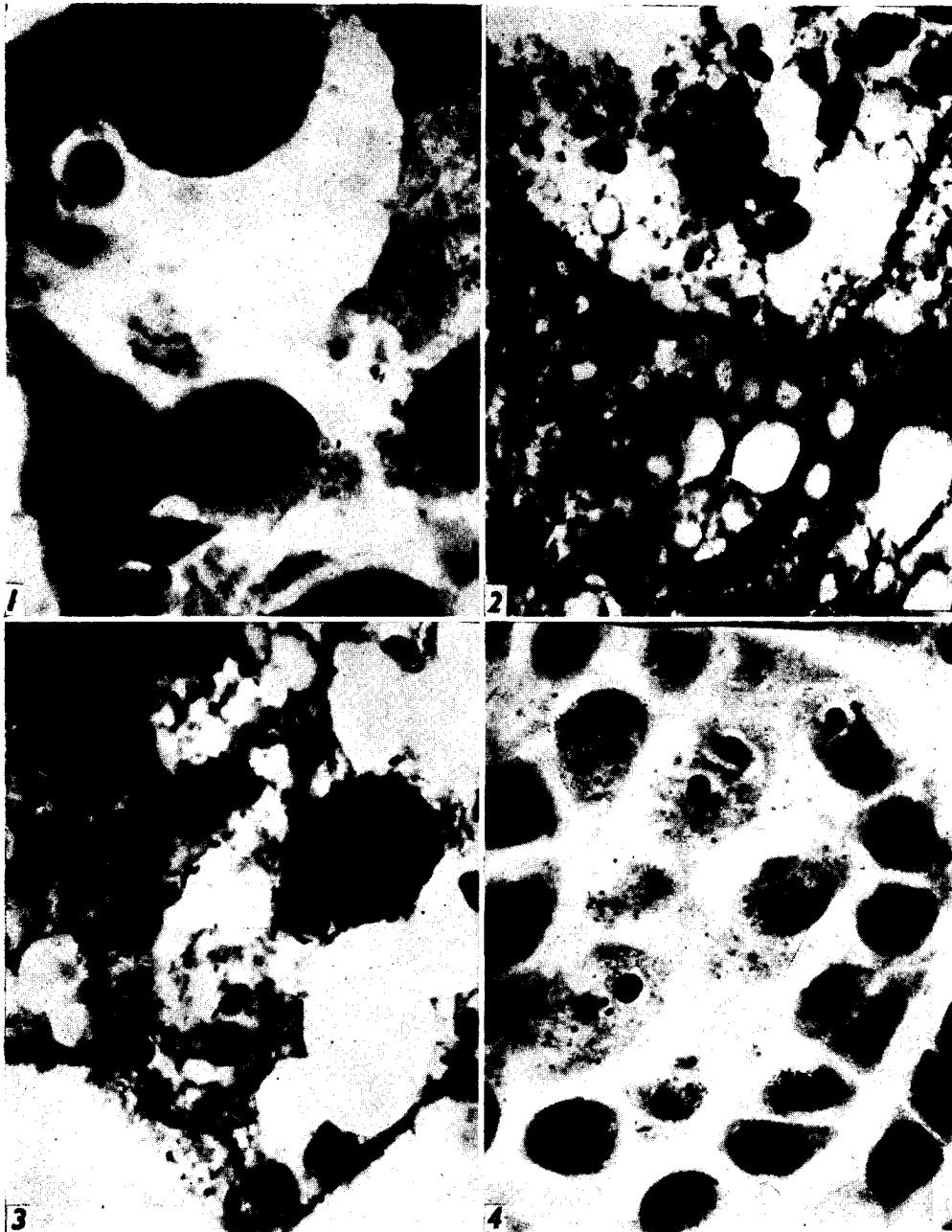


Abb. 1. Junge Zellen des Weizenendosperms (Niva). Kleine, granumähnliche Mitochondrien an der Sichtbarkeitsgrenze, die sich vergrössern. Fixierung nach Zirkle-Erliki, Färbung mit Eisenhämatoxylin nach Regaud.

Abb. 2. Zytoplasma der Zellen aus dem Randgebiet des Endosperms. Vakuolisierung der Mitochondrien. Links Stärkekörner. Fixierung nach Zirkle-Erliki, Färbung mit Eisenhämatoxylin.

Abb. 3. Zelle aus dem Randgebiet des Endosperms. Plastiden und Stärkekörner. Fixierung und Färbung wie bei den vorigen Objekten.

Abb. 4. Vegetationspunkt bei einem Keim 2 Stunden nach der Ankeimung. Im Zytoplasma gekörntes verschiedenartiges ergastisches Material. Fixierung und Färbung wie bei den vorigen Objekten. (2000fache Vergrösserung).

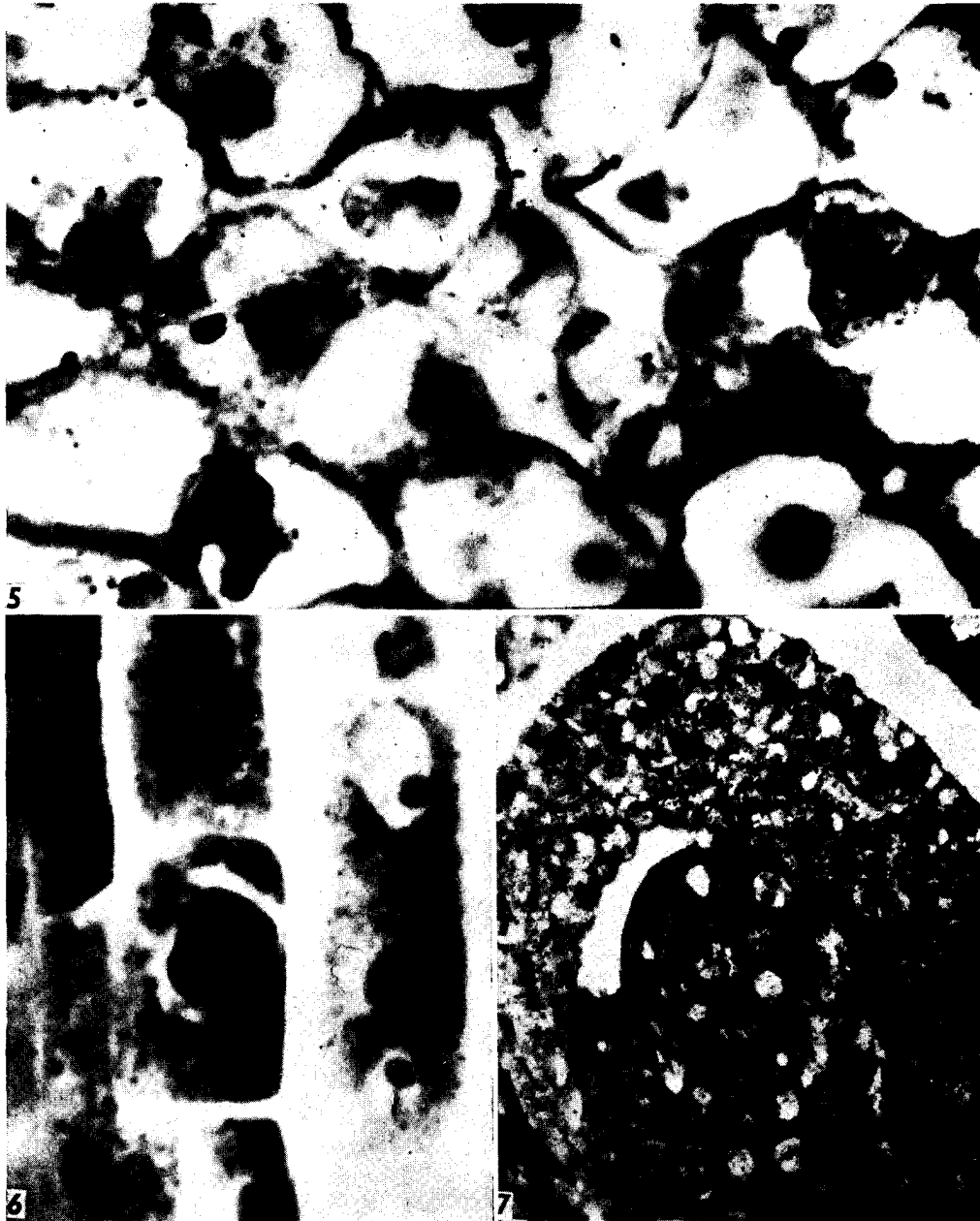


Abb. 5. Keimender Reis (Dunghan Shaly) 4 Stunden nach dem Ankeimungsbeginn. Zellen unterhalb des Vegetationspunktes. Granumähnliche Mitochondrien und Stärkekörner. Fixierung nach Helly, Färbung mit Altmannischem Fuchsin-Tannin-Methylgrün nach Milovidov (2000fache Vergrößerung).

Abb. 6. Zellen der Blattanlagen im Reiskeimling. In der Zelle rechts zwei entwickelte Sphäroplasten. Fixierung nach Helly, Färbung mit Kristallviolett nach Benda (3000fache Vergrößerung).

Abb. 7. Vegetationspunkt eines Weizenkeimlings 48 Stunden nach Ankeimungsbeginn. Fixierung und Färbung nach Ciaecio-Lison (Chromsäure-Kaliumbichromat-Formol-Essigsäure, Sudanschwarz). Der Vegetationspunkt und die Zellen unter diesem färben sich intensiv mit Sudanschwarz (400fache Vergrößerung).

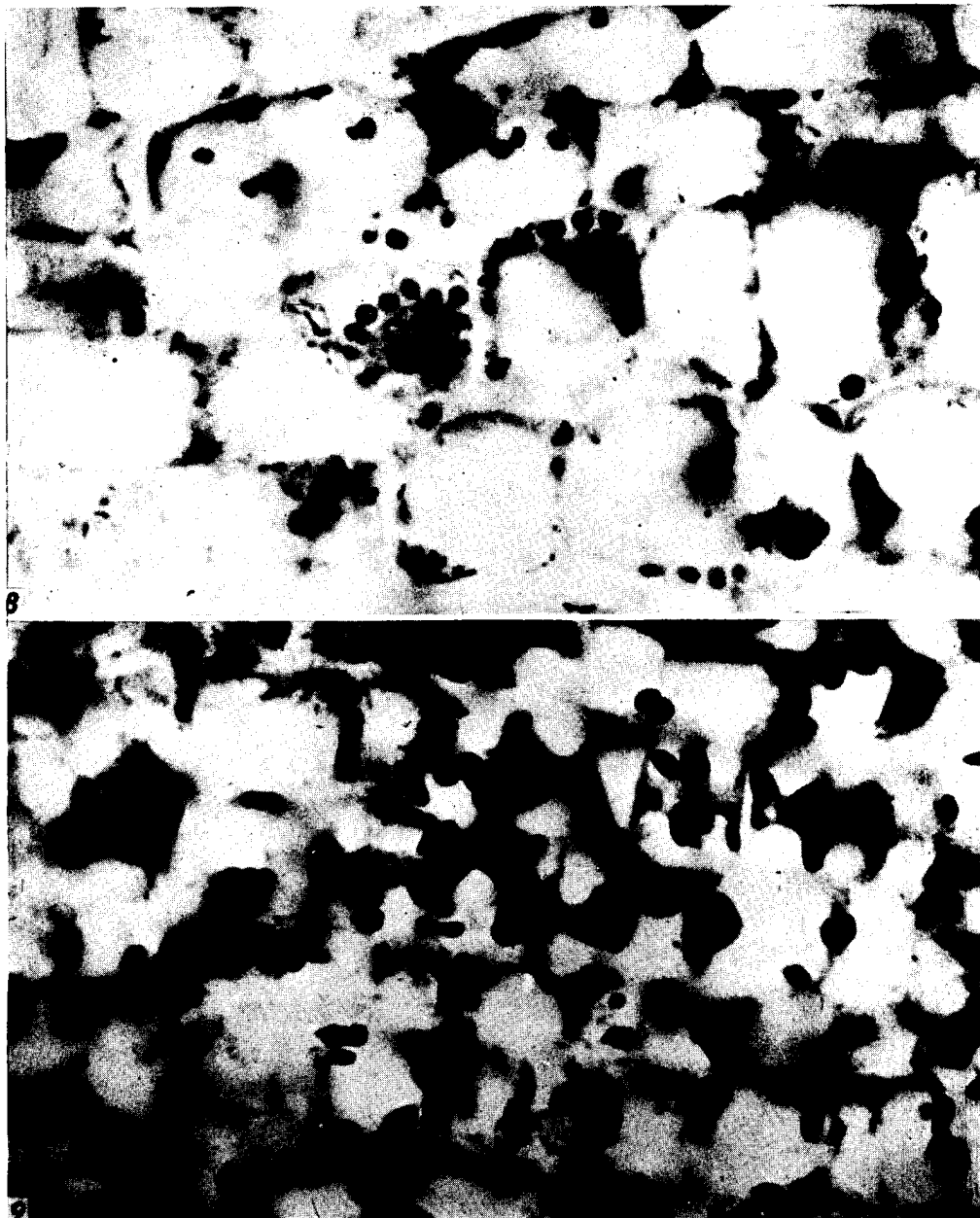


Abb. 8. Zellen der Blattanlagen bei 8 Tage unter Wasser im Dunkeln angekeimtem Reis. Vermehrung der Sphäroplasten, die sich mit Eisenhämatoxylin zu färben beginnen. Stäbchen- und fadenförmige mitochondriale Strukturen. Fixierung nach Helly, Färbung mit Eisenhämatoxylin nach Regaud

Abb. 9. Plastiden der Blattanlagen bei gleichaltrigem, in feuchtem Milieu im Licht gezüchtetem Reis. Ovale, aus mitochondrialen Gebilden entwickelte Plastiden (2000fache Vergrößerung).

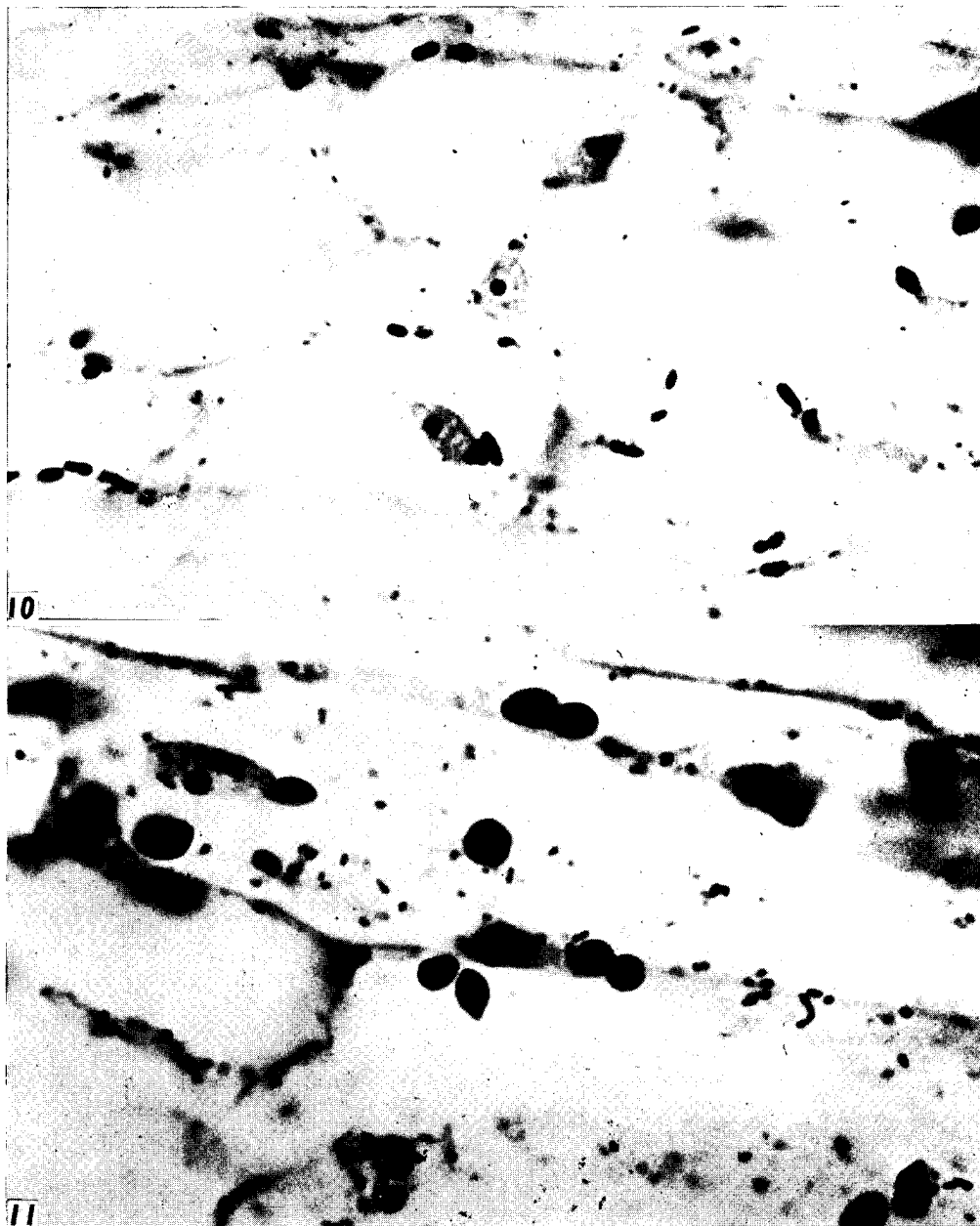


Abb. 10. Entwickelte Plastiden und Mitochondrien bei dem im Dunkeln gezüchteten Reis.  
Abb. 11. Entwickelte Plastiden und Mitochondrien bei den im Licht gezüchteten Pflanzen 7 Tage nach  
der Ankeimung. Fixierung nach Helly, Färbung mit Eisenhämatoxylin  
(2000fache Vergrößerung).

СО Д Е Р Ж А Н И Е

C O N T E N T S

I N H A L T

Beran, K., Burger, M.: Study of Optimal Conditions for the Saccharification of Potato Mashcs by Mould Enzyme Preparations. (Беран, К., Бургер, М.: Изучение оптимальных условий осахаривания картофельных заторов плесневыми энзиматическими препаратами) . . . . .	329
Dostálek, M., Spurný, M.: Cultivation Characteristics of Sulphate-reducing Bacteria. (Досталек, М. и Спурный, М.: Культивационные характеристики десульфурствующих бактерий из нефтяных залежей) . . . . .	338
Borecký, L.: On the Question of Virus Receptors. The Selective Agglutinability of Erythrocytes of the Ground Squirrel ( <i>Citellus citellus</i> ). (Борецкий, Л.: К вопросу вирусных рецепторов. Об элективной склеиваемости эритроцитов суслика <i>Citellus citellus</i> ) . . . . .	344
Vávra, J.: The Action of Streptomycin on the Flagellate <i>Euglena gracilis</i> Klebs. (Вавра, Ю.: Действие стрептомицина на жгутиковую <i>Euglena gracilis</i> Klebs.) . . . . .	351
Blatný, S.: Bemerkungen zur Interferenz der Tabak-Mosaikvirusstämme. (Блатный, Ц.: Замечания по вопросу интерференции штаммов вируса табачной мозаики) . . . . .	356
Sosnová, V.: Anatomisch-zytologische Studie über die Plastiden der Vegetationspunkte. (Соснова, В.: Анатомическо-цитологические исследования пластидов в точках роста) . . . . .	364
Hršel, I.: Untersuchungen mitochondrialer Strukturen bei Reis und Weizen. (Гршель, И.: Исследования митохондриальных образований у риса и пшеницы) . . . . .	371
Milovidov, P.: Die Feststellung der Lebensfähigkeit von Mutterkornpilzkonidien mittels Vitalfärbungsmethode. (Миловидов, П.: Определение жизнеспособности конидий спорыньи по методу прижизненного окрашивания) . . . . .	375
Краткие сообщения . . . . .	380