363

Archiv für Mikrobiologie 49, 275—282 (1964)

Max Planck-Institut für Kulturpflanzenzüchtung, Hamburg-Volksdorf

Besteht ein Zusammenhang zwischen Oxalatausscheidung und Fruchtkörperbildung beim Kulturchampignon Agaricus bisporus (Lge.) Sing.?

Von
GERLIND EGER und I. SÜCKER

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. Juni 1964)

In einer früheren Arbeit (EGER 1961) wurde gezeigt, daß die Fruchtkörperbildung beim Kulturchampignon durch Mikroorganismen in der Deckschicht ausgelöst wird. Es wurde vermutet, daß dies durch direkte Einwirkung dieser Organismen auf einzelne Hyphen geschieht. Ferner wurde angenommen, daß dabei der Stoffwechsel des Mycels in einen andersartigen Stoffwechsel der Fruchtkörper umgestaltet wird. Wenn diese Hypothese zutrifft, müßte sich ein Unterschied im Stoffwechsel von Mycel und Fruchtkörpern feststellen lassen, und zwar bereits in jungen Fruchtkörperanlagen. Genaue Respirationsmessungen sowie chemische Analysen sind möglich. Ein Vergleich der erhaltenen Werte hat jedoch wenig Sinn, wenn Mycel und Fruchtkörper von verschiedenen Substraten stammen. Bis heute ist es noch nicht gelungen, in Flüssigkeitskultur, in der sich die Mycelmenge genau erfassen läßt, Fruchtkörper zu erhalten. Umgekehrt können wir auf festem, organischem Substrat mit unsteriler Deckerde (Bedingungen, unter denen es Fruchtkörper gibt) das Gewicht des Mycels nicht bestimmen. Deshalb bemühen wir uns um einen indirekten Nachweis.

Schon bei DE BARY (1866 und 1884) steht, daß das Mycel von *Agaricus campestris*[1] dicht mit Oxalatkristallen besetzt ist. LE ROUX (1961) fand bei der Untersuchung der organischen Säuren des Kulturchampignons nur in jungen, erbsengroßen Exemplaren etwas Oxalsäure. In größeren Fruchtkörpern war Oxalsäure nicht nachweisbar. Wir prüften daher 1. ob das Fehlen von Oxalatkristallen bedeutet, daß keine oder nur wenig Oxalsäure gebildet wird, und 2. ob diese Kristalle als Markierung für eine bei der Fruchtkörperbildung angenommene Veränderung des Stoffwechsels verwendbar sind.

[1] Ob damit der Wiesenchampignon gemeint ist oder der Kulturchampignon, ist unklar. Über die Namensverwirrung vgl. SINGER (1961).

I. Material

Die Anzucht der Champignonstämme *71a* und *310a* erfolgte in Kisten im Champignonbetrieb (vgl. EGER 1961) oder in Petrischalen (EGER 1961, 1962). Als Substrat diente unsteriler und sterilisierter Champignonkompost, als Deckmaterial „Terragreen" und Einheitserde mit Kreidezusatz.

II. Untersuchungen und Ergebnisse

a) IR-Spektren

Wächst Champignonmycel in calciumhaltigen Nährlösungen, so kann man zwischen den Hyphen zahlreiche Kristalle finden. Neben den für Calciumoxalat-Dihydrat typischen Oktaedern kommen auch Formen vor, deren Identität mit Calciumoxalat zweifelhaft ist. An Champignonhyphen auf festem Substrat konnten bisher nur Kristallnadeln beobachtet werden (vgl. Abb. 2a). Es wurde daher zuerst geprüft, ob diese Nadeln neben Calciumoxalat noch andere Substanzen in wesentlicher Menge enthalten.

Von alten Kulturen in Petrischalen wurde das Mycel von der Oberfläche sauber abgezogen und etwas an der Luft getrocknet. Dann wurden die Kristalle mit einer Nadel auf einen Objektträger abgeklopft. Größere Verunreinigungen wurden weggepustet und mit einem Pinsel abgefegt. Die Kristalle wurden unter dem Mikroskop auf Reinheit geprüft. Es fanden sich zahlreiche winzige Mycelbruchstücke zwischen den Kristallen, doch dürfte ihre Masse nicht mehr als 5% ausgemacht haben.

Ein Teil der Kristalle wurde spektroskopisch und papierchromatographisch auf den Kationengehalt untersucht. Es konnte nur Calcium nachgewiesen werden. Vom Rest der Kristalle wurden je 1—2 mg mit 250 mg Kaliumbromid verrieben, in einer Vacuumpreßform unter 12000 kg/cm² zu Tabletten gepreßt (SCHIEDT u. REINWEIN 1952) und in einem Infrarotspektralphotometer Beckman IR 4 über einen Bereich von 1—16 μ gemessen (Diskussion der Methode: SÜCKER 1963). Das Infrarotspektrum lieferte außer den beiden Banden der OH-Valenz- und der HOH-Deformationsschwingung (Wasser) nahe 3 und 6 μ die beiden typischen Oxalatbanden bei 7,5 und 12,8 μ (Abb. 1a). Die Form der längerwelligen Bande gestattet außerdem eine Unterscheidung der beiden Hydratformen des Calciumoxalats (SÜCKER 1963). Auf Grund der relativ flachen und breiten Absorptionsbande bei 12,8 μ können die Kristalle des Champignonmycels als Calciumoxalat-Dihydrat (Weddellit) identifiziert werden. Auch die Kristalle zwischen den Hyphen in Nährlösung zeigen die für Weddellit typische Oktaederform.

Gegenüber dem Spektrum von analysenreinem Calciumoxalat-Monohydrat (Fa. C. Roth, Karlsruhe) (Abb. 1c) enthalten die Kristalle am Mycel geringe Mengen eines unbekannten Stoffes, der an einer breiten, relativ schwachen Absorption im Bereich zwischen 8,5 und 10,5 μ mit zwei flachen Maxima bei 9,0 und 9,6 μ zu erkennen ist. Es wurde geprüft, ob diese breite Bande von Mycelresten herrühren könnte.

Champignonmycel wurde in einer calciumfreien Nährlösung herangezogen. Das Mycel wurde nach sorgfältigem Auswaschen der anhaftenden Nährlösung mit Aqua dest., Trocknung bei 70° und Behandlung im Achatmörser, als Kaliumbromid-Preßling infrarotspektroskopisch gemessen. Das Spektrum des reinen Mycels (Abb. 1 b) enthält keine Oxalatbanden. Es zeigt eine breite Absorptionsbande zwischen 8,3 und 10,8 μ. Da die Absorptionen des reinen Mycels aber sowohl hinsichtlich der Lage als auch der Intensität etwas von der zu bestimmenden breiten Bande der Kristalle abweichen, kann diese nicht ganz eindeutig Mycelresten zugeordnet werden. Abgesehen von der geringfügigen Verunreinigung bestehen somit die Kristalle am Champignonmycel aus Calciumoxalat-Dihydrat (Weddellit).

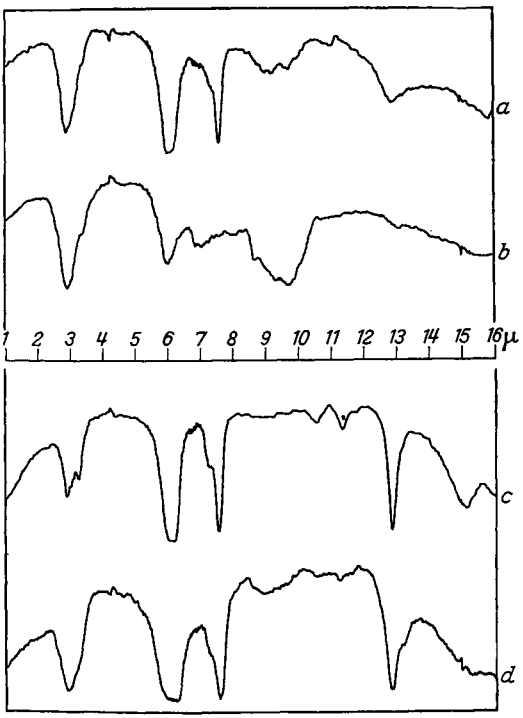

Abb. 1 a—d. Infrarotspektren. *a* Kristalle von Champignonmycel, das auf natürlichem Substrat gewachsen ist; *b* Champignonmycel, das in calciumfreier Nährlösung gewachsen ist; *c* analysenreines Calciumoxalat-Monohydrat (Fa. C. Roth, Karlsruhe); *d* Calcium-Fällung eines Sodaauszuges aus Champignonmycel, das auf natürlichem Substrat gewachsen ist

Als nächster Schritt wurden Mycel und Fruchtkörper verschiedener Entwicklungsstufen sowie Teile reifer Fruchtkörper (Hut- und Stielhaut, Hut- und Stielfleisch, Lamellen) auf Oxalsäure untersucht.

Das Mycel wurde entweder aus „Terragreen" sauber herausgeschwämmt oder von der Deckerde alter Kulturen in Petrischalen abgezogen. Fruchtkörperanlagen bis 2 mm ⌀ konnten nicht präpariert werden. Anlagen ab 3 mm, die schon kompakt sind ("pin heads"), wurden mit der Pinzette von Petrischalen „gepflückt" und die unten haftenden Mycelreste mit einer feinen Schere abgeschnitten. Für einen Teil der Untersuchungen wurden die Anlagen aus der Deckschicht von Kulturkisten genommen. Sie wurden unter Wasser mit einem feinen Borstenpinsel allseitig von Schmutz und Mycelresten „abgeschrubbt" und auf Filterpapier abgetrocknet. Für eine Bestimmung wurden mehrere hundert Anlagen von 3 mm und etwa 100 Anlagen von 5 mm ⌀ verwendet. Bei jungen Fruchtkörpern ab 10 mm wurde der unterste, verschmutzte Stielteil abgeschnitten und nötigenfalls mit Filterpapier

nachgeputzt. Je nach Fruchtkörpergröße genügten 1—10 Stück für eine Bestimmung. Es wurde nur frisches Material präpariert und sofort bei 70° C getrocknet, im warmen Zustand zermörsert und bis zur Weiterverarbeitung im Exsiccator aufbewahrt. Je 1 g des Pulvers wurde mit 10%iger Sodalösung 20 min gekocht und filtriert. Das Filtrat wurde mit 12%iger Essigsäure auf pH 6,0—6,4 gebracht und mit 10%iger Calciumchlorid-Lösung in der Siedehitze versetzt. Ausgefallener Niederschlag wurde nach 24 Std abfiltriert, getrocknet und gewogen. 1,5—2,0 mg der Fällungen wurden spektroskopisch untersucht, wie oben für die Kristalle beschrieben ist.

Das Spektrum der Calcium-Fällungen in den Sodaauszügen (Abb. 1d) ist mit dem Spektrum von reinem Calciumoxalat nahezu identisch. Nur tritt auch hier, wie in den Kristallpräparaten (Abb. 1a), noch eine schwache Absorption zwischen 8,5 und 10,5 μ auf. Die bei den Kristallen von Champignonmycel bereits diskutierte Substanz wurde also durch Soda mitextrahiert und mit Calciumchlorid-Lösung gefällt. Die Spektren der Fällungen von 3 mm großen Fruchtkörperanlagen zeigen ebenfalls deutlich die Oxalatbanden. Die Banden der Extrakte von 5 mm großen Anlagen sind durch Untergrundabsorption abgeflacht. In Fruchtkörpern von 10, 20 und 40 mm Hutdurchmesser oder in Teilen von Fruchtkörpern (Huthaut, Stielhaut, Hutfleisch, Stielfleisch) traten meist keine Niederschläge auf. In gelegentlichen Fällungen war Oxalat nicht zu finden.

Oxalsäure oder ihre Salze sind somit in Mycel und in Fruchtkörperanlagen von 3 mm ⌀ in großen Mengen vorhanden und auch noch in 5 mm großen Anlagen nachweisbar. In allen Fruchtkörpern, die größer als 10 mm waren (bis zu ausgereiften Exemplaren), konnten wir jedoch kein Oxalat finden.

b) Mikroskopische Beobachtungen an Material von Kulturen in Kisten

Parallel zu den Oxalatbestimmungen wurden Mycel, Fruchtkörperanlagen und Fruchtkörper gleicher Qualität und Herkunft mit dem Auflichtmikroskop[1] (Leitz: Ultropak, Objektiv 22; Okular 12,5; Sektorenblende $^1/_6$—$^1/_4$ geöffnet) nach Oxalatkristallen abgesucht. Auch Handschnitte von der Oberfläche von Anlagen und Fruchtkörpern wurden im Durchlichtmikroskop (Objektiv 40, Okular 12,5) betrachtet. Fast alle Hyphen des Mycels waren mehr oder weniger dicht mit Kristallnadeln besetzt (Abb. 2a). Bei Anlagen von 3 mm ⌀ trugen ebenfalls fast alle Hyphen Kristalle, doch gab es eine bemerkenswerte Zonierung: Direkt am Scheitel war der Kristallbesatz nur locker. Hier wurden die gleichen Kristallformen beobachtet wie bei Mycel in Flüssigkeitskultur (siehe oben S. 276). Mit zunehmendem Abstand vom Scheitel waren die Hyphen immer dichter mit Kristallen verkrustet, und auch Hyphen mit

[1] Leihgabe der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Wir danken dafür.

Nadeln traten auf. Sie waren in der unteren Hälfte der Anlagen besonders zahlreich.

Bei 5 mm großen Anlagen waren direkt am Scheitel die Hyphen meistens nackt. Es folgte ein Bereich, in dem die Hyphen mehr oder weniger locker mit verschiedenen Kristallen besetzt waren. Nadeln waren selten. Dichten Kristallbesatz (Krusten oder Nadeln) gab es erst im unteren Teil der Anlagen.

An jungen Fruchtkörpern ab 10 mm konnten die üblichen Kristalle nicht mehr beobachtet werden. Nur winzige runde Körnchen waren in großen Abständen zuweilen sichtbar, wie sie ZELLNER (1907) in den Membranen von Basidiomyceten beschreibt. Ganz unten, an der Basis der Fruchtkörper, gab es einige Hyphen mit Kristallen. Diese Hyphen können wir jedoch bereits zum Mycel rechnen. Sie wurden vor der Oxalatbestimmung abgeschnitten. An ausgewachsenen Fruchtkörpern wurden ebenfalls keine Kristalle gefunden (Abb. 2b).

Die mikroskopischen Beobachtungen zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit den

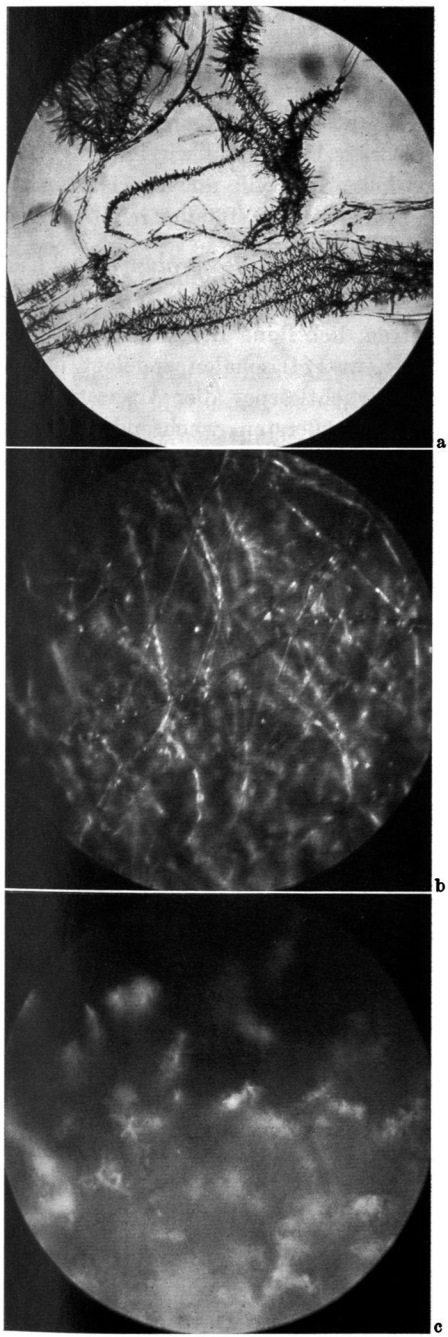

Abb. 2. a Kristalle an Champignonmycel, das auf Kompost gewachsen ist; b nackte Hyphen am Scheitel eines erntereifen Fruchtkörpers; c mit Nadeln besetzte Hyphenspitzen einer Fruchtkörperanlage von weniger als $^1/_2$ mm ⌀. a Durchlicht, Vergrößerung 500 mal; b und c Auflicht, Vergrößerung etwa 400 mal

IR-spektroskopischen Befunden. Oxalsäure konnte nur in demjenigen Material nachgewiesen werden, an dem auch Kristalle beobachtet wurden. Ferner waren Calcium-Fällungen und Oxalatbanden bei 5 mm großen Anlagen wesentlich geringer als bei den 3 mm großen Anlagen, genau wie der Besatz der Hyphen mit Kristallen. Wir können somit die erste Frage, die wir eingangs stellten, positiv beantworten. Dort, wo keine Kristalle an den Hyphen zu finden sind, kann Oxalsäure nur in sehr geringen (für uns nicht nachweisbaren) Mengen vorhanden sein.

c) Beobachtungen an Kulturen in Petrischalen

Das Material, das wir für die bisherigen Untersuchungen verwendet hatten, ließ feine Beobachtungen nicht zu. Deshalb wurden neue Kulturen in Petrischalen angelegt und wachsendes Mycel sowie Anlagen und Fruchtkörper aller Altersstufen betrachtet.

Am äußersten, wachsenden Mycelrand waren auf Kompost wie auf der Deckerde niemals Kristalle zu finden. Im Inneren des Mycels war der Kristallbesatz um so dichter, je älter die Hyphen waren. War das Substrat ganz durchsponnen, so gab es höchstens noch einzelne Lufthyphen ohne Kristalle. Winzige Fruchtkörperanlagen um etwa $^1/_2$ mm ⌀ sahen wie runde Quasten aus. Von einem Zentrum strahlten allseitig freie Hyphenenden aus. Diese waren in der Regel selbst an der Spitze dicht mit Kristallnadeln bedeckt (Abb. 2c). Das sie umgebende Mycel auf der Deckerde trug dann ebenfalls dichten Nadelbesatz. Nur in zwei Fällen waren alle Hyphen dieser Anlagen nackt. In einem wurde vermerkt, daß die Anlage im jungen Mycelteil lag. Auch die dem Substrat anliegenden Hyphen hatten hier noch keine Kristalle. An Anlagen über 1 mm und gesunden, prallen Fruchtkörpern von Kulturen in Petrischalen machten wir dieselben Beobachtungen bezüglich des Kristallbesatzes wie bei dem Material von Kistenkulturen.

In zwei Petrischalen mit alten ausgetrockneten Kulturen gab es jedoch einen abweichenden Befund. Es hatten sich etwa 10 mm große Fruchtkörper gebildet, die wohl aus Wassermangel ihr Wachstum eingestellt hatten und schließlich verschrumpelt waren. Der Hut dieser Fruchtkörper war von einem lockeren Netz nadeltragender Hyphen überzogen, die eindeutig aus dem Plektenchym stammten. In der einen Schale war am Rand der Pilzhüte eine Anzahl Fruchtkörperanlagen hervorgebrochen, von denen zwei einen Durchmesser von 3 mm erreicht hatten. Bei einer war der Scheitel frei von kristalltragenden Hyphen. Im unteren Teil und bei allen anderen Anlagen waren die Hyphen dicht mit Nadeln besetzt.

III. Diskussion der Ergebnisse

Die Versuche und Beobachtungen zeigen, daß bei dem Kulturchampignon auf natürlichem Substrat Oxalatkristalle regelmäßig zu

finden sind: a) an älteren Mycelteilen, b) an allen Hyphen von Fruchtkörperanlagen unter 1 mm, wenn auch das sie umgebende Mycel Kristalle trägt, — c) mindestens in der unteren Hälfte größerer Anlagen bis 5 mm ⌀. Oxalatkristalle fehlen dagegen: a) an jungen, wachsenden Hyphen am Mycelrand und an einzelnen Hyphen des Luftmycels bei alten Kulturen, — b) an ganz jungen Anlagen, die an nackten Hyphen des Mycelrandes liegen, — c) am Scheitel größerer Anlagen, bei wachsenden Fruchtkörpern aller Größen und bei reifen Fruchtkörpern, die ihr Wachstum in normaler Weise abgeschlossen haben. Jedoch kann es auch an Fruchtkörpern zur Kristallbildung kommen, wenn die Entfaltung des Hutes und die Streckung des Stieles für längere Zeit eingestellt ist.

Die Calciumoxalat-Ausscheidung bietet also keinen Anhaltspunkt für einen unterschiedlichen Stoffwechsel bei Mycel und Fruchtkörpern. Hingegen scheint es einen Stoffwechsel des Wachstums zu geben, bei dem keine oder nur wenig Oxalsäure anfällt und einen „Ruhestoffwechsel", der mit hoher Oxalsäure-Produktion verbunden ist.

Über erhöhte Ausscheidung von organischen Säuren, insbesondere Oxalsäure, durch Pilzmycelien in Flüssigkeitskultur als Folge einer Wachstumshemmung ist wiederholt berichtet worden (Cochrane 1958). Dabei könnte die verstärkte Oxalatbildung auch auf Autolysevorgänge zurückzuführen sein (Müller 1960). Wieweit die Verhältnisse an den Lufthyphen zwischen den festen Partikeln des natürlichen Substrates vergleichbar sind mit denen von untergetauchten Hyphen in einer Nährlösung, sei dahingestellt. An einem kräftig ernährten Champignonmycel auf Kompostsubstrat kann die vorübergehende Einstellung des Wachstums der Fruchtkörperanlagen jedenfalls nicht auf den Mangel an organischen Nährsalzen oder Vitaminen zurückgeführt werden, da das Mycel über ausreichende Reserven verfügt, um in mehreren Schüben hintereinander große Fruchtkörper aufschießen und reifen zu lassen. An Autolyse kann schon gar nicht gedacht werden, wenn man sieht, mit welcher Intensität Anlagen nach einer Wachstumsstockung wieder weiterwachsen. Eher wäre an die Wirkung von Wuchsstoffen zu denken, die das Wachstum von Mycel und Fruchtkörpern regulieren und damit auch die Oxalatbildung. Überhaupt wäre es untersuchenswert, wieweit das Oxalat beim Champignon als Exkret anzusehen ist und mit den Oxalatkristallen in den Zellen höherer Pflanzen vergleichbar ist.

Nachdem Sprecher 1962 gezeigt hat, daß ätherische Öle bei dem Pilz *Ceratocystis coerulescens* (im Gegensatz zu ätherischen Ölen bei höheren Pflanzen) dem Stoffwechsel wieder zugeführt werden können, wäre es denkbar, daß auch das Calciumoxalat beim Kulturchampignon notfalls wieder als Kohlenstoffquelle ausgenutzt werden kann. Wenn auch Calciumoxalat als nicht angreifbar für Pilze gilt (Foster 1949),

so hat andererseits TRESCHOW 1944 berichtet, daß das Mycel des Kulturchampignons auf Calciumoxalat als alleiniger Kohlenstoffquelle wuchs. Laut WEHMER (siehe FOSTER 1949) beträgt der Energieinhalt von 1 g-Mol Oxalsäure nur 60 Cal gegenüber 705 Cal bei Glucose. Da das Volumen der von einem Champignonmycel ausgeschiedenen Kristalle ein Vielfaches des Volumens der Hyphen beträgt, muß die Ausscheidung von Calciumoxalat als beträchtliche Energievergeudung angesehen werden.

Zusammenfassung

Champignonmycel und -fruchtkörper von Kompostsubstrat wurden infrarotspektroskopisch auf ihren Gehalt an Oxalsäure und mikroskopisch auf das Vorkommen von Oxalatkristallen untersucht. Mit beiden Methoden wurde in der Regel Oxalat an älteren Mycelteilen sowie bei Fruchtkörperanlagen bis 5 mm ⌀ gefunden. Bei größeren Fruchtkörpern war Oxalsäure nicht nachweisbar.

Die Oxalatausscheidung zeigt keine Beziehung zur Fruchtkörperbildung, sondern zum Wachstum der Hyphen: Oxalatkristalle werden gebildet, wenn das Wachstum stagniert.

Literatur

DE BARY, A.: Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten, Myxomyceten. 1. und 2. Aufl. Leipzig: W. Engelmann, 1866, 1884.

COCHRANE, V. W.: Physiology of Fungi. New York: John Wiley & Sons, London: Chapman & Hall 1958.

EGER, G.: Untersuchungen über die Funktion der Deckschicht bei der Fruchtkörperbildung des Kulturchampignons, *Psalliota bispora* Lge. Arch. Mikrobiol. **39**, 313—334 (1961).

— Der Halbschalentest in Wissenschaft und Praxis. Dtsch. Gartenbauwirtschaft **10**, 15—17 (1962).

FOSTER, J. W.: Chemical Aktivities of Fungi. New York: Academic Press. 1949.

LE ROUX, P.: Quelques données quantitatives sur les acides organiques stables du Champignon de couche (*Agaricus campestris*). Ex. C.R.S. Acad. Sci. **252**, 205—207 (1961).

MÜLLER, H. M.: Über den Einfluß der Temperatur auf die Oxalsäureanhäufung durch *Aspergillus niger* von Tiegh. Arch. Mikrobiol. **36**, 350—359 (1960).

SCHIEDT, U., u. H. REINWEIN: Zur IR-Spektroskopie von Aminosäuren. 1. Mitteilung. Z. Naturforsch. **7b**, 270 (1952).

SPRECHER, E.: Über Ausscheidung und Veränderung einiger sekundärer Stoffwechselprodukte bei höheren Pilzen. Ber. dtsch. bot. Ges. **75**, (19)—(28) (1962).

SÜCKER, I.: Harnsteinanalyse mit Hilfe physikalisch-chemischer Methoden, speziell Infrarotspektroskopie. Ärztl. Lab. **9**, 260—269, 306—314 (1963).

TRESCHOW, C.: Nutrition of the cultivated mushroom. Dansk bot. Ark. **11**, 1—180 (1944).

ZELLNER, J.: Chemie der höheren Pilze. Leipzig: W. Engelmann 1907.

Dr. GERLIND EGER und Dr. IMMANUEL SÜCKER,
Max Planck-Institut für Kulturpflanzenzüchtung, 2 Hamburg-Volksdorf,
Waldredder 4

363

Archiv für Mikrobiologie 49, 275—282 (1964)

Max Planck-Institut für Kulturpflanzenzüchtung, Hamburg-Volksdorf

Besteht ein Zusammenhang zwischen Oxalatausscheidung und Fruchtkörperbildung beim Kulturchampignon Agaricus bisporus (Lge.) Sing.?

Von
GERLIND EGER und I. SÜCKER

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. Juni 1964)

In einer früheren Arbeit (EGER 1961) wurde gezeigt, daß die Fruchtkörperbildung beim Kulturchampignon durch Mikroorganismen in der Deckschicht ausgelöst wird. Es wurde vermutet, daß dies durch direkte Einwirkung dieser Organismen auf einzelne Hyphen geschieht. Ferner wurde angenommen, daß dabei der Stoffwechsel des Mycels in einen andersartigen Stoffwechsel der Fruchtkörper umgestaltet wird. Wenn diese Hypothese zutrifft, müßte sich ein Unterschied im Stoffwechsel von Mycel und Fruchtkörpern feststellen lassen, und zwar bereits in jungen Fruchtkörperanlagen. Genaue Respirationsmessungen sowie chemische Analysen sind möglich. Ein Vergleich der erhaltenen Werte hat jedoch wenig Sinn, wenn Mycel und Fruchtkörper von verschiedenen Substraten stammen. Bis heute ist es noch nicht gelungen, in Flüssigkeitskultur, in der sich die Mycelmenge genau erfassen läßt, Fruchtkörper zu erhalten. Umgekehrt können wir auf festem, organischem Substrat mit unsteriler Deckerde (Bedingungen, unter denen es Fruchtkörper gibt) das Gewicht des Mycels nicht bestimmen. Deshalb bemühen wir uns um einen indirekten Nachweis.

Schon bei DE BARY (1866 und 1884) steht, daß das Mycel von *Agaricus campestris*[1] dicht mit Oxalatkristallen besetzt ist. LE ROUX (1961) fand bei der Untersuchung der organischen Säuren des Kulturchampignons nur in jungen, erbsengroßen Exemplaren etwas Oxalsäure. In größeren Fruchtkörpern war Oxalsäure nicht nachweisbar. Wir prüften daher 1. ob das Fehlen von Oxalatkristallen bedeutet, daß keine oder nur wenig Oxalsäure gebildet wird, und 2. ob diese Kristalle als Markierung für eine bei der Fruchtkörperbildung angenommene Veränderung des Stoffwechsels verwendbar sind.

[1] Ob damit der Wiesenchampignon gemeint ist oder der Kulturchampignon, ist unklar. Über die Namensverwirrung vgl. SINGER (1961).

I. Material

Die Anzucht der Champignonstämme *71a* und *310a* erfolgte in Kisten im Champignonbetrieb (vgl. EGER 1961) oder in Petrischalen (EGER 1961, 1962). Als Substrat diente unsteriler und sterilisierter Champignonkompost, als Deckmaterial „Terragreen" und Einheitserde mit Kreidezusatz.

II. Untersuchungen und Ergebnisse

a) IR-Spektren

Wächst Champignonmycel in calciumhaltigen Nährlösungen, so kann man zwischen den Hyphen zahlreiche Kristalle finden. Neben den für Calciumoxalat-Dihydrat typischen Oktaedern kommen auch Formen vor, deren Identität mit Calciumoxalat zweifelhaft ist. An Champignonhyphen auf festem Substrat konnten bisher nur Kristallnadeln beobachtet werden (vgl. Abb. 2a). Es wurde daher zuerst geprüft, ob diese Nadeln neben Calciumoxalat noch andere Substanzen in wesentlicher Menge enthalten.

Von alten Kulturen in Petrischalen wurde das Mycel von der Oberfläche sauber abgezogen und etwas an der Luft getrocknet. Dann wurden die Kristalle mit einer Nadel auf einen Objektträger abgeklopft. Größere Verunreinigungen wurden weggepustet und mit einem Pinsel abgefegt. Die Kristalle wurden unter dem Mikroskop auf Reinheit geprüft. Es fanden sich zahlreiche winzige Mycelbruchstücke zwischen den Kristallen, doch dürfte ihre Masse nicht mehr als 5% ausgemacht haben.

Ein Teil der Kristalle wurde spektroskopisch und papierchromatographisch auf den Kationengehalt untersucht. Es konnte nur Calcium nachgewiesen werden. Vom Rest der Kristalle wurden je 1—2 mg mit 250 mg Kaliumbromid verrieben, in einer Vacuumpreßform unter 12000 kg/cm² zu Tabletten gepreßt (SCHIEDT u. REINWEIN 1952) und in einem Infrarotspektralphotometer Beckman IR 4 über einen Bereich von 1—16 μ gemessen (Diskussion der Methode: SÜCKER 1963). Das Infrarotspektrum lieferte außer den beiden Banden der OH-Valenz- und der HOH-Deformationsschwingung (Wasser) nahe 3 und 6 μ die beiden typischen Oxalatbanden bei 7,5 und 12,8 μ (Abb. 1a). Die Form der längerwelligen Bande gestattet außerdem eine Unterscheidung der beiden Hydratformen des Calciumoxalats (SÜCKER 1963). Auf Grund der relativ flachen und breiten Absorptionsbande bei 12,8 μ können die Kristalle des Champignonmycels als Calciumoxalat-Dihydrat (Weddellit) identifiziert werden. Auch die Kristalle zwischen den Hyphen in Nährlösung zeigen die für Weddellit typische Oktaederform.

Gegenüber dem Spektrum von analysenreinem Calciumoxalat-Monohydrat (Fa. C. Roth, Karlsruhe) (Abb. 1c) enthalten die Kristalle am Mycel geringe Mengen eines unbekannten Stoffes, der an einer breiten, relativ schwachen Absorption im Bereich zwischen 8,5 und 10,5 μ mit zwei flachen Maxima bei 9,0 und 9,6 μ zu erkennen ist. Es wurde geprüft, ob diese breite Bande von Mycelresten herrühren könnte.

Champignonmycel wurde in einer calciumfreien Nährlösung herangezogen. Das Mycel wurde nach sorgfältigem Auswaschen der anhaftenden Nährlösung mit Aqua dest., Trocknung bei 70° und Behandlung im Achatmörser, als Kaliumbromid-Preßling infrarotspektroskopisch gemessen. Das Spektrum des reinen Mycels (Abb. 1 b) enthält keine Oxalatbanden. Es zeigt eine breite Absorptionsbande zwischen 8,3 und 10,8 μ. Da die Absorptionen des reinen Mycels aber sowohl hinsichtlich der Lage als auch der Intensität etwas von der zu bestimmenden breiten Bande der Kristalle abweichen, kann diese nicht ganz eindeutig Mycelresten zugeordnet werden. Abgesehen von der geringfügigen Verunreinigung bestehen somit die Kristalle am Champignonmycel aus Calciumoxalat-Dihydrat (Weddellit).

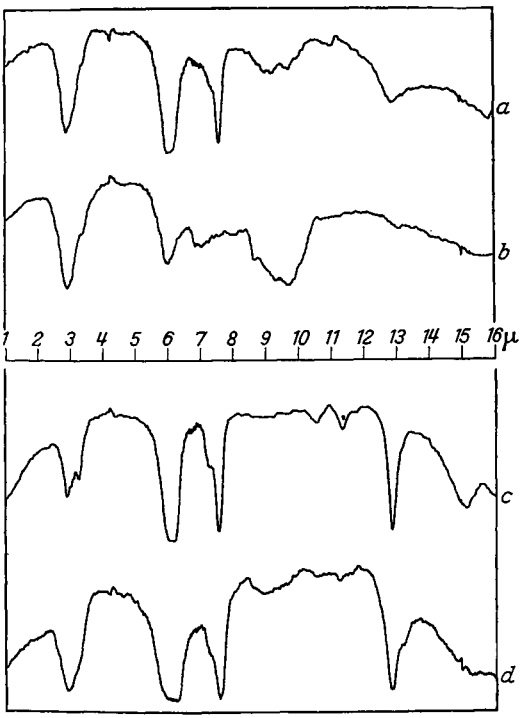

Abb. 1 a—d. Infrarotspektren. *a* Kristalle von Champignonmycel, das auf natürlichem Substrat gewachsen ist; *b* Champignonmycel, das in calciumfreier Nährlösung gewachsen ist; *c* analysenreines Calciumoxalat-Monohydrat (Fa. C. Roth, Karlsruhe); *d* Calcium-Fällung eines Sodaauszuges aus Champignonmycel, das auf natürlichem Substrat gewachsen ist

Als nächster Schritt wurden Mycel und Fruchtkörper verschiedener Entwicklungsstufen sowie Teile reifer Fruchtkörper (Hut- und Stielhaut, Hut- und Stielfleisch, Lamellen) auf Oxalsäure untersucht.

Das Mycel wurde entweder aus „Terragreen" sauber herausgeschwämmt oder von der Deckerde alter Kulturen in Petrischalen abgezogen. Fruchtkörperanlagen bis 2 mm ⌀ konnten nicht präpariert werden. Anlagen ab 3 mm, die schon kompakt sind ("pin heads"), wurden mit der Pinzette von Petrischalen „gepflückt" und die unten haftenden Mycelreste mit einer feinen Schere abgeschnitten. Für einen Teil der Untersuchungen wurden die Anlagen aus der Deckschicht von Kulturkisten genommen. Sie wurden unter Wasser mit einem feinen Borstenpinsel allseitig von Schmutz und Mycelresten „abgeschrubbt" und auf Filterpapier abgetrocknet. Für eine Bestimmung wurden mehrere hundert Anlagen von 3 mm und etwa 100 Anlagen von 5 mm ⌀ verwendet. Bei jungen Fruchtkörpern ab 10 mm wurde der unterste, verschmutzte Stielteil abgeschnitten und nötigenfalls mit Filterpapier

nachgeputzt. Je nach Fruchtkörpergröße genügten 1—10 Stück für eine Bestimmung. Es wurde nur frisches Material präpariert und sofort bei 70° C getrocknet, im warmen Zustand zermörsert und bis zur Weiterverarbeitung im Exsiccator aufbewahrt. Je 1 g des Pulvers wurde mit 10%iger Sodalösung 20 min gekocht und filtriert. Das Filtrat wurde mit 12%iger Essigsäure auf pH 6,0—6,4 gebracht und mit 10%iger Calciumchlorid-Lösung in der Siedehitze versetzt. Ausgefallener Niederschlag wurde nach 24 Std abfiltriert, getrocknet und gewogen. 1,5—2,0 mg der Fällungen wurden spektroskopisch untersucht, wie oben für die Kristalle beschrieben ist.

Das Spektrum der Calcium-Fällungen in den Sodaauszügen (Abb. 1d) ist mit dem Spektrum von reinem Calciumoxalat nahezu identisch. Nur tritt auch hier, wie in den Kristallpräparaten (Abb. 1a), noch eine schwache Absorption zwischen 8,5 und 10,5 μ auf. Die bei den Kristallen von Champignonmycel bereits diskutierte Substanz wurde also durch Soda mitextrahiert und mit Calciumchlorid-Lösung gefällt. Die Spektren der Fällungen von 3 mm großen Fruchtkörperanlagen zeigen ebenfalls deutlich die Oxalatbanden. Die Banden der Extrakte von 5 mm großen Anlagen sind durch Untergrundabsorption abgeflacht. In Fruchtkörpern von 10, 20 und 40 mm Hutdurchmesser oder in Teilen von Fruchtkörpern (Huthaut, Stielhaut, Hutfleisch, Stielfleisch) traten meist keine Niederschläge auf. In gelegentlichen Fällungen war Oxalat nicht zu finden.

Oxalsäure oder ihre Salze sind somit in Mycel und in Fruchtkörperanlagen von 3 mm ⌀ in großen Mengen vorhanden und auch noch in 5 mm großen Anlagen nachweisbar. In allen Fruchtkörpern, die größer als 10 mm waren (bis zu ausgereiften Exemplaren), konnten wir jedoch kein Oxalat finden.

b) Mikroskopische Beobachtungen an Material von Kulturen in Kisten

Parallel zu den Oxalatbestimmungen wurden Mycel, Fruchtkörperanlagen und Fruchtkörper gleicher Qualität und Herkunft mit dem Auflichtmikroskop[1] (Leitz: Ultropak, Objektiv 22; Okular 12,5; Sektorenblende $^1/_6$—$^1/_4$ geöffnet) nach Oxalatkristallen abgesucht. Auch Handschnitte von der Oberfläche von Anlagen und Fruchtkörpern wurden im Durchlichtmikroskop (Objektiv 40, Okular 12,5) betrachtet. Fast alle Hyphen des Mycels waren mehr oder weniger dicht mit Kristallnadeln besetzt (Abb. 2a). Bei Anlagen von 3 mm ⌀ trugen ebenfalls fast alle Hyphen Kristalle, doch gab es eine bemerkenswerte Zonierung: Direkt am Scheitel war der Kristallbesatz nur locker. Hier wurden die gleichen Kristallformen beobachtet wie bei Mycel in Flüssigkeitskultur (siehe oben S. 276). Mit zunehmendem Abstand vom Scheitel waren die Hyphen immer dichter mit Kristallen verkrustet, und auch Hyphen mit

[1] Leihgabe der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Wir danken dafür.

Nadeln traten auf. Sie waren in der unteren Hälfte der Anlagen besonders zahlreich.

Bei 5 mm großen Anlagen waren direkt am Scheitel die Hyphen meistens nackt. Es folgte ein Bereich, in dem die Hyphen mehr oder weniger locker mit verschiedenen Kristallen besetzt waren. Nadeln waren selten. Dichten Kristallbesatz (Krusten oder Nadeln) gab es erst im unteren Teil der Anlagen.

An jungen Fruchtkörpern ab 10 mm konnten die üblichen Kristalle nicht mehr beobachtet werden. Nur winzige runde Körnchen waren in großen Abständen zuweilen sichtbar, wie sie ZELLNER (1907) in den Membranen von Basidiomyceten beschreibt. Ganz unten, an der Basis der Fruchtkörper, gab es einige Hyphen mit Kristallen. Diese Hyphen können wir jedoch bereits zum Mycel rechnen. Sie wurden vor der Oxalatbestimmung abgeschnitten. An ausgewachsenen Fruchtkörpern wurden ebenfalls keine Kristalle gefunden (Abb. 2 b).

Die mikroskopischen Beobachtungen zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit den

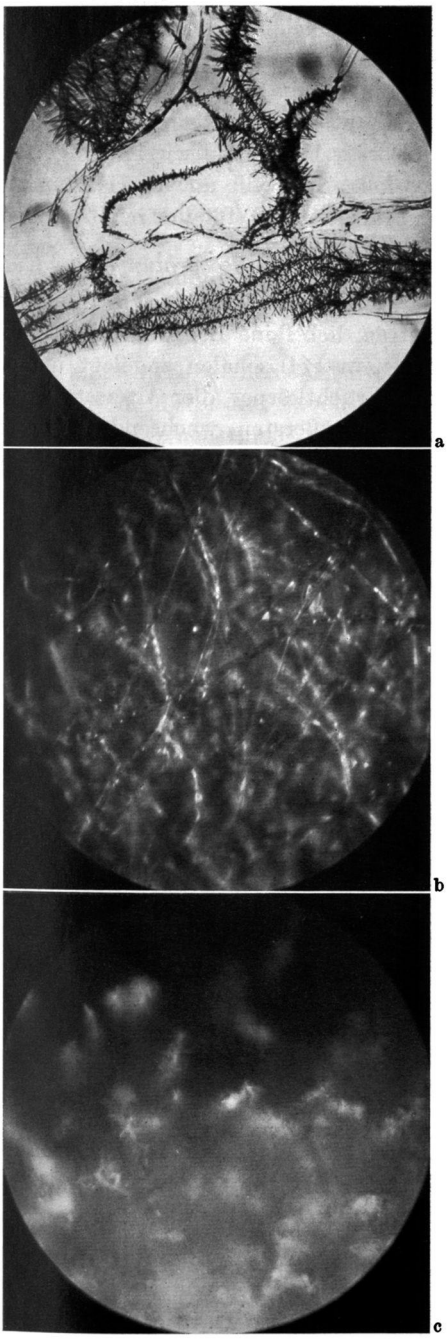

Abb. 2. a Kristalle an Champignonmycel, das auf Kompost gewachsen ist; b nackte Hyphen am Scheitel eines erntereifen Fruchtkörpers; c mit Nadeln besetzte Hyphenspitzen einer Fruchtkörperanlage von weniger als $^1/_2$ mm ⌀. a Durchlicht, Vergrößerung 500 mal; b und c Auflicht, Vergrößerung etwa 400 mal

IR-spektroskopischen Befunden. Oxalsäure konnte nur in demjenigen Material nachgewiesen werden, an dem auch Kristalle beobachtet wurden. Ferner waren Calcium-Fällungen und Oxalatbanden bei 5 mm großen Anlagen wesentlich geringer als bei den 3 mm großen Anlagen, genau wie der Besatz der Hyphen mit Kristallen. Wir können somit die erste Frage, die wir eingangs stellten, positiv beantworten. Dort, wo keine Kristalle an den Hyphen zu finden sind, kann Oxalsäure nur in sehr geringen (für uns nicht nachweisbaren) Mengen vorhanden sein.

c) Beobachtungen an Kulturen in Petrischalen

Das Material, das wir für die bisherigen Untersuchungen verwendet hatten, ließ feine Beobachtungen nicht zu. Deshalb wurden neue Kulturen in Petrischalen angelegt und wachsendes Mycel sowie Anlagen und Fruchtkörper aller Altersstufen betrachtet.

Am äußersten, wachsenden Mycelrand waren auf Kompost wie auf der Deckerde niemals Kristalle zu finden. Im Inneren des Mycels war der Kristallbesatz um so dichter, je älter die Hyphen waren. War das Substrat ganz durchsponnen, so gab es höchstens noch einzelne Lufthyphen ohne Kristalle. Winzige Fruchtkörperanlagen um etwa $^1/_2$ mm ⌀ sahen wie runde Quasten aus. Von einem Zentrum strahlten allseitig freie Hyphenenden aus. Diese waren in der Regel selbst an der Spitze dicht mit Kristallnadeln bedeckt (Abb. 2c). Das sie umgebende Mycel auf der Deckerde trug dann ebenfalls dichten Nadelbesatz. Nur in zwei Fällen waren alle Hyphen dieser Anlagen nackt. In einem wurde vermerkt, daß die Anlage im jungen Mycelteil lag. Auch die dem Substrat anliegenden Hyphen hatten hier noch keine Kristalle. An Anlagen über 1 mm und gesunden, prallen Fruchtkörpern von Kulturen in Petrischalen machten wir dieselben Beobachtungen bezüglich des Kristallbesatzes wie bei dem Material von Kistenkulturen.

In zwei Petrischalen mit alten ausgetrockneten Kulturen gab es jedoch einen abweichenden Befund. Es hatten sich etwa 10 mm große Fruchtkörper gebildet, die wohl aus Wassermangel ihr Wachstum eingestellt hatten und schließlich verschrumpelt waren. Der Hut dieser Fruchtkörper war von einem lockeren Netz nadeltragender Hyphen überzogen, die eindeutig aus dem Plektenchym stammten. In der einen Schale war am Rand der Pilzhüte eine Anzahl Fruchtkörperanlagen hervorgebrochen, von denen zwei einen Durchmesser von 3 mm erreicht hatten. Bei einer war der Scheitel frei von kristalltragenden Hyphen. Im unteren Teil und bei allen anderen Anlagen waren die Hyphen dicht mit Nadeln besetzt.

III. Diskussion der Ergebnisse

Die Versuche und Beobachtungen zeigen, daß bei dem Kulturchampignon auf natürlichem Substrat Oxalatkristalle regelmäßig zu

finden sind: a) an älteren Mycelteilen, b) an allen Hyphen von Fruchtkörperanlagen unter 1 mm, wenn auch das sie umgebende Mycel Kristalle trägt, — c) mindestens in der unteren Hälfte größerer Anlagen bis 5 mm ⌀. Oxalatkristalle fehlen dagegen: a) an jungen, wachsenden Hyphen am Mycelrand und an einzelnen Hyphen des Luftmycels bei alten Kulturen, — b) an ganz jungen Anlagen, die an nackten Hyphen des Mycelrandes liegen, — c) am Scheitel größerer Anlagen, bei wachsenden Fruchtkörpern aller Größen und bei reifen Fruchtkörpern, die ihr Wachstum in normaler Weise abgeschlossen haben. Jedoch kann es auch an Fruchtkörpern zur Kristallbildung kommen, wenn die Entfaltung des Hutes und die Streckung des Stieles für längere Zeit eingestellt ist.

Die Calciumoxalat-Ausscheidung bietet also keinen Anhaltspunkt für einen unterschiedlichen Stoffwechsel bei Mycel und Fruchtkörpern. Hingegen scheint es einen Stoffwechsel des Wachstums zu geben, bei dem keine oder nur wenig Oxalsäure anfällt und einen „Ruhestoffwechsel", der mit hoher Oxalsäure-Produktion verbunden ist.

Über erhöhte Ausscheidung von organischen Säuren, insbesondere Oxalsäure, durch Pilzmycelien in Flüssigkeitskultur als Folge einer Wachstumshemmung ist wiederholt berichtet worden (Cochrane 1958). Dabei könnte die verstärkte Oxalatbildung auch auf Autolysevorgänge zurückzuführen sein (Müller 1960). Wieweit die Verhältnisse an den Lufthyphen zwischen den festen Partikeln des natürlichen Substrates vergleichbar sind mit denen von untergetauchten Hyphen in einer Nährlösung, sei dahingestellt. An einem kräftig ernährten Champignonmycel auf Kompostsubstrat kann die vorübergehende Einstellung des Wachstums der Fruchtkörperanlagen jedenfalls nicht auf den Mangel an organischen Nährsalzen oder Vitaminen zurückgeführt werden, da das Mycel über ausreichende Reserven verfügt, um in mehreren Schüben hintereinander große Fruchtkörper aufschießen und reifen zu lassen. An Autolyse kann schon gar nicht gedacht werden, wenn man sieht, mit welcher Intensität Anlagen nach einer Wachstumsstockung wieder weiterwachsen. Eher wäre an die Wirkung von Wuchsstoffen zu denken, die das Wachstum von Mycel und Fruchtkörpern regulieren und damit auch die Oxalatbildung. Überhaupt wäre es untersuchenswert, wieweit das Oxalat beim Champignon als Exkret anzusehen ist und mit den Oxalatkristallen in den Zellen höherer Pflanzen vergleichbar ist.

Nachdem Sprecher 1962 gezeigt hat, daß ätherische Öle bei dem Pilz *Ceratocystis coerulescens* (im Gegensatz zu ätherischen Ölen bei höheren Pflanzen) dem Stoffwechsel wieder zugeführt werden können, wäre es denkbar, daß auch das Calciumoxalat beim Kulturchampignon notfalls wieder als Kohlenstoffquelle ausgenutzt werden kann. Wenn auch Calciumoxalat als nicht angreifbar für Pilze gilt (Foster 1949),

so hat andererseits TRESCHOW 1944 berichtet, daß das Mycel des Kulturchampignons auf Calciumoxalat als alleiniger Kohlenstoffquelle wuchs. Laut WEHMER (siehe FOSTER 1949) beträgt der Energieinhalt von 1 g-Mol Oxalsäure nur 60 Cal gegenüber 705 Cal bei Glucose. Da das Volumen der von einem Champignonmycel ausgeschiedenen Kristalle ein Vielfaches des Volumens der Hyphen beträgt, muß die Ausscheidung von Calciumoxalat als beträchtliche Energievergeudung angesehen werden.

Zusammenfassung

Champignonmycel und -fruchtkörper von Kompostsubstrat wurden infrarotspektroskopisch auf ihren Gehalt an Oxalsäure und mikroskopisch auf das Vorkommen von Oxalatkristallen untersucht. Mit beiden Methoden wurde in der Regel Oxalat an älteren Mycelteilen sowie bei Fruchtkörperanlagen bis 5 mm ⌀ gefunden. Bei größeren Fruchtkörpern war Oxalsäure nicht nachweisbar.

Die Oxalatausscheidung zeigt keine Beziehung zur Fruchtkörperbildung, sondern zum Wachstum der Hyphen: Oxalatkristalle werden gebildet, wenn das Wachstum stagniert.

Literatur

DE BARY, A.: Morphologie und Physiologie der Pilze, Flechten, Myxomyceten. 1. und 2. Aufl. Leipzig: W. Engelmann, 1866, 1884.

COCHRANE, V. W.: Physiology of Fungi. New York: John Wiley & Sons, London: Chapman & Hall 1958.

EGER, G.: Untersuchungen über die Funktion der Deckschicht bei der Fruchtkörperbildung des Kulturchampignons, *Psalliota bispora* Lge. Arch. Mikrobiol. **39**, 313—334 (1961).

— Der Halbschalentest in Wissenschaft und Praxis. Dtsch. Gartenbauwirtschaft **10**, 15—17 (1962).

FOSTER, J. W.: Chemical Aktivities of Fungi. New York: Academic Press. 1949.

LE ROUX, P.: Quelques données quantitatives sur les acides organiques stables du Champignon de couche (*Agaricus campestris*). Ex. C.R.S. Acad. Sci. **252**, 205—207 (1961).

MÜLLER, H. M.: Über den Einfluß der Temperatur auf die Oxalsäureanhäufung durch *Aspergillus niger* von Tiegh. Arch. Mikrobiol. **36**, 350—359 (1960).

SCHIEDT, U., u. H. REINWEIN: Zur IR-Spektroskopie von Aminosäuren. 1. Mitteilung. Z. Naturforsch. **7b**, 270 (1952).

SPRECHER, E.: Über Ausscheidung und Veränderung einiger sekundärer Stoffwechselprodukte bei höheren Pilzen. Ber. dtsch. bot. Ges. **75**, (19)—(28) (1962).

SÜCKER, I.: Harnsteinanalyse mit Hilfe physikalisch-chemischer Methoden, speziell Infrarotspektroskopie. Ärztl. Lab. **9**, 260—269, 306—314 (1963).

TRESCHOW, C.: Nutrition of the cultivated mushroom. Dansk bot. Ark. **11**, 1—180 (1944).

ZELLNER, J.: Chemie der höheren Pilze. Leipzig: W. Engelmann 1907.

Dr. GERLIND EGER und Dr. IMMANUEL SÜCKER,
Max Planck-Institut für Kulturpflanzenzüchtung, 2 Hamburg-Volksdorf,
Waldredder 4