

Über die Citronensäurebildung von Pilzen der Gattung *Botrytis* Mich.

L. BEHR

(Halle/S.) Deutsche Demokratische Republik)

Im Frühjahr 1963 kam es in der Umgebung von Halle (Saale) in mehreren Beständen vom Lein (*Linum usitatissimum* L.) zu einer Auf-
laufkrankheit (damping-off). Sie wurde durch *Botrytis cinera* Pers. her-
vorgerufen und griff mit bedenklicher Schnelligkeit um sich. Um einige
Einzelheiten der kulturellen Eigenschaften des Erregers zu klären, wur-
den mehrere Isolate verschiedener Herkunft beschafft.

Aus hier nicht näher darzulegenden Gründen wurden die 4 Lein-
Isolate, die morphologisch und physiologisch sowie in ihren pathogenen
Eigenschaften übereinstimmten, u.a. auf einem mit 2% CaCO₃ versetzten
Bierwürzeagar (BWA) kultiviert. Wie schon van Beyma thoe
Kingma (1930) und kürzlich van der Spek (1965) zeigen konn-
ten, scheiden sich bei Benutzung dieses Nährbodens in dem Masse, wie
durch den wachsenden Pilz der kohlensaure Kalk aufgelöst wird, in dem
Agar weisse Konkreme ab (Fig. 1). Anfangs haben sie die Gestalt
winzig kleiner Kugeln, aus denen durch Aufreissen ihres Zentrums und
unter gleichzeitiger Grössenzunahme Ringe oder Kränze (nach van
der Spek 1965: „kransjes“) hervorgehen, die sich ihrerseits aus klei-
nen und grösseren, mehreren bis vielen Einzelkugelchen zusammensetzen
(Fig. 2 und 3). Der Durchmesser der Kränze variiert, je nach ihrem
„Alter“ beträgt er 0,4—0,8 mm, im Maximum, 1,2 mm.

Nachdem schon van Beyma (1930) mit Hilfe des Denigès-
-Reagens nachgewiesen hatte, dass die zuvor in verdünnter HCl
gelösten Konkreme aus citronensaurem Calcium bestehen, konnte
van der Spek (1965) diesen Befund bestätigen. Wie er, so bedienten
auch wir uns der Papierchromatographie (Lösungsmittel Aethylacetat
-Ameisensäure- Wasser = 3/1/1) und identifizierten die entsprechende
Säure als Citronensäure (Fig. 4). Was jedoch mit unseren Befunden und
mit denen von van der Spek nicht im Einklang stand, war die Fest-
stellung van Beymas, dass nur die von krankem Lein isolierte *Botry-*

tis cinerea zur Bildung von Citronensäure befähigt sei. Unabhängig von den Untersuchungen, die v a n d e r S p e k (1965) auch zur Klärung dieser Frage durchführte, konnte an einem umfangreichen, aus 44 teils echten, teils noch nicht bestimmten *Botrytis*-Arten sowie aus weiteren Isolaten dieses Genus bestehenden Material in den eigenen Versuchen

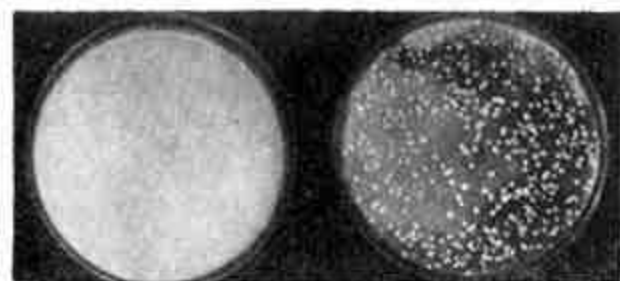


Fig. 1

Fig. 1. *Botrytis spec.* auf Bierwürzeagar + 2% CaCO_3 , Blick auf die Schalenunterseite. Links: CaCO_3 noch nicht aufgelöst, rechts: CaCO_3 z.T. aufgelöst, starke Konkrementbildung; verkl.

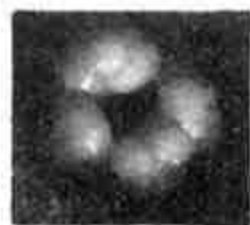


Fig. 2

Fig. 2. Vollaushgebildetes Kalkkonkrement; ca 20 ×

festgestellt werden, dass *B. cinerea* auch dann Citronensäure bildete, wenn sie nicht vom Lein stammte. Sogar *B. tulipae* (Lib.) Lind., *B. globosa* Buchwald und *B. fabae* Sard., drei von *B. cinerea* deutlich unterscheidbare Arten, waren, soweit die bisherigen Versuche diesen Schluss zulassen, zur Ausscheidung von Citronensäure imstande.

Es widerspricht also den Tatsachen, wenn v a n B e y m a 1930 die vom Lein stammende *Botrytis cinerea* als eine besondere „Form“, nämlich als *B. cinerea forma lini*, n.f. bezeichnete. Auch



Fig. 3. Kalkkonkremente, links: Anfangs-, rechts: Endzustand der Entwicklung; ca 15 ×

liess sich, wie den bisherigen Ausführungen entnommen werden kann, nicht nachweisen, dass die Citrat- oder Citronensäurebildung eine für die Art *B. cinerea* charakteristische Eigenschaft sei, die eindeutig zur Bestimmung dieser Species verwendet werden kann. Im Gegenteil, die Fähigkeit Säure zu bilden oder nicht, stellte sich als ein für alle in der eigenen Sammlung geführten *Botrytis*-Pilze, einschliesslich der bisher als *cinerea* Pers. bestimmten Species, nicht-artspezifisches Merkmal heraus.

Der Versuch, die Säure- oder Citratausscheidung als physiologisches Merkmal in den Dienst der Diagnostik zu stellen, hatte zu einem negativen Ergebniss geführt. Doch zog es die Klärung eines weiteren Fragenkomplexes nach sich. Es hatte sich gezeigt, dass in der überwiegenden Zahl der Fälle zwar der dem Nährboden verabreichte kohlen-säure

AeAc-HCOOH-W 21.1.55

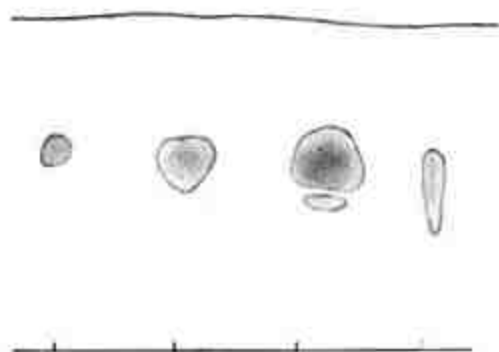


Fig. 4. Chromatographischer Nachweis der Citronensäure („Filtrat II“) gebildet von *Botrytis cinerea* Pers. Kontrolle: Citronensäure „reinst“ (2. Fleck v. links)

Kalk infolge kräftiger Säurebildung gelöst wurde, die Abscheidung von Citrat-Konkrementen jedoch unterblieb. Van der Spek (1965) erklärte dieses Phänomen mit der Produktion zu geringer (unterschwelliger) Mengen von Citronensäure, van Beyma (1930) berief sich dagegen auf eine schon von Smith (1902) gemachte Beobachtung, wonach *B. cinerea* aus den ihr angebotenen Zuckern auch beträchtliche Mengen an Oxalsäure zu bilden vermochte.

Wenn im Stoffwechsel von *B. cinerea* Citronensäure entsteht und diese in Gegenwart von CaCO_3 als Calciumcitrat ausfällt, so muss man erwarten, dass im Falle einer Oxalsäurebildung das entsprechende oxal-saure Salz ausgeschieden wird. Zum Zwecke einer ersten Orientierung diente folgender Modellversuch: In einem mit 2% CaCO_3 versetzten BWA wurden je Schale zwei Bassins (\varnothing 5 mm) ausgestanzt und mit je 5 Tropfen einer 0,9 bzw. 1,4 molaren, wässrigen Citronen- bzw. Oxalsäurelösung gefüllt*. Nach 24 h war der anfangs milchig-weiße Agar im Bereich der beiden Bassins infolge Auflösung des Kalkes klar und durchsichtig geworden („Hofbildung“), nach weiteren 24 h hatten sich in beiden Höfen grosse Mengen citronen- bzw. oxal-sauren Kalkes ausges-

* Die optimale Konzentration beider Säuren war in Vorversuchen ermittelt worden.

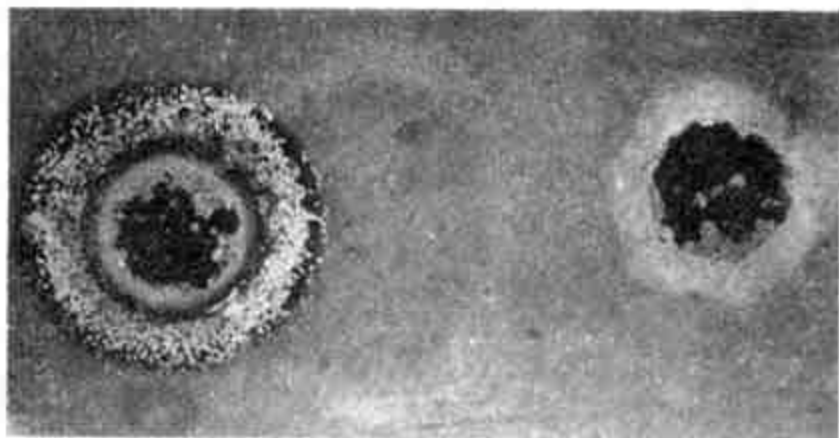


Fig. 5. Bierwürzeagar + 2% CaCO_3 . Links: Ausscheidung von Calciumcitrat, rechts: Ausscheidung von Calciumoxalat, nach Zugabe von Citronen- bzw. Oxalsäure zum Agar; ca 3 X

chieden (Fig. 5). Wie nicht anders zu erwarten, hatte das Citrat die Gestalt der bekannten, grossen Konkreme, das Oxalat hingegen füllte den Hof als eine mit dem Citrat nicht zu verwechselnde dichtkristalline, weisse Masse aus.

Zu dieser Erscheinung war es in keinem der Versuche, die mit den 44 zur Verfügung stehenden *Botrytis*-Isolaten durchgeführt wurden, gekommen. Somit kann von einer in beträchtlichem Ausmass erfolgenden Oxalsäureproduktion durch *Botrytis*, von der Smith (1902) sprach und die van Beyma (1930) für *B. cinerea* postulierte, schlechterdings nicht die Rede sein.

Van der Spek (1965) konnte papierchromatographisch an sechs Isolaten von *B. cinerea* die Ausscheidung von Citronensäure, nicht aber diejenige von Oxalsäure nachweisen. Wie schon bemerkt, veranlasste ihn dieses Ergebnis, das Ausbleiben der Kristallbildung quantitativ, d.h. mit der Produktion unzureichender Mengen an Citronensäure zu erklären. Dieser Meinung mich anzuschliessen war mir nicht möglich. Denn immer wieder hatte es sich gezeigt, dass gerade bei den Nichteitratbildnern der Prozess des Kalkauflösens mit besonders grosser Schnelligkeit und Intensität verlief.

Dieser Erscheinung konnten zwei Ursachen zugrunde liegen: Entweder schieden alle *Botrytis*-Isolate, bei denen keine Citratkristalle im Nährboden sichtbar wurden, die Citronensäure nicht in zu geringer Menge, sondern, im Gegensatz zur Auffassung von van der Spek (1965), in erhöhtem Masse aus. Oder es wurde im Stoffwechsel dieser Pilze die Citronensäure durch eine andere organische Säure ersetzt, die das Ausfallen des Citrates verhinderte. Dann würde das Ausbleiben der

Kristallbildung nicht auf einem quantitativen, sondern auf einem qualitativen Unterschied beruhen.

Die Annahme einer besonders hohen Konzentration der Citronensäure musste von vornherein als abwegig bezeichnet werden. Wahrscheinlich würden unter diesen Voraussetzungen die Citratkristalle

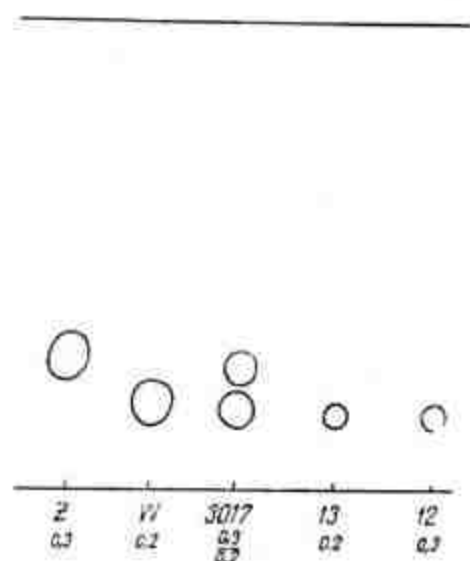


Fig. 6. Chromatographischer Nachweis von Citronen- und Weinsäure, ausgeschieden vom Citratbildner („3017“), und von Weinsäure, ausgeschieden von zwei Nichtcitratbildnern („13“ und „12“). „Z“ = Citronensäure. „W“ = Weinsäure.

erst recht und in grosser Zahl entstehen. Ausserdem ging aus Titrationsversuchen klar hervor, dass die Nichtcitratbildner im Laufe ihres Wachstums beträchtlich weniger Säure ausschieden als solche *Botrytis*-Arten, für die die Konkrementbildung eine charakteristische Eigenschaft ihres Stoffwechsels darstellt.

Zur Beantwortung der Frage, ob im Stoffwechsel aller zur Kristallausscheidung nicht befähigten Pilze die Citronensäure durch eine andere Säure ersetzt wird, wurden 15 Nichtcitrat- und zur Kontrolle ein von Lein stammender Citratbildner („3017 St.“) auf Czapek-Dox-Nährbrühe angezogen und das Kulturfiltrat am 13. Tage mit Hilfe der eindimensionalen Papierchromatographie auf Säuren getestet. Zum Vergleich wurden Oxal-, Glykol-, Äpfel-, Milch-, Citronen- und Weinsäure mit in das Chromatogramm aufgenommen. Da es jedoch, mit Ausnahme der Citronen- und Weinsäure, niemals gelang, eine der übrigen Metaboliten im Kulturfiltrat nachzuweisen, liefen in den späteren Versuchen zur Kontrolle nur noch die beiden zuletzt genannten Säuren mit (R_f -Werte 0,3 bzw. 0,2; Lösungsmittel Butanol-Ameisensäure- $H_2O = 10/2/5$). Dabei stellte sich heraus, dass der Citratbildner

neben Citronen- auch Weinsäure ausscheidet, alle Nichtcitratbildner dagegen nur Weinsäure in das Nährmedium abgeben (Fig. 6).

Damit hat auch diese im Verlauf der Untersuchungen aufgetauchte Frage nach den Ursachen des Ausbleibens der Kalkkonkremente, wie es für viele *Botrytis*-Isolate charakteristisch ist, eine befriedigende wenn auch zunächst nur provisorische Antwort gefunden*. Dass es hier nicht — analog der Citratbildung — in Gegenwart von CaCO_3 und einer so kräftigen Ausscheidung von Weinsäure zur sichtbaren Ausfällung von Calciumtartrat kam, dafür wurden die Löslichkeitsverhältnisse verantwortlich gemacht: Das Calciumtartrat geht in einem Überschuss an Weinsäure leicht wieder in Lösung, Weinsäure wird aber von dem Pilz ständig neu gebildet. Dadurch wird das Ausfallen des Kalksalzes verhindert.

Bei den experimentellen Arbeiten unterstützte mich die techn. Assistentin, Fräulein P.-M. Vieweg. Dafür sei ihr auch an dieser Stelle nochmals gedankt.

ZUSAMMENFASSUNG

Botrytis cinerea Pers. und einige andere Species der Gattung *Botrytis* scheiden in einen mit 2% CaCO_3 versetzten Bierwürzeagar kleine weisse, kranzförmige Konkreme aus. Sie bestehen aus Calciumcitrat und entstehen in dem Masse, wie die durch den wachsenden Pilz gebildete Citronensäure den kohlensauren Kalk auflöst.

Die meisten der im Versuch befindlichen *Botrytis*-Isolate scheiden Säure aus, ohne dass es zur Ausfällung von Kalkkonkrementen kommt. Es wurde nachgewiesen, dass dafür weder ungenügende (unterschwellige) Mengen ausgeschiedener Citronensäure noch Oxalsäure als Stoffwechselprodukt verantwortlich gemacht werden können. Vielmehr ersetzen die Nichtcitratbildner im Stoffwechsel die Citronensäure durch Weinsäure. Da weinsaures Calcium (Calciumtartrat) in überschüssiger Weinsäure löslich ist, kann das Ausfallen des Kalksalzes nicht zustande kommen.

LITERATUR

- Van Beyma thoe Kingma F. H., 1930, Über eine neue Form von *Botrytis cinerea*, parasitisch auf Leinsamen, *Botrytis cinerea* forma *lini*, n.f., Phytopath. Z. 1: 453—456.
Smith R. E., 1902, The parasitism of *Botrytis cinerea*, Bot. Gaz. (Chicago) 33: 421—436.

* Die in diesem Aufsatz mitgeteilten Befunde sind das Ergebnis der Versuche, die im Sommer des Jahres 1966 einen vorläufigen Abschluss fanden und über die anlässlich des 4. Kongresses der Europäischen Mykologen in Warschau berichtet wurde. Die Versuche werden fortgesetzt.

Van der Spek J., 1965, *Botrytis cinerea* als parasiet van vlas. — Versl. landbouwkund. onderz. Centrum landbouwpubl. landbouwdocum, Wageningen 651, p. 18—24: Citraatproduktie in het genus *Botrytis*, in het bijzonder bij *Botrytis cinerea*.

*Tworzenie kwasu cytrynowego przez grzyby
z rodzaju Botrytis Mich.*

Streszczenie

Botrytis cinerea i pewne gatunki rodzaju *Botrytis* na pożywce agarowo-brzeczkowej z dodatkiem 2% CaCO_3 wydzielają małe białe konkretje. Składają się one z cytrynianu wapnia i powstają masowo wskutek wzrastającej ilości wydzielanego przez grzyb kwasu cytrynowego, który rozpuszcza węglan.

Większość wyizolowanych gatunków *Botrytis* wydziela kwasy, przy czym nie dochodzi do wytrącania konkretji wapiennych. Stwierdzono, że przyczyną tego nie jest niedostateczne wydzielanie kwasu cytrynowego lub szczawowego jako produktu przemiany materii. Bardzo często gatunki nie tworzące cytrynianów podczas swojej przemiany materii zastępują kwas cytrynowy przez kwas winny.