

kannter Pilze, vollends mit einer so vereinzelt auftretenden Art wie der von BOKEMÜLLER verwendeten, Eßversuche anstellen will, sollte das nur mit kleinen Mengen und mit großer Vorsicht tun.

Breslau, den 6. Juli 1916.

40. Elfriede Jülg: Ueber das angebliche Vorkommen von Bakterien in den „Wurzelknöllchen“ der Rhinanthaceen.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der k. k. Universität Wien. Nr. 94 der II. Folge.)

(Eingegangen am 14. Juli 1916.)

I. Einleitung und Literatur.

In einer Abhandlung BEIJERINCKS über die Bakterien der Papilionaceen-Knöllchen¹⁾ findet sich eine Fußnote mit folgendem Inhalte vor:

— — „Im August dieses Jahres sandte mein Freund HUGO DE VRIES mir aus Hilversum Wurzeln von *Melampyrum pratense* mit der Bemerkung, er glaube in deren Knöllchen Bakterien zu erkennen. Nachdem ich mich von der Richtigkeit dieser Beobachtung überzeugt hatte, untersuchte ich die Knöllchen von *Rhinanthus major* und fand in den geschlossenen Gewebezellen derselben lebende Bakterien und sehr kleine Bakteroiden. Die anatomische Struktur der Knöllchen ist identisch mit derjenigen der Papilionaceenknöllchen und selbst die „Schleimfäden“ fehlen darin nicht.“ —

Auf Veranlassung meines hochverehrten Lehrers, des Herrn Prof. Dr. HANS MOLISCH, beschäftigte ich mich mit der Frage über dieses angebliche Vorkommen von Bakterien in den Wurzelknöllchen der Rhinanthaceen.

Bei Durchsicht der einschlägigen Literatur ergaben sich mancherlei Widersprüche und Unklarheiten in dieser Frage, die ihre Bedeutung um so mehr hervorheben. —

Neben BEIJERINCK hat sich in eingehender Weise HILTNER mit den Leguminosenbakterien beschäftigt, — auch er hat Rhinantha-

1) BEIJERINCK M. W., „Die Bakterien der Papilionaceen-Knöllchen“ Botanische Zeitung, 1888, 46. Jahrg, S. 730.

ceen gefunden, die „Wurzelknöllchen“ tragen und drückt seine diesbezüglichen Erfahrungen folgendermaßen aus¹⁾:

— — „Schon BEIJERINCK wies darauf hin, daß er Wurzelknöllchen auch bei *Melampyrum pratense* und *Rhinanthus major* beobachtet habe und HILTNER konnte solche bei verschiedenen Scrophulariaceen und Labiaten nachweisen.“

An anderer Stelle²⁾:

— — „Die Tatsache, daß bisher keine Leguminosenart bekannt geworden ist, bei welcher Wurzelknöllchen konstant fehlen, und daß andererseits das Vorkommen von durch Bakterien oder bakterienartige Organismen erzeugten Knöllchen sich außerhalb der zu den Leguminosen gehörigen Familien auf wenige Pflanzen, als *Alnus*-Arten, Elaeagnaceen, *Myrica Gale* und einige Scrophulariaceen usw. beschränkt ist, läßt zunächst die Frage gerechtfertigt erscheinen, welche Eigenschaften diese letzteren, systematisch so weit abweichenden Pflanzen mit den Leguminosen gemeinsam haben.“ — —

Eine dritte Stelle besagt wiederum³⁾:

— — „BEIJERINCK berichtet schon über das Vorkommen von Bakterienknöllchen bei *Melampyrum pratense* und *Rhinanthus major*. Ich habe solche außer bei diesen und bei verwandten Pflanzenarten auch bei einigen Labiaten nachweisen können.“

Die Rhinanthaceen sind von vielen Autoren auf das eingehendste behandelt worden, doch fand ich außer den erwähnten keine Notiz über das regelmäßige Vorkommen von Wurzelknöllchen an den Parasiten. Da durch die kurzen Bemerkungen HILTNERs und BEIJERINCKs die Frage über ihr tatsächliches Vorhandensein nicht geklärt schien, wandte ich mich diesbezüglich mit einer Anfrage an Herrn Prof. Dr. BEIJERINCK in Delft und erhielt, wofür ich bestens danke, in liebenswürdigster Weise die Auskunft, daß die Bakterienknöllchen der Rhinanthaceen von den Haustorien unabhängig sind, von Prof. BEIJERINCK aber nur selten und dies vor vielen Jahren gefunden wurden. Ob er sie als regelmäßige Bildung fand und näher untersuchte, kann ich seinem Schreiben nicht entnehmen. —

Trotz überaus sorgfältiger Untersuchung vieler Rhinanthaceen konnte ich niemals Gebilde finden, die mit den Bakterienknöllchen der Leguminosen identisch waren, so daß es sich bei BEIJERINCKs

1) L. HILTNER, „Die Bindung von freiem Stickstoff durch das Zusammenwirken von Schizomyceten und von Eumyceten mit höheren Pflanzen.“ In LAFARS Handbuch der Technischen Mykologie. Bd. III. S. 60.

2) L. HILTNER, „Über die Ursachen, welche die Größe, Zahl, Stellung und Wirkung der Wurzelknöllchen der Leguminosen bedingen.“ Arbeiten aus der biolog. Abtg. d. Kais. Gesundheitsamtes Berlin 1900. I. Bd., S. 179.

3) L. HILTNER, Über die Ursachen, etc. l. c. S. 179 als Fußnote zu vorerwähntem Zitat.

Entdeckungen wahrscheinlich wohl nur um ganz unaufgeklärte Gebilde handeln konnte. —

Wohl aber finden sich in der Literatur über Rhinanthaceen einige Abhandlungen, in welchen das Vorkommen von Bakterien in den Haustorien in Frage gestellt wird.

So schreibt L. KOCH unter anderem über *Melampyrum*¹⁾:

— — „Zur Zeit des bedeutendsten Wachstums des die Hauptmasse der Kugel ausmachenden Parenchyms führen dessen dünnwandige, polygonale Zellen einen wasserhellen Inhalt. Nach dem Eindringen der Initialen in das Nährobject tritt das Protoplasma mehr und mehr hervor. Man bemerkt dann in ihm gelbe, mit einem Stich ins Grünliche versehene Farbstoffkörper, sowie, was besonders interessant ist, farblose, meist aus gekrümmten Stäbchen bestehende Gebilde, welche den Bakteroiden der Wurzelanschwellungen der Leguminosen zu entsprechen scheinen. Die Stäbchen speichern Anilinfarbstoffe (Gentianaviolett) in sich auf, färben sich mit Jodjodkalium gelblich, zeigen mitunter Bewegung und werden durch Kalilauge nicht zerstört. Man bemerkt sie zuerst in dem wandständigen Plasma, sowie in demjenigen, welches bei zentraler Lage des auffallend großen Zellkernes diesen umgibt. Nach und nach tritt nun das Plasma an Stelle des Zellsaftes. Die Zelle füllt sich mit Bakteroiden, wenn auch lange nicht in dem Maße, als das in den Zellen der Wurzelanschwellungen der Leguminosen der Fall ist. Bei den letzteren dürfte dessen ungeachtet das Gesamtquantum nicht allzu wesentlich dasjenige der Knöllchen unserer Pflanze übersteigen. Es sind eine größere Zahl von Zellen so ziemlich ausschließlich mit Stärke gefüllt, während bei *Melampyrum* hier geformte Stärke gar nicht auftritt.

Die Füllung der Zellen beginnt gewöhnlich in den den trachealen Strang umgebenden, sowie den Initialen anstoßenden Zellen. Sie erstreckt sich, mit Ausnahme der äußersten Lagen, die nie eine derartige Füllung enthalten, auf das gesamte Parenchym der Kugel.

— — Die ungehinderte Weiterentwicklung von *Melampyrum* während einer Trockenheitsperiode erfordert somit auch disponible, in Anbetracht der Assimilationstätigkeit unserer Pflanze, eiweißhaltige Stoffe. Daß derartigen Anforderungen entsprochen werden kann, lehren die Inhaltsbestandteile des Parenchyms des Saugorgans. Schon mit Beginn der stoffaufnehmenden Tätigkeit desselben begann die Aufspeicherung der stäbchenförmigen Gebilde. Das Organ entwickelte sich schon damals als Reservestoffbehälter, es entspricht in dieser Hinsicht den bereits erwähnten Wurzelanschwellungen der Leguminosen, für deren nunmehr richtige Deutung es einen neuen Beleg abgibt.“ —

Auch in seiner Arbeit über *Rhinanthus minor* kommt L. KOCH zu folgendem Schlusse²⁾:

— — „Bezüglich der Zellinhalte intra- wie extramatrikaler Teile sei hervorgehoben, daß geformte Stärke nicht angetroffen wird. Dagegen findet man äußerst kleine körnchen- bis stäbchenförmige Gebilde, die gegen Kali-

1) L. KOCH, „Über die direkte Ausnützung vegetabilischer Reste durch bestimmte chlorophyllhaltige Pflanzen.“ Deutsche bot. Gesellschaft. 1887. Bd. V. S. 357.

2) L. Koch, „Zur Entwicklungsgeschichte der Rhinanthaceen (*Rhinanthus minor*).“ Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik. XX. Bd., 1889, S. 20.

lauge, Alkohol, Chloroform und Terpentinöl widerstandsfähig und unlöslich sind, sich mit Jodkali schwach gelb färben und Anilinfarbstoffe, besonders Gentianaviolett, in sich aufspeichern. Daß wir es hier mit geformten Eiweißkörpern und nicht etwa mit Bakterien zu tun haben, dafür spricht der Umstand, daß die Entstehung und das Verschwinden dieser Gebilde zu einem Zeitpunkte stattfindet, der mit bestimmten Entwicklungsphasen unserer Pflanze oder deren Organe zusammenfällt.

Die Ausscheidung steht augenscheinlich im Zusammenhange mit dem Eindringen der Haustorien in die Nährgewebe. Während zuvor die Zellen wasserhell sind, verlieren sie mit dem Eintritt besonders in das Nährgefäßbündel diese Beschaffenheit. Der Inhalt wird ein dunkler, die Körnchen oder Stäbchen treten mehr oder minder zahlreich hier auf.

Das geschieht weitaus weniger in den trachealen Endzellen des Haustoriums als in deren benachbarten Initialen, ein Verhältnis, das auch bei der spätern Füllung des extramatrikalen Knöllchens mit derartigen Stoffen wiederkehrt. Der tracheale Strang enthält von solchen nur wenig, dagegen vollzieht sich die Füllung, insoweit sie nicht direkt von den Initialen ausgeht, im Anschluß an ihn. Die den Strang umschließenden Zellen zeigen zuerst die geformten Inhalte und von hier schreitet, in dem die Hauptmasse des Knöllchens ausmachenden parenchymatischen Gewebe, die Füllung nach außen vor. Die verkorkte Außenlage, unter Umständen auch noch einige tiefere Schichten sind von der Füllung ausgeschlossen.

Umgekehrt findet ein Schwinden der fraglichen Gebilde etwa mit dem Eintritt der Pflanze in die Blüte, also zu einer Zeit statt, wo Eiweißstoffe zu der Fruktifikation gebraucht werden. Die Zellen intra- und extramatrikalen Teile der Saugorgane, besonders aber die letzteren, werden wieder wasserhell. Nur ausnahmsweise trifft man hier -- und zwar dann in der Nähe des Gefäßbündels der Mutterwurzel des Haustoriums — eine Zellgruppe, deren Zellen blasig angeschwollen und stark angefüllt sind. Die Gruppen ziehen sich nicht selten in Form von Strängen in die Mutterwurzel hinein.“ — —

Die Arbeiten von L. KOCH geben genaue Untersuchungen über den anatomischen Bau der Rhinanthaceen-Haustorien, die Deutung der Inhaltskörperchen ist aber nicht klar. KOCHs angegebene Reaktionen sind noch keineswegs beweisend für die Eiweißnatur der Stäbchen, ebenso wenig läßt sich daraus schließen, daß Bakterien in den Haustorien nicht vorhanden sind.

Besonders eingehend hat sich HEINRICHER mit der Familie der Rhinanthaceen beschäftigt¹⁾, doch fand ich auch in seinen Schriften nirgends eine Angabe, die darauf hindeutet, daß er neben den Haustorien Bakterienknöllchen gesehen hätte.

A. SPERLICH, der auf Veranlassung Prof. HEINRICHERs die Haustorien von Rhinanthaceen unter anderem auf ihre Inhalts-

1) HEINRICHER, „Die grünen Halbschmarotzer I.“ Jahrbücher für wiss. Bot. Bd. XXXI, 1897.

HEINRICHER, „Die grünen Halbschmarotzer II.“ Jahrbücher für wiss. Bot. Bd. XXXII, 1898.

bestandteile untersuchte, schreibt über die von KOCH besprochenen Stäbchen folgendes¹⁾:

— — „Hier soll das Auftreten eines Inhaltsbestandteiles erörtert werden, dessen KOCH zum ersten Male bei Besprechung der Haustorien von *Melampyrum pratense* Erwähnung tut, den er dann auch in den Haustorien von *Rhinanthus* und *Euphrasia* findet: körnchen- und stäbchenförmige Gebilde, die im hyalinen Gewebe, bisweilen auch in den Zellen des Haustorialfortsatzes bald nach Anbohrung eines Nährobjectes erscheinen. KOCH hält diese Gebilde für geformte Eiweißkörper, die im Haustorium gespeichert werden und homologisiert sie mit den Bakteroiden in den Leguminosen-Knöllchen, welche im gleichen Jahre von TSCHIRCH untersucht und auf Grund dieser Untersuchung für von der Leguminose gespeicherte, geformte Eiweißkörper gehalten wurden. Aehnlichkeit in formeller Gestaltung, gleiches Verhalten hinsichtlich der Einwirkung von Anilinfarbstoffen und Jodjodkalium und Resistenz gegen Kalilauge führen KOCH zu dieser Auffassung.

HEINRICHER findet im hyalinen Gewebe der Haustorien von *Lathraea*²⁾ ebenfalls körnchen- und stäbchenförmige Gebilde, welche die von KOCH angegebenen Reaktionen geben, hält diese aber wegen ihrer Resistenz gegen Einwirkung von JAVELLEScher Lauge und wegen ihrer Färbbarkeit mit Fuchsin-Pikrinsäure für aus den Holzsubstanzen des Wirtes entnommene, wahrscheinlich in die Reihe der Kohlehydrate gehörige Stoffe. Da die von KOCH für den in Frage kommenden Inhaltsstoff angegebenen Reaktionen auch für die von HEINRICHER im *Lathraea*-Haustorium beobachteten Körper gelten, finden wir von HEINRICHER die berechtigte Annahme ausgesprochen, „daß in den für *Clandestina* p. 34, für *Squamaria* p. 39 erwähnten, stark lichtbrechenden Tröpfchen oder Kügelchen, . . ., ähnliche, vielleicht sogar die gleichen Inhaltskörper, wie es die Bakteroiden KOCHs sind, vorliegen.“ Meine Untersuchungen ergeben die Tatsache, daß die von HEINRICHER in den Haustorien von *Lathraea* gesehenen, eben erwähnten Inhaltsstoffe auch im *Melampyrum*-Haustorium vorkommen, — darauf komme ich noch später zu sprechen — daß indeß überdies körnchen- und stäbchenförmige Gebilde im hyalinen Gewebe auftreten, die mit HEINRICHERs Inhaltsstoffen nicht identifiziert werden können. Auf Behandlung mit JAVELLEScher Lauge bleibt im hyalinen Gewebe sowohl eine mit Fuchsin-Pikrinsäure färbbare Masse, als auch ein Krümmelwerk zurück, dem jede Färbbarkeit mit Fuchsin-Pikrinsäure abgeht, daß also keineswegs den gerade durch diese Reagentien intensiv gefärbten Inhaltsresten HEINRICHERs gleich gestellt werden kann. Was ist nun letzterer Inhaltsstoff, der uns nach Behandlung mit JAVELLEScher Lauge als ein im Zentrum der Zelle konzentrierter Krümmelhaufen entgentritt? — —“

SPERLICH untersucht nun gleichzeitig Haustorien und Leguminosen-Knöllchen, indem er die von KOCH angegebenen Reaktionen mit beiden Geweben ausführt. Ebenso prüft er die Resistenz der Knöllchenbakterien und des Haustorialinhaltes inbezug auf Säuren

1) A. SPERLICH, „Beiträge zur Kenntnis der Inhaltsstoffe in den Saugorganen der grünen Rhinanthaceae.“ Bot. Zentralblatt. Beihefte. Bd. XI, Heft 7, 1902, (Separatum S. 20).

2) HEINRICHER, „Anatomischer Bau und Leistung der Saugorgane der Schuppenwurzarten“. Breslau (KERNs Verlag) 1895. S. 34 u. S. 39.

und Alkalien und stellt einen Verdauungsversuch mit Pepsin-Salzsäure an. Er kommt zu dem Ergebnis¹⁾, daß die körnchen- und stäbchenförmigen Körper im Haustorium wahrscheinlich den Bakteroiden in stofflicher Beziehung ähnlich sind und hält beide für stickstoffhaltige Verbindungen, die aus Eiweißstoffen bestehen oder solche enthalten. Ihr Entstehen und Verschwinden hängt von den Entwicklungsstadien der Pflanze ab. Auf Grund einer vergleichenden Darstellung der bisherigen Ergebnisse der Bakterienforschung bei Leguminosen versucht SPERLICH, die merkwürdigen Inhaltskörperchen der Haustorien wie folgt zu erklären:

— — „Wofür sind nun die ähnlichen Gebilde im Haustorium zu halten? — Sind sie von der Pflanze gebildete Speicherformen von Eiweißstoffen, wofür sie KOCH übereinstimmend mit TSCHIRCH's Auffassung der Bakteroiden im Leguminosen-Knöllchen hält, entstehen sie als Reaktion der Pflanze auf die Einwanderung eines Mikroorganismus, oder sind sie Entwicklungsformen eines ähnlichen Mikroorganismus wie der in den Leguminosen-Knöllchen wohnende? Den Infektionsfäden in den Knöllchen vergleichbare Bildungen kommen im Haustorium nie vor, auch wurden andere Entwicklungsstadien dieser Körper weder von KOCH noch von mir gesehen. Ich glaube, diese Frage kann ebenso, wie dies bei der Frage über die Natur der Knöllchenbakteroiden nunmehr geschehen ist, nur durch Kulturversuche gelöst werden. Sollte es in einwandfreier Weise gelingen, in Nährsubstraten aus den im Haustorium auftretenden körnchen- und stäbchenförmigen Gebilden Sporen und Schwärmer zu ziehen, aus diesen weitere Entwicklungsformen, die sich schließlich neuerdings zu Bakteroiden ausgestalten, dann hätten wir allerdings eine höchst merkwürdige Symbiose vor uns.

Es genügt, hier durch erweiterte Reaktionen gezeigt zu haben, daß die fraglichen Gebilde im Haustorium den Bakteroiden der Leguminosen-Knöllchen stofflich sehr ähnlich sind und mit den von HEINRICHER bei *Lathraea* beobachteten und für ein Kohlehydrat gehaltenen Stoffen nicht identifiziert werden können.

Vergleichen wir endlich noch die Mengen dieser Gebilde im Knöllchen und im Haustorium, so können wir sagen, daß die Masse im Haustorium selbst zur Zeit der größten Fülle eine weit kleinere ist als in den damit geradezu vollgepfropften Knöllchen.“ —

Aus vorstehenden Zitaten aus der Rhinanthaceen-Literatur ist zu entnehmen, daß man sich über die Inhaltsbestandteile der Haustorien verschiedene Urteile gebildet hat, nämlich:

- 1) Die Inhaltskörperchen entsprechen den Bakteroiden der Leguminosen-Knöllchen, die als geformte Eiweißstoffe aufzufassen sind. (KOCH.)
- 2) Die Inhaltskörperchen sind Stoffe, die aus den Holzsubstanzen des Wirtes entnommen sind und in die Reihe der Kohlehydrate gehören. (HEINRICHER.)

1) A. SPERLICH, l. c. S. 23.

- 3) Die Inthaltskörperchen stehen in stofflicher Beziehung den Bakteroiden sehr nahe. (SPERLICH.)

Die verschiedenen Widersprüche in den Abhandlungen über Rhinanthaceen sowie die Unklarheit bezüglich der Frage, ob die im hyalinen Gewebe des Haustoriums vorkommenden Inthaltskörper Bakterien sind oder nicht, gaben mir den Weg an, der eingeschlagen werden mußte, um hier eine Entscheidung zu treffen. —

II. Eigene Untersuchungen.

Es handelte sich nach der vorhergehenden Darlegung darum, genaue mikroskopische Untersuchungen und einwandfreie chemische Reaktionen durchzuführen, die über die stoffliche Natur des fraglichen Inthaltskörpers Aufklärung zu geben geeignet sind. Die von KOCH und SPERLICH angegebenen Parallelreaktionen mit Knöllchen und Haustorien wurden von mir in eingehender Weise ausgeführt, überprüft und erweitert.

Um aber die Frage endgültig zu entscheiden, war es notwendig, die Inthaltskörperchen durch Kulturversuche auf ihre bakterielle Natur zu prüfen, was auch SPERLICH als das entscheidende Moment betrachtet. Solche Versuche, über deren Resultat ich später zu berichten haben werde, wurden von mir in ausgedehntem Maße durchgeführt.

A. Mikroskopischer Befund.

Material: Meinen Untersuchungen dienten Rhinanthaceen, die ich teils aus der näheren Umgebung Wiens, teils aus Lunz und Steiermark bezog, so daß auch Pflanzen verschiedenster Standorte in Betracht gezogen wurden. Am eingehendsten wurden alle Versuche mit *Melampyrum pratense* angestellt, doch wurden die sich hierbei ergebenden Tatsachen auch bei *Melampyrum silvaticum*, *Alectorolophus major* und *minor* überprüft.

Präparationsmethode: Als Präparationsmethode verwendete ich die von HEINRICHER und SPERLICH angegebene: Die Pflanzen wurden ausgestochen und mittels eines nicht allzu kräftigen Wasserstrahles vom Erdreich befreit. Auf diese Weise gelang es fast durchwegs, die Haustorien samt ihrer Nährwurzel unverletzt zu erhalten. Nachdem diese zarten Gebilde im Zusammenhange mit der Mutterpflanze blieben, wäre es umso befremdlicher, zu vermuten, daß distinkte Bakterienknöllchen, wie sie BEIJERINCK beschreibt, durch das Auswaschen abgerissen worden sind. So komme ich auch dadurch wieder zu dem Schlusse, daß solche entweder gar nicht vorhanden oder nur als Zufallsbildungen aufzufassen sind. —

Füllungsverhältnisse: Ich begann mit der Untersuchung von Keimlingen, die anfangs Februar im Buchenbestand des Wiener Waldes gesammelt wurden. Die Kotyledonen waren noch von der Samenschale umgeben, jedoch schon leicht ergrünt. Die Hauptwurzel war ziemlich lang und entsandte mehrere Verzweigungen in den von alten Blättern durchsetzten Waldhumus. Auf den Seitenwurzeln waren bereits kleine Haustorien ausgebildet. Sie zeigten den normalen Bau: Haustorialknopf und -fortsatz; doch zog sich von der *Melampyrum*-Mutterwurzel kein Gefäßbündel zur Nährwurzel. Das hyaline Gewebe zeigte wasserhelle Zellen mit großen Kernen, denen jeglicher Inhalt fehlte.

Das nächstfolgende Stadium, das zur Untersuchung gelangte, waren Pflänzchen von *Melampyrum pratense*, anfangs März gesammelt, deren Kotyledonen bereits frei waren. Da das Wurzelwerk schon viel kräftiger entwickelt war, konnte ich neben ganz kleinen, kaum angelegten bereits große, stark ausgebildete Haustorien zur Untersuchung heranziehen. Hierbei konnte ich die interessante Tatsache feststellen, daß bei *Melampyrum pratense* die Füllung des Haustorialgewebes dann zum ersten Mal eintritt, wenn das Gefäßbündel, das von der Mutterwurzel zum Haustorialfortsatz führt, zur Ausbildung gelangt. Auch SPERLICH¹⁾ spricht von Haustorien, welchen das sonst normal ausgebildete Gefäßbündel fehlte und setzt diesen Mangel in Beziehung zur Natur des Nährobjektes, da er ihn hauptsächlich bei Haustorien entdeckte, die an trockenen oder abgestorbenen Objekten saßen, so daß seiner Ansicht nach die Bildung des Leitungsgewebes von der regeren Wasserdurchströmung abhängt.

Haustorien dieser Keimlinge, deren Leitbündel normal entwickelt war, lassen vorerst in seiner nächsten Umgebung und dann nach außen hin fortschreitend eine starke Vakuolisierung des Plasmas erkennen, sodann treten die Inhaltskörper auf. Die Füllung ist erst nur schwach, so daß der Zellinhalt körnig erscheint, nimmt aber bei großen Haustorien schon in diesem Stadium der Entwicklung zu. Am deutlichsten läßt sich die Form der fraglichen Körperchen erkennen, wenn man einen dünnen Schnitt durch ein Haustorium zerreißt und leicht auf das Deckglas drückt, so daß die Körnchen herausgequetscht werden. Die im Wasser schwimmenden Körperchen sind zum Teil Körnchen, zum Teil ganz kurze, elliptische Stäbchen, die oft beistrichartig gekrümmt sind. Sie sehen im Einzelnen wohl Bakterien täuschend ähnlich,

1) A. SPERLICH, l. c. S. 14.

doch bieten sie in ihrer Gesamtheit nicht im entferntesten das Bild, wie es etwa ein auf gleiche Weise angefertigtes Quetschpräparat von *Trifolium*- oder *Vicia*-Knöllchen zeigt. Abgesehen davon, daß die Leguminosenbakterien weit größer, daher leichter zu beobachten sind als die fraglichen Körperchen, so fehlt ihnen vor allem der einheitliche Charakter, der einer Bakterienansammlung eigen ist. Auch konnte ich niemals irgendeine Eigenbewegung unter diesen Körnchen und Stäbchen wahrnehmen.

In allen späteren Entwicklungsstufen findet man bei *Melampyrum pratense* Haustorien aller Größen; auch bei Exemplaren, die der Blüte entgegengehen, gibt es Saugorgane, die kein Gefäßbündel und keine Füllung des hyalinen Gewebes aufweisen, neben solchen, deren Zellen mit Körnchen angefüllt sind. Zur Zeit der Fruchtbildung verringert sich der Inhalt und verschwindet zum Teil ganz, wie dies auch KOCH angibt. —

B. Chemische Reaktionen und Färbungen.

Um die Natur der Körnchen festzustellen, wurden von KOCH und SPERLICH verschiedene Reaktionen ausgeführt, die ich überprüft habe. Zu diesem Zwecke verwendete auch ich Schnitte von Haustorien und Knöllchen, doch unterließ ich den allzu häufigen Gebrauch JAVELLEScher Lauge, wie ihn SPERLICH angibt, um den zerstörenden Einfluß derselben fernzuhalten.

1. Prüfung auf Eiweiß.

Mit MILLONschem Reagens zeigen Schnitte durch gefüllte Haustorien von *Melampyrum pratense* und *Alectorolophus* überaus stark die charakteristische ziegelrote Farbe und zwar speziell das hyaline Gewebe. Haustorien ohne Füllung zeigen auch nach längerer Einwirkung keine Färbung. Da aber auch Leguminosenschnitte durch das Reagens in gleicher Weise gefärbt werden, ist damit noch keine Entscheidung erbracht, ob die Körnchen Eiweißstoffe als solche oder Bakterien sind.

Auch die RASPAILsche Reaktion (konzentrierte Zuckerlösung und H_2SO_4) gelingt in ausgezeichneter Weise bei Schnitten, deren Zellen die Füllung zeigen, während auch hier ungefüllte Haustorien nicht reagieren. Desgleichen gelang die Xanthoproteinreaktion.

Diese Reaktionen weisen deutlich darauf hin, daß die geformten Körperchen eiweißartiger Natur sind, ob wir es hier jedoch mit Bakterien zu tun haben, ist dadurch keineswegs klargestellt.

2. Färbungen mit Anilinfarben.

Werden Schnitte durch Haustorien von *Melampyrum* oder *Alectorolophus* in wässrige oder alkoholische Gentiनावiolettlösung gelegt und nach kurzer Einwirkung des Farbstoffes ausgewaschen, so zeigt sich das hyaline Gewebe deutlich tingiert, doch ist der Zellinhalt stark plasmolysiert und verquollen, die einzelnen Körnchen sind nicht mehr deutlich zu sehen, was bei Knöllchen-Schnitten keineswegs der Fall ist. Hier gelingt die Färbung in unvergleichlich besserer Weise.

Ebenso steht es mit der Färbung mit Methylenblau.

3. Reaktion mit Jodjodkali.

Die Leguminosenbakterien reagieren auf Jodjodkali durch deutliche Gelbfärbung, während die *Melampyrum*-Körperchen nicht deutlich tingiert sind.

4. Smith's Reaktion mit Goldchlorid.

In seinem Werke über: „Crown Galls“¹⁾ beschreibt SMITH eine Methode, um Bakterien im Gewebe besser sichtbar zu machen. Er legt die Schnitte in eine Goldchloridlösung und läßt das Reagens 24^h einwirken. Die Bakterien färben sich dunkel und sind deutlich zu sehen. Ich wiederholte den Versuch mit Leguminosenknöllchen und mit Schnitten durch ein *Melampyrum*-Haustorium. Wenn auch die Reaktion bei *Bacterium radicum* weitaus nicht so scharf hervortrat, wie SMITH es angibt, (die Schuld daran mag am Reagens gelegen sein,) so zeigten die Körnchen des Saugorgans doch viel weniger eine Beeinflussung, außer daß sie sich vom nunmehr gelblichen Plasma etwas stärker abhoben.

5. Smith's Reaktion mit Silbernitrat.

Auch bei dieser Reaktion, die SMITH²⁾ beim Nachweis von Bakterien in Kronengallen verwertete, ergaben sich Unterschiede in der Tinktion bei Leguminosenknöllchen und Rhinanthaceen-Haustorien. Während dort nach zirka sechsständiger Einwirkung die mit Bakterien gefüllten Zellen tiefbraun waren und auch die Bakterien selbst sich gebräunt hatten, waren hier die Körnchen in der gelblichen, verquollenen Plasmamasse nicht mehr deutlich zu sehen.

1) SMITH E. F., „The structure and development [of crown Gall“
Washington 1912. S. 17.

2) SMITH E. F., l. c. S. 17.

6. Zusätze von verschiedenen **anorganischen Säuren, Laugen und Eisessig** wirkten auf die Körnchen nicht weiter ein, wie dies schon SPERLICH konstatierte. —

Durch die Reihe der angeführten Reaktionen und Färbungen ist noch nicht festgestellt, ob wir es im *Melampyrum*-Haustorium mit Bakterien zu tun haben oder nicht. Das Gelingen der Eiweißreaktionen und eine gewisse Färbbarkeit mit Anilinfarben sind noch kein Beweis für die Bakteriennatur der fraglichen Körperchen. Das entscheidende Moment in dieser Frage liegt, wie auch SPERLICH betont, in Kulturversuchen auf Nährböden. Darin gipfelte die Hauptaufgabe meiner Untersuchung.

C. Kulturversuche.

In Rücksicht auf die Ähnlichkeit der Verhältnisse inbezug auf Füllung und Aussehen der Haustorien mit den Leguminosen-Knöllchen habe ich im wesentlichen bei den Kulturversuchen denselben Weg eingeschlagen, wie ihn BEIJERINCK¹⁾ in seiner grundlegenden Arbeit über die Papilionaceenbakterien darlegt.

1. Nährböden.

1.) Agar nach BEIJERINCK:

18 g Agar auf 1 l Wasser.

5 g Asparagin.

5 g Rohrzucker.

Absud aus Wurzeln und Blättern von *Melampyrum* oder *Alectorolophus*.
Natriumbicarbonat bis zur schwachsauren Reaktion.

2.) Gelatine nach BEIJERINCK²⁾:

Absud von Blättern und Wurzeln der zu untersuchenden Rhinanthacee.

7% Gelatine.

$\frac{1}{4}$ % Asparagin.

$\frac{1}{2}$ % Rohrzucker.

3.) Agar nach HILTNER³⁾:

1.5% Agar.

$\frac{2}{100}$ Wurzelextrakt.

1% Traubenzucker.

Auf 0.5 l Wasser eine Messerspitze voll kohlsauren Kalk.

2. Sterilisationsmethode.

Um bei einem eventuellen Aufgehen einer Reinkultur Verunreinigungen fernzuhalten, die von Bakterien herrühren, die außen am Haustorium ansitzen, war eine genaue Sterilisation nötig, die jedoch nicht so weit gehen darf, daß das innere Gewebe getötet

1) BEIJERINCK M. W., l. c. S. 743.

2) BEIJERINCK M. W., l. c. S. 743.

3) HILTNER L., l. c. S. 56.

wird. Ich verwendete Haustorien, die mit einem Pinsel sorgfältig gereinigt und sodann in sterilem Wasser mehrfach ausgewaschen wurden. Hierauf legte ich die von überflüssigen Wurzelstücken befreiten Haustorien auf etwa 2 Minuten in absoluten Alkohol, zog sie mit steriler Pinzette rasch durch die Flamme und tauchte sie sodann in Äther. Mit neuerdings sterilisierter Pinzette wurde das Haustorium im Agar einer Eprouvete zerdrückt, so daß das hyaline Gewebe herausquoll und zum Teil zerfiel. Die Eprouvete wurde fest geschüttelt und in Petrischalen ausgegossen. Bei diesem Vorgehen wurde der Inhalt des Haustoriums im Nähragar ziemlich ausgebreitet.

Zu den Kulturversuchen verwendete ich Haustorien aller Größen sowie von Pflanzen aller Entwicklungsstadien, so daß es ausgeschlossen erscheint, gerade ein fortpflanzungsfähiges Stadium der vermeintlichen Bakterien übergangen zu haben. Ich unternahm ungefähr 80 Impfungen.

3. Resultat.

In keinem einzigen Falle konnte ich das Wachstum einer Bakterienform konstatieren, die mit den im Haustorium vorkommenden Körnchen identisch erscheint. Das aus dem Haustorium durch das Zerdrücken herausgequollene hyaline Gewebe zeigte sich bis nach 10 Tagen und mehr bei mikroskopischer Untersuchung völlig unverändert, die kleinen Körnchen waren noch in ihrer ursprünglichen Form zu sehen. Daß das Gewebe nicht übersterilisiert war, ergibt sich daraus, daß in einigen Fällen außen ansitzende Bakterien sich weiter vermehrten. —

Ein Kulturversuch mit *Vicia*-Bakterien, zur Kontrolle auf die gleiche Methode ausgeführt, gelang sehr gut.

Meinem Ermessen nach liefern diese Versuche den Beweis, daß die im Haustorium der Rhinanthaceen enthaltenen körnchen- bis stäbchenförmigen Gebilde keine Bakterien sind, man müßte denn die höchst unwahrscheinliche Annahme machen, daß die eventuell vorhandenen Bakterien gerade in den angewandten Nährmedien sich nicht entwickeln können.

III. Zusammenfassung.

Als Ergebnis meiner Untersuchungen kann ich folgendes anführen:

1. Weder an *Melampyrum* noch an *Alectorolophus* konnten neben den Haustorien Bildungen gefunden werden, die den Knöllchen der Leguminosen analog sind.

2. Im Gewebe des Haustorialknopfes von *Melampyrum* und *Alectorolophus*, hier aber in geringerer Menge, sind Körnchen und Stäbchen zu sehen, welche aber die Zellen keineswegs so einheitlich füllen, wie dies bei Leguminosen-Knöllchen der Fall ist. Ihre Form läßt sich besonders in Quetschpräparaten deutlich erkennen.

3. Bei *Melampyrum* hängt das Auftreten der Inhaltskörper von der Ausbildung des Gefäßbündels ab.

4. Parallelreaktionen mit Knöllchenschnitten ergeben keinen sicheren Beweis für die Übereinstimmung der Körnchen mit den Bakterien derselben.

5. Eiweißreaktionen (MILLONsche und RASPAILsche Reaktion) gelingen bei gefüllten Haustorien vorzüglich.

6. Die in unserer Frage so bedeutungsvollen Kulturversuche auf geeigneten Nährböden ergaben durchwegs ein negatives Resultat.

Eine sichere Erklärung über die stoffliche Natur der Körperchen zu geben, erscheint insofern sehr schwer, als die Haustorialzellen mit Nährstoffen aller Art angefüllt sind, daher eine spezielle Reaktion auf die Körnchen nicht auszuführen ist. Die deutliche Eiweißreaktion bei gefüllten Zellen spricht dafür, daß das Haustorium mit Stoffen eiweißartiger Natur angefüllt ist, wozu wir die Körnchen und Stäbchen am ehesten rechnen können.

Zum Schlusse sei mir gestattet, an diesem Orte meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. HANS MOLISCH meinen Dank auszusprechen für die Zuweisung des Themas, sowie für die mir erteilten Belehrungen bei der Durchführung meiner Arbeit. Ebenso sei dem Herrn Assistenten JOSEF GICKLHORN wärmstens gedankt für seine nützlichen Ratschläge und das mir bewiesene Interesse.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft](#)

Jahr/Year: 1916

Band/Volume: [34](#)

Autor(en)/Author(s): Jülg Elfriede

Artikel/Article: [Ueber das angebliche Vorkommen von Bakterien in den „Wurzelknöllchen“ der Rhinanthaceen 427-439](#)