

44. B. Frank: Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen.

Eingegangen am 15. October 1889.

Seit ich vor zehn Jahren nachgewiesen habe, dass die Wurzelknöllchen der Leguminosen in einem vorher sterilisirten Boden nicht zur Entwicklung kommen, musste es im höchsten Grade für wahrscheinlich gelten, dass wenigstens die Entstehung dieser Knöllchen auf einer Infection durch Microorganismen des Erdbodens beruht, mochte man über den Inhalt der Knöllchen denken wie man wollte. Dass der letztere nicht von allen Forschern für pilzlicher Natur, sondern von Manchen für eine Bildung der Pflanzen selbst erklärt wurde, ist bekannt. Ich brauche hier nicht die gewichtigen Gründe für die letztere Annahme auseinanderzusetzen, welche festgestellt worden sind besonders durch die Untersuchungen von BRUNCHORST¹⁾ und TSCHIRCH,²⁾ die in meinem Institute ausgeführt wurden und mich vollständig überzeugt haben, und denen sich meine Ergebnisse³⁾ bezüglich der analogen Bildungen an den Wurzeln der Erlen und Eläagnaceen anreihen. Auch alles, was meine neuesten Untersuchungen ermittelt haben, bestätigen diese Auffassung. Eine ebenso vorurtheilsfreie Untersuchung ist aber auch die erste Bedingung um nun weiter auch über die wahre Natur des merkwürdigen Organismus in's Klare zu kommen, welcher wie das Folgende in vorläufiger Mittheilung zeigen wird, als der Erreger der gedachten Bildungen und der damit in Verbindung stehenden wichtigen Lebenskräfte der Pflanze zu betrachten ist. Denn wir haben es hier mit einem Lebewesen und mit einer Form von Symbiose zu thun, die, soweit uns das Pflanzenreich bis jetzt bekannt ist, ohne jedes Analogon sind, auch mit derjenigen Symbiose, die ich in den Mycorrhizen der Waldbäume und anderer Phanerogamen aufgefunden habe, nicht verglichen werden können.

In der jüngsten Zeit sind die Wurzelknöllchen der Leguminosen wieder von mehreren Beobachtern untersucht worden. Es hat sich dabei immer wieder darum gehandelt, die Natur derjenigen beiden Bildungen aufzuklären, über welche bisher die Controverse, ob Pilz oder Zellplasma schwebte, nämlich 1. die in den inneren Parenchymzellen der Knöllchen enthaltenen Bacteroiden und 2. die pilzfaden-

1) Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft, 1885. Heft 7.

2) Daselbst 1887. Heft 2.

3) Daselbst 1887. Heft 1.

artigen Bildungen, die in den nämlichen Zellen allerdings nur bei gewissen Species vorkommen, bei anderen Papilionaceen regelmässig fehlen. Auch diese neuesten Beobachter kommen zu den widersprechendsten Auffassungen. Nach VUILLEMIN¹⁾ sind die Bacteroiden einfache Differenzirungen des Plasmas und nur die pilzfadenartigen Bildungen stellen den fremden Organismus dar. Diese Fäden hält er für kein Plasmodium, denn er will an ihnen eine durch Chlorzinkjod sich bläuende Membran gefunden haben. Den Pilz nennt er *Cladochytrium tuberculorum*, weil er in alten entleerten Knöllchen daraus zoosporangientragende Fäden geworden gesehen haben will. Letztere Beobachtung halte ich unzweifelhaft für eine Verwechslung mit später eingedrungenen saprophyten Pilzen, da die Fäden in den Knöllchen wie ich gleich zeigen werde, eine ganz andere Natur haben. Auch bei den Leguminosen ohne Fäden in den Knöllchen nimmt VUILLEMIN sein *Cladochytrium* an; er meint, die Fäden könnten hier so fein sein, dass man sie nicht leicht erkennt.

BEYERINK²⁾ hält gagegen die Fäden, die er mit dem Namen Schleimfäden belegt, nicht für den Pilz, sondern für Ueberbleibsel der Kerntonnen, welche nach beendigter Zelltheilung nicht vollständig zu dem Cytoplasma und dem Kern zurückwandern, weshalb sie die gebildete Theilungswand durchbohren. Vielmehr sieht BEYERINK den pilzlichen Organismus in den Bacteroiden; diese sollen entstehen aus mikrosomenartigen kleinen Körperchen, welche im Plasma der jüngsten Meristemzellen der Knöllchen enthalten sind und Bacterien darstellen, welche auf nicht näher beobachtete Weise aus dem Erdboden in die Wurzel eingedrungen seien. Unsere Beobachtung, dass die Bacteroiden später von der Pflanze aufgelöst und verbraucht werden, wird bestätigt; sie seien darum „geformte Eiweisskörperchen, welche die Pflanze zum Zwecke localer Eiweissanhäufung aus *Bacillus radicola* züchtet, also Organe des pflanzlichen Protoplasma entstanden aus eingewanderten Bacterien.“

PRAZMOWSKI³⁾ hat die schon von ERICKSON gesehenen, von der Wurzelepidermis nach dem Bacteroidengewebe laufenden Fäden in den jüngsten Erbsenknöllchenanlagen genauer untersucht und sieht in ihnen ein Plasmodium, erfüllt mit sehr kleinen stäbchenförmigen Körperchen; in die subepidermalen Zellen der Wurzel gelangt, umhülle dasselbe den ganzen Zellinhalt und nehme denselben in sich auf, so dass Pilzkörper und Zellinhalt eine einheitliche Masse bilden; die kleinen Körperchen vermehren und vergrössern sich später zu den Bacteroiden. In einer zweiten Mittheilung⁴⁾ hat PRAZMOWSKI seine Ansicht wieder

1) Annales de la science agronom. franc. et étrang. I. Nancy 1888.

2) Botanische Zeitung 1888. Nr. 46—50.

3) Botanisches Centralblatt 1888. Nr. 46—48.

4) Bulletin der Akademie der Wissenschaft in Krakau, Juni 1889.

geändert; die Fäden, welche die Infection bedingen und schon in den Wurzelhaaren zu beobachten sind, seien „hyphenähnliche Schläuche, die mit Bacterien dicht erfüllt sind“; die Keime der Bacterien dringen auf nicht näher beobachtete Weise in das Wurzelhaar ein und vermehren sich darin massenhaft. Das Bacteroidengewebe entsteht indem im Meristem desselben die Membranen der bis dorthin eindringenden Bacterienschläuche sich auflösen und die Zellen sich mit den so befreiten Bacterien erfüllen; nach dieser Vermengung mit dem Plasma der Zelle werden die Bacterien unter Vermehrung zu den typischen Bacteroiden. Die Beobachtung, welche BEYERINK in seiner inzwischen erschienenen Arbeit mittheilte, dass man durch Aussaat zerriebenen jugendlichen Bacteroidengewebes auf Gelatine kleine Schwärmer züchten kann, wird in PRAZMOWSKI's zweiter Mittheilung bestätigt, ebenso auch die Auflösung der alten Bacteroiden in den Knöllchen durch die Pflanze.

Im Nachstehenden werde ich meine eigenen neuesten Beobachtungen über die Natur und die Eigenschaften des Microbs der Leguminosen mittheilen, wodurch unsere Kenntnisse des hier vorliegenden höchst eigenthümlichen Symbiose-Verhältnisses wiederum um einen Schritt gefördert werden.

I. Die Einwanderung des knöllchenerzeugenden Mikrobs in die Leguminosenwurzel.

Schon aus meiner vor 10 Jahren gemachten Wahrnehmung, dass in sterilisirtem Erdboden bei der Erbse sich keine Wurzelknöllchen bilden, musste der Gedanke an eine Infection sich ergeben. Ich habe das in den letzten Jahren durch ausgedehnte Versuche mit Erbse und Lupine von neuem bestätigen können. HELLRIEGEL¹⁾ hat diese Beobachtungen dahin erweitert, dass er in einem sterilisirten Boden die Bildung der Knöllchen durch Zugabe einer sehr kleinen Menge unsterilisirten Ackerbodens hervorrufen konnte. Diese Beobachtungen habe ich bestätigt gefunden, und zwar bei Impfungen mit den verschiedenartigsten Böden und mit so kleinen Mengen, dass an eine Einführung irgend ins Gewicht fallender Nährstoffmengen nicht und also nur an die Möglichkeit einer Fermentwirkung gedacht werden konnte. Den fermentirenden Organismus und seine Einwanderung in die Wurzel aber wirklich sichtbar zu machen, ist eine sehr schwierige Aufgabe, und doch muss diese Forderung gestellt werden. Ich glaube sie in den dermalen möglichen Grenzen gelöst zu haben. Es giebt zwei Arten der Infection; für jede Leguminosen-Species scheint immer eine der beiden constant sein.

1) Zeitschrift des Vereins für die Rübenzucker-Industrie, November 1888.

1. Die Einwanderung mittelst Infectionsfadens. Das pilzfadenartige Gebilde, welches in ganz jungen Erbsenknöllchen schon von ERICKSON gesehen worden ist, wie es von der Wurzelepidermis gerade nach dem Bacteroidengewebe sich erstreckt, ist keine zufällige Bildung, sondern steht mit der Infection in nächster Beziehung. Das ergibt sich aus Folgendem. Diesen Faden finde ich ausnahmslos in jeder jüngsten Knöllchenanlage der Erbse; er ist früher zu finden, als das Knöllchen in die Erscheinung tritt; auf seinem Laufe nach den inneren Rindenzellen gabelt er sich ein-, zwei-, selbst dreimal, so dass er mit tieferem Eindringen, sich in eine Anzahl Fäden vermehrt, welche fächer- oder büschelförmig auseinander laufen; da wo diese Fäden endigen, haben die Rindenzellen bereits den Charakter von Meristemzellen des künftigen Bacteroidengewebes und die sogleich zu beschreibende eigenthümliche Beschaffenheit des Inhalts angenommen. Ich will deshalb diesen Faden als Infectionsfaden bezeichnen. Es macht also auf das deutlichste den Eindruck, dass erst durch das Hingelangen dieses Fadens diejenige Thätigkeit in den Zellen beginnt, welche zur Bildung des Knöllchens führt. Die Rindenzellen, in denen die Infectionsfäden endigen, bekommen ein reichliches, homogenes, glänzendes Plasma, in welchem ein Saitraum zu erkennen ist und der Zellkern zu einem ebenfalls homogenen und glänzenden unregelmässig klumpenförmigen Körper sich vergrößert hat; zugleich haben die Zellen eine Fähigkeit zu lebhafter Theilung erhalten, wodurch sie schnell zu einem Meristem sich vergrößern. Die Infectionsfäden haben mit dem veränderten plasmatischen Inhalt dieser Zellen fast gleiche Beschaffenheit, sie gehen ohne Grenze in denselben über, bewahren aber auch bei weiter fortschreitender Zellvermehrung vielfach ihre das Lumen durchsetzende strangförmige Gestalt. Auch die Fäden, die man im Meristem älterer Knöllchen findet, stammen von den Infectionsfäden ab. Die durch die Infection entstandene veränderte Art des Plasmas in den Rindenzellen will ich, da sie offenbar durch die Vermischung mit einem pilzartigen Wesen entstanden ist, als *Mycoplasma* bezeichnen. Woraus entsteht nun aber der Infectionsfaden? MARSHALL WARD und PRAZMOWSKI haben bereits gesehen, dass er in den Wurzelhaaren seinen Anfang nimmt. Oft liegt der letztere in der Spitze des Wurzelhaares, doch kann er auch viel tiefer liegen; immer aber finde ich daselbst eine Ansammlung einer plasmaartigen Substanz, in welcher man mehr oder weniger deutlich kleine micrococcusartige Elemente erkennt, und welche oft das Aussehen einer unregelmässig traubigen *Zoogloea* hat; die knopfartigen mit dicker Membran umhüllten Bildungen, welche PRAZMOWSKI gesehen hat, halte ich für etwas unwesentliches, da ich sie nie beobachtet habe. Ich habe endlich auch noch Zustände vor der Bildung des Infectionsfadens gefunden: man bemerkt im Innern des Wurzelhaares viele kleine umherschwärmende micrococcus- oder bacterienartige Körperchen oder auch

ein *Zoogloea*-Gebilde, wovon noch kein Infectionsfaden ausgeht; und auch ausserhalb des Wurzelhaares habe ich an solchen Stellen der Wurzel diese nämlichen Organismen gefunden, die bald frei um die Wurzelhaare lagen, bald an diesen ansassen. Es sind also als aufeinanderfolgende Stadien gefunden worden: ein Microorganismus ausserhalb des Wurzelhaares, derselbe im Innern des letzteren, dann der davon ausgehende Infectionsfaden, der nach dem Ursprungsort des Knöllchens führt, endlich die mit *Mycoplasma* erfüllten Meristemzellen, aus denen das Bacteroidengewebe hervorgeht. Damit ist durch directe Beobachtung die Infection verfolgt worden. Das Eindringen von Schwärmern durch die geschlossene Membran des Wurzelhaares hat nichts Auffallendes. Der Infectionsfaden durchbohrt die Membranen der Epidermis- und Rindenzellen; auf Flächenansichten der trennenden Membran sieht man in der letzteren in der Mitte der Verbreiterung, mit der sich der Faden an die Wand ansetzt, einen feinen Porus.

2. Die Einwanderung ohne Infectionsfaden. Bisher war einer der räthselhaftesten Punkte in der Frage der Leguminosen-Knöllchen der Umstand, dass die pilzfadenartigen Bildungen mit derselben Regelmässigkeit, mit der sie bei den meisten Species vorkommen, bei einigen constant fehlen, wie bei *Lupinus* und *Phaseolus*. Ich habe die Aufklärung dafür gefunden in der wesentlich anderen Art, wie hier die Infection vor sich geht. Hier empfangen nämlich die unmittelbar unter der Epidermis liegenden Rindenzellen oder auch die Epidermiszellen selbst direct und zuerst die Infection. Bei der Bohne wachsen bisweilen die Epidermiszellen an der Stelle, wo das Knöllchen angelegt werden soll, palissadenförmig nach aussen, gleichsam um den Infectionsstoff nach den unter ihnen liegenden Rindenzellen zu leiten. Bei der Lupine schieben oft die subepidermalen Rindenzellen indem sie papillenförmig auswachsen, die Epidermiszellen zur Seite und holen sich gleichsam selbst den Einwanderer. Man sieht dann als ersten Anfang der Knöllchenbildung unmittelbar unter der Epidermis einige wenige durch Theilung vermehrte, mit dem charakteristischen glänzenden *Mycoplasma* erfüllte Zellen, während die weiter nach innen folgenden Rindenzellen bis zur Endodermis hin zunächst noch völlig unverändert sind. Erst hierauf, allerdings sehr bald, übertragen die ersten *Mycoplasma*zellen ihre Infection an die tiefer liegenden Parthien der Rinde und die Zelltheilung und Umwandlung in die *mycoplasma*erfüllten Meristemzellen schreitet allmählich bis zur und bis unter die Endodermis fort und damit erst ist der Zustand erreicht, den die bisherigen Beobachter als frühestes Stadium auffinden konnten. Da es also hier keines ins Innere eindringenden Infectionsfadens bedarf, weil die Pflanze selbst ihrem Symbionten gleichsam entgegengeht, indem sie schon an der Wurzeloberfläche die Keime des Microbs in ihr Protoplasma aufnimmt, so ist damit die einfachste Erklärung dafür gewonnen, dass und warum

der pilzfadenartige Theil des Knöllchenpilzes je nach Species vorhanden ist oder fehlt. Bei der Lupine und besonders bei der Bohne habe ich fast regelmässig gerade über den jüngsten Knöllchen-Anfängen denselben Microorganismus wie bei der Erbse in auffallender Menge angehäuft gefunden, hier direct auf der Epidermis, während er an allen knöllchenfreien Stellen fehlte. Bisweilen war auch eine zoogloeaartige Masse gerade in derjenigen Epidermiszelle, die über den ersten mit Mycoplasma erfüllten Rindenzellen lag, zu erkennen.

II. Deutung der pilzlichen Elemente.

Wie schon oben erwähnt, ist der Infectionsfaden und die von ihm abstammenden pilzfadenartigen Bildungen im Meristem nicht wesentlich vom übrigen plasmatischen Inhalte der inficirten Meristemzellen verschieden. Ich kann an diesen Fäden keine eigentlich Zellmembran nachweisen, wiewohl sie oft, namentlich wenn sie älter und leerer geworden sind, eine dichtere Hautschicht sehr deutlich wahrnehmen lassen; sie bestehen aber, wie Reagentien zeigen, ganz aus plasmatischer Substanz. Als Pilz betrachtet müssten sie daher correct, so wie es KNY zuerst gethan hat, als Plasmodien gedeutet werden. Allein der plasmatische Inhalt der Meristemzellen, von welchem die Fäden, wie gesagt, nicht zu trennen sind, kann nicht bloss für Pilz gehalten werden; denn dieser Inhalt zeigt ja unter Kerntheilung die gewöhnliche Zellvermehrung wie in allen Meristemen höherer Pflanzen. Aber umgekehrt kann er auch nicht als reines Phanerogamenplasma, und die Fadenbildungen nicht als Reste der Kerntonnen angesehen werden, denn der verpilzte Zellkern ist ein Klumpen von durchaus homogener Beschaffenheit, an welchem die bekannten Differenzirungen der Karyokinese, zu denen die Kerntonnen gehören, nicht zu finden sind. Vielmehr ist also dieser Inhalt ein Gemisch von Pilz und Phanerogamenplasma, und die Bezeichnung Mycoplasma mag daher gerechtfertigt erscheinen. Wie wir uns diese Mischung vorzustellen haben, ist damit freilich noch nicht entschieden. Optisch erscheint der Infectionsfaden sowie das Mycoplasma und dessen Zellkern, wenn die Objecte frisch sind und in Wasser liegen, homogen. Allein schon beim Absterben in Folge der Präparation und besonders durch Reagentien, z. B. in Jodkaliumjodlösung, gelingt es, darin gewisse Formelemente unterscheidbar zu machen, die vielleicht den wirklich pilzlichen Gemengtheil darstellen. Besonders durch verdünnte Kalilauge kann man diesen in allen nicht verpilzten Zellen fehlenden Bestandtheil klar hervortreten sehen. In diesem Reagens lösen sich unter Aufquellung das Protoplasma und der Zellkern vollständig auf, sowohl in den nicht verpilzten Wurzelzellen wie in den verpilzten Meristemzellen; aber in den letzteren wird dabei auf einmal eine Menge micrococcusartiger Körperchen, welche ungelöst bleiben, sichtbar, die ganz ähnlich den Schwärmern

sind, die man auf Gelatine aus Bacteroiden züchten kann, wie wir unten sehen werden. Auch in den Infectionsfäden, die der Kalilauge mehr widerstehen, tritt dabei eine feine Schwammstructur hervor, welche sehr wohl von den nämlichen in dem Faden dicht gelagerten Körperchen herrühren könnte, wie es auch PRAZMOWSKI, der diese Beobachtung schon gemacht hat, deutete. Nichts liegt also näher als die Annahme, dass diese schwärmerartigen Körperchen von denjenigen abstammen, welche ich in und ausserhalb des Wurzelhaares und den Epidermiszellen an den Infectionsstellen bei Erbse, Lupine und Bohne nachgewiesen habe. Von der Deutung, die man dem Infectionsfaden giebt, wird es abhängen, zu welchen Pilzen das Knöllchenmicrob gehört. Alle bisherigen Beobachter sehen in dem Infectionsfaden ein pilzliches Organ. Ist das richtig, so könnte dasselbe nur ein Plasmodium sein, und der Pilz würde zu den Myxomyceten gehören. PRAZMOWSKI's Deutung als Hyphenschläuche trifft nicht zu, da diesen Fäden die Zellmembran fehlt; und ganz widersprechend mit dieser Deutung wäre die andere von demselben Forscher herrührende, dass es sich um Bacterien handelt, denn hyphenbildende Bacterien ist ein Widersinn. Aber keinem der bisherigen Beobachter ist der Gedanke eingefallen, den Infectionsfaden überhaupt nicht für den Pilz, sondern für eine Bildung des Plasmas der Nährpflanze zu halten, bestimmt zum Einfangen und Hereinleiten der symbiotischen Micrococcus- oder Bacterien-schwärmer nach den Orten ihrer Bestimmung. Damit würde sich auch das Fehlen dieses Organes bei anderen Leguminosen leicht erklären. Der Pilz wäre dann bei allen Leguminosen ein gleichartiger Micrococcus oder Bacterium, also ein Spaltpilz. Kein Beobachter hat bis jetzt gesehen, ob und wie eigentlich der Infectionsfaden wächst; man findet ihn in jüngsten Knöllchen-Anlagen schon continuirlich vom Wurzelhaar an bis in die Meristemzellen reichen. Ich habe nun aber Zustände gefunden, wo er erst bis in die Mitte des Haares sich entwickelt hatte. Er zeigte hier nicht die Erscheinung einer wachsenden Fadenspitze, sondern schien sich durch allmähliche Ansammlung von Plasma der Zelle erst zu constituiren.

Was die Stellung anlangt, die wir dem in Rede stehenden Pilz im System anzuweisen haben, ist wenigstens das gerechtfertigt, dass man ihn wegen seiner vielen Eigenthümlichkeiten in eine besondere Gattung bringt. Um in der vielleicht noch sich aufwerfenden Discussion, ob er zu den Myxomyceten oder zu den Spaltpilzen zu stellen sei, in der Namengebung nichts zu präjudiciren, ist vielleicht die Bezeichnung *Rhizobium leguminosarum* für ihn empfehlenswerth. Nach den vorstehenden von mir erst kürzlich gemachten Beobachtungen scheint er mir den Spaltpilzen näher zu stehen als den Myxomyceten. Wieweit in *Plasmodiophora brassicae* eine Verwandtschaft vorliegt, kann ich im Augenblicke nicht beurtheilen.

III. Entstehung der Bacteroiden.

Wenn man den Uebergang der Meristemzellen in die ausgebildeten mit Bacteroiden erfüllten Zellen verfolgt, so kann man unter Anwendung von Kalilauge sich überzeugen, dass es die micrococcusartigen Körperchen sind, welche während des bedeutenden Wachstums der Zelle und der Vermehrung des plasmatischen Inhaltes, sich ungeheuer vermehren und in den allmählich aus dem Plasma sich differenzirenden Bacteroiden aufgehen, die nun schon ohne Reagentien hervortreten, offenbar weil sie gegenüber dem sie einbettenden Plasma stärker lichtbrechend geworden sind. Gegen Kalilauge ist die Substanz der Bacteroiden ziemlich resistent; allein es treten dabei in ihnen mehr oder weniger deutlich die micrococcusartigen Körperchen hervor, von welchen in einem Bacteroid 2, 3, 4 und mehr hinter einander liegend unterschieden werden können, in ganz ähnlicher Weise wie dieselben aus den Bacteroiden sich entwickeln, wenn die letzteren auf Gelatine ausgesäet worden sind, wie wir unten sehen werden. Ebenso bleiben zur Zeit wo die Bacteroiden in den alten Knöllchen sich auflösen eine Unmasse dieser micrococcusartigen Schwärmer in der Zelle zurück, wo sie allem Anschein nach nicht resorbirt werden, sondern sich nach dem Zerfall der Knöllchen wieder in den Erdboden verlieren. Aus alledem ergibt sich, dass die Bacteroiden Eiweissgebilde der Leguminose sind, die von ihr erzeugt und wieder aufgelöst werden, in denen aber ein micrococcusartiges Microb eingeschlossen ist. Auch die häufige zwei- und dreiarmlige Gestalt, die an Schwärmern und Spaltpilzen nicht bekannt ist, spricht gegen die Organismennatur der Bacteroiden. Diese Gestalt ist einfach die Folge der netzförmigen oder schwammartigen Anordnung, in welcher diese Gebilde sich im Plasma differenziren.

IV. Cultur des Knöllchen-Microbs.

Die Behauptung BEYERINK's, dass man aus jungen Knöllchen den Knöllchen Organismus auf Gelatine künstlich ziehen kann, beruht auf Versuchen, wobei zerriebenes Bacteroidengewebe auf Gelatine übertragen wurde. Die KOCH'sche Methode der Aussaat auf Gelatineplatten ist eine viel zu rohe, um zu erkennen, woraus die auf der Gelatine erschienenen Organismen entstanden sind, wenn man zur Aussaat ein so buntes Gemisch wie es zerriebenes Bacteroidengewebe ist, verwendet. Ich habe daher die Culturen (mit Material aus jungen Knöllchen) im Hängetropfen in verdünnter Gelatine angestellt, wo man täglich die Veränderungen der Formelemente direct verfolgen kann, selbstverständlich mit allen Vor-

sichtsmassregeln, besonders nach Sterilisirung aller bei der Operation gebrauchten Substanzen und Instrumente. Auf diesem Wege bekommt man unanfechtbare Resultate. Mit Bacteroiden von Lupinen und Erbsen habe ich dabei in allen Culturen übereinstimmende Producte erhalten. Am 3. bis 6. Tage, mitunter auch erst nach noch längerer Zeit tritt die Umgestaltung ein. Es erscheinen kleine micrococcus- oder bacterienartige Schwärmer, die von den daneben noch vorhandenen unveränderten Bacteroiden sehr leicht zu unterscheiden sind. Letztere sind ungefähr 3—5,5 μ , die Schwärmer nur 0,9—1,3 μ gross; die Bacteroiden haben langgestreckte, oft Yförmige Gestalt, die Schwärmer sind stets einfach, gerade, rund oder länglich; die Bacteroiden sind ziemlich stark, die Schwärmer viel schwächer lichtbrechend; die Bacteroiden sind nach Einsaat in die Gelatine unbeweglich, die Schwärmer zeigen meist vor- und rückwärts fahrende, viele auch lebhaft umherschwärmende Bewegung, viele aber auch Ruhe; eine Cilie habe ich nicht entdecken können. Ihre Entstehung aus den Bacteroiden konnte ich immer verfolgen. Je nach der Grösse des Bacteroids entstehen in ihm in einfacher Reihe liegend 2, 3, 4 und auch mehr Schwärmer; indem das Bacteroid sich auflöst treten die letzteren immer deutlicher hervor. Meistens entfliehen dann die so befreiten Schwärmer, und der Bacteroidenhaufen wird dann immer leerer und hinterlässt das Nichtumgewandelte. Bisweilen geht der Process langsamer; man sieht dann die Schwammstructur, die ein Haufen dicht aggregirter Bacteroiden besitzt, während sie vorher starr ist, in Zuckungen und dann in brodelnde Bewegung gerathen. Die Schwärmer vermehren sich in der Gelatine des Hängetropfens meist lebhaft, oft so, dass letzterer macroscopisch sich trübt. Dabei durchlaufen die Schwärmer oft, immer direct von Tag zu Tag verfolgbar, verschiedene an Bacterien bekannte morphologische Zustände, namentlich merkwürdige *Zoogloea*-formen von bald fadenförmiger, bald dendritischer, bald sphärischer, bald wurstförmiger oder traubiger Gestalt, aus denen dann wieder Schwärmer hervorgehen. Die Entwicklungsformen sollen später genauer beschrieben werden. Solches reines Material von Schwärmern aus Hängetropfen-Culturen habe ich nun auch auf Gelatineplatten übergeimpft. Hier entwickeln sich kleine runde convexe Gallerthäufchen von gelblich-grauer Farbe, welche meist nicht oder nur wenig die Gelatine verflüssigen und aus den nämlichen Schwärmern bestehen.

Aus den unter III und IV erwähnten Thatsachen ergibt sich also, dass die Bacteroiden selbst keine Pilze sind, sondern Bildungen des Plasmas der Pflanze, in welchen der Micrococcus des Knöllchen-Microbs enthalten ist. Darum gelingt es auch nie, in den nach Aussaat von Bacteroiden auf Gelatine sich entwickelnden Organismen Formen, die den charakteristischen Bacteroiden-

gestalten gleichen, zu erziehen; die letzteren sind eben nur Erzeugnisse der Leguminose.

V. Wirkungen des Knöllchenmicrobs auf die Pflanzen.

Dass das Knöllchenmicrob auf die Leguminose, mit deren Organismus es in Symbiose getreten ist, eine gewisse Rückwirkung ausübt, konnte nicht mehr zweifelhaft sein, nachdem HELLRIEGEL gefunden hatte, dass Erbsen in einem stickstofffreien, mit den übrigen mineralischen Nährstoffen versetzten Boden sich nur dann normal und unter ansehnlicher Steigerung des Erntegewichtes entwickeln, wenn durch Impfung mit etwas natürlichem Erdboden die Entstehung der Wurzelknöllchen ermöglicht worden ist. Aus diesen Beobachtungen glaubte er die Hypothese ableiten zu können: der in den Wurzelknöllchen der Leguminose lebende Pilz ist es, welcher der Pflanze den elementaren Stickstoff der Luft zur Ernährung verwerthbar macht, eine Hypothese, die unter den Chemikern und Landwirthen Mancher für etwas Festgestelltes aufnahm, weil es eben Vielen bequemer ist an ein paar kurze Schlagworte zu glauben, als in die complicirten Vorgänge der Pflanzenwelt sich zu vertiefen. Das Folgende wird zeigen, wie verfrüht und einseitig jene Hypothese ist, und wie sie selbst ohne jeden Beweis geblieben ist.

Wenn man ermitteln will, welchen Einfluss das Knöllchenmicrob auf die Pflanze ausübt, so muss man in ganz objectiver Weise die Unterschiede aufsuchen, welche die letztere zeigt, je nachdem sie mit oder ohne Knöllchen sich entwickelt, und unter welchen äusseren Bedingungen diese Unterschiede hervortreten. Das Mittel dazu besteht, wie Eingangs schon erwähnt, einfach darin, dass man die Pflanze in unsterilisirtem oder in sterilisirtem Boden cultivirt. Dabei habe ich eine ganze Reihe wichtiger Unterschiede gefunden, die ich in Folgendem auseinandersetzen will.

1. Behaftung der Pflanze mit Bacteroiden. Leguminosen, welche durch das Knöllchenmicrob inficirt sind, bilden Wurzelknöllchen und in diesen die eigenthümlichen Eiweisskörper, die Bacteroiden. Die letzteren kommen aber in solchen Pflanzen nicht bloss in den Wurzelknöllchen vor, sondern erstens, wie BEYERINK schon beobachtete auch in gewöhnlichen Wurzelzellen; zweitens aber fand ich diese Gebilde, was bisher noch unbekannt war, auch in den oberirdischen Organen, in den Parenchymzellen der Stengel, Blattstiele, Blattrippen; so bei der Lupine und Erbse, selbst in den blättertragenden Zweigen der Baumkrone von *Robinia*; bei *Phaseolus vulgaris* auch in den Früchten; nach TSCHIRCH's mündlicher Mittheilung kommen sie auch im Fruchtfleisch von *Cassia* vor. Aber sehr bemerkenswerth ist es, dass ich in meinen Versuchspflanzen von Lupinen und Erbsen in sterilisirtem

Boden, wo keine Wurzelknöllchen vorhanden sind, die Bacteroiden auch in den oberirdischen Organen vergebens gesucht habe. Diese Thatsachen zeigen deutlich genug, dass die Bacteroiden selbst nicht etwas aus dem Boden Eindringenes sein können. Aber sie zwingen uns zu der Annahme, dass das Vorkommen von Bacteroiden das Anzeichen eines Infectionszustandes ist; sie sind nicht selbst der fremde Organismus, aber sie sind ein Gebilde, welches das Plasma nur im inficirten Zustande erzeugt. Wir müssen auch weiter daraus schliessen, dass durch die Einwanderung des Knöllchenmicrobs das gesammte Plasma der Leguminosenpflanze inficirt ist und eine neue veränderte Beschaffenheit angenommen hat. Sehr auffallend war es mir, bei *Phaseolus vulgaris* auch in den Zellen der Cotyledonen des jungen noch in der Bildung begriffenen Embryo deutliche Bacteroiden zu finden, was mir bei Lupine nicht gelungen ist. Hier wäre also schon der Embryo durch die Mutterpflanze inficirt. Vielleicht giebt diese letztere Beobachtung den Schlüssel zur Erklärung der Thatsache, dass im sterilisirten Boden, wo z. B. Erbse und Lupine prompt ohne Knöllchen bleiben, *Phaseolus vulgaris* ebenfalls Wurzelknöllchen bekommt, wie ich bei allen meinen Versuchen mit dieser Pflanze gefunden habe und wie auch TSCHIRCH bereits beobachtet hatte.

2. Kräftigung der Lebensenergien. Wenn das gesammte Plasma der Pflanze eine Infection erfährt und durch dieselbe zur Bildung von Bacteroiden veranlasst wird, so lässt sich wohl denken, dass es dadurch auch zu anderen Thätigkeiten gekräftigt wird. Aber in dieser Beziehung zeigt sich nun ein sehr verschiedenartiges Verhalten der einzelnen Leguminosenspecies, wesshalb es sehr voreilig wäre, die bei einer oder der anderen Leguminose gefundenen Beziehungen zwischen Pflanze und Knöllchenpilz für diese ganze Pflanzenfamilie zu generalisiren.

a) Das Verhalten von *Phaseolus vulgaris*. Meine Culturversuche mit dieser Leguminose haben ergeben, dass hier die merkwürdigen Beziehungen des Knöllchenmicrobs zu den Ernährungsthätigkeiten der Pflanze, die wir unten kennen lernen werden, nicht obwalten. Wenn man *Phaseolus vulgaris* in einem Sande cultivirt, der so gut wie frei von Humus und äusserst arm an Stickstoff ist, aber die nöthigen mineralischen Nährstoffe enthält, so bleiben die Pflanzen trotzdem, dass sie Wurzelknöllchen bekommen, äusserst kümmerlich, und ein Unterschied in ihrer Entwicklung je nachdem man diesen Boden sterilisirt oder nicht, tritt in keiner Weise hervor. Nimmt man aber statt Sand ein gleich grosses Quantum Humusbodens zur Kultur der Pflanzen, so entwickeln diese sich ausserordentlich kräftig und erzeugen eine Menge Samen, wobei die Production noch um etwas sich erhöht, wenn dieser Humusboden vorher sterilisirt worden war, wie dies nach meinen früheren Beobachtungen auch bei anderen Pflanzenarten der Fall ist. So sehen wir bei *Phaseolus* die einfachste und gewöhnlichste biologische

Beziehung zwischen den beiden Symbionten: das Knöllchenmicrob ist ein Parasit, welcher von der Nährpflanze ernährt wird, aber dieser keinen Dienst leistet.

b) Das Verhalten von *Lupinus luteus* und *Pisum sativum*. Im Gegensatz zur Gartenbohne sehen wir bei der Lupine und der Erbse, dass das Knöllchenmicrob die Lebensthätigkeiten der ganzen Pflanze zu kräftigen vermag. Die HELLRIEGEL'sche Auffassung, wonach diese beiden Pflanzen, wenn ihnen eine Stickstoffverbindung, z. B. Nitrat zur Verfügung steht, sich ohne Mithülfe des Knöllchenpilzes normal ernähren können, jedoch wenn ihnen diese fehlt, auf jene Organismen angewiesen sind, indem dieselben den freien Stickstoff der Luft für die Pflanze assimiliren, trifft das wahre biologische Verhältniss keineswegs. Dem richtigen Verhältniss kommen wir erst durch folgende Beobachtungen näher. Man muss zu diesem Zwecke ausgehen von Culturen in humuslosem und in humushaltigem Boden. Die Beziehungen zum Humus, die in dieser Frage eine so grosse Rolle spielen, hat HELLRIEGEL ganz übersehen, obgleich die jedem Landwirth bekannte Thatsache, dass Erbsen für organische Nährstoffe sehr dankbar sind, hätte darauf leiten können.

In humuslosem Boden zeigen Lupine und Erbse folgendes Verhalten. Zu den betreffenden Versuchen benutzte ich einen ausgeglühten und ausgewaschenen, ganz weissen, vollständig humus- und stickstofffreien Quarzsand, welchem die nöthigen mineralischen Nährsalze in wässriger Auflösung zugesetzt waren und der nur mit destillirtem Wasser begossen wurde. Bleibt soleher Boden ohne Beimischung von natürlichem Erdboden, so entwickeln sich die Pflanzen nur sehr kümmerlich und die Production übersteigt das Gewicht des ausgesäeten Samens nicht oder unbedeutend. Durch Gabe einer anorganischen Stickstoffverbindung, z. B. von Kalknitrat werden Erbsen nur unbedeutend, Lupinen so gut wie gar nicht gekräftigt. Wenn aber ein ganz kleines Quantum frischen Ackerbodens unter diesen Sand gemischt ist, so entwickeln sich die Pflanzen unter sonst ganz denselben Verhältnissen geradezu üppig, erzeugen viel mehr Samen und ergeben eine ansehnliche Vermehrung des Gewichtes ihrer Producte, gleichgültig ob dem Boden eine Stickstoffverbindung zugesetzt war oder nicht. Die Unterschiede zwischen den inficirten oder nicht inficirten Pflanzen setzen sich aber aus einer ganzen Anzahl von Merkmalen zusammen: 1. Das Wachsthum wird grösser. Bei den nicht inficirten Pflanzen bleibt der Stengel merklich kürzer und dünner und besonders die Blätter viel kleiner. Die Foliola der Lupine waren an den inficirten Pflanzen 4 cm lang, 0,8 cm breit, an den nicht inficirten stickstofffreien, wie Salpeterculturen 2 cm lang, 0,5 cm breit. Bei den Erbsen war der Durchmesser der Foliola an den geimpften Culturen 4 cm, an den ungeimpften aber mit Nitrat versetzten Culturen 2 cm, an den ungeimpften stick-

stofffreien 1,2 *cm*. Die photographischen Aufnahmen zeigen das verschiedene Aussehen der Pflanzen sehr auffallend. 2. Die Chlorophyllbildung wird befördert. Die nicht inficirten Erbsen und Lupinen besitzen einen mehr gelbgrünen Farbenton, die inficirten einen kräftig dunkelgrünen. Mikroskopisch zeigt sich, dass die Mesophyllzellen entsprechend weniger und kleinere und mehr gelbgrün gefärbte Chlorophyllkörner besitzen, was auf ein relatives Vorwalten des Xanthophylls gegenüber dem Chlorophyll deutet. Vorhandensein oder Fehlen von Nitrat macht dabei keinen wesentlichen Unterschied. Nach TSCHIRCH's Methode der Chlorophyllbestimmung fand sich bei Lupine geimpft 0,1165, ungeimpft 0,0709 *g*, bei Erbse geimpft 0,600, ungeimpft und mit Nitrat ernährt 0,247, ungeimpft stickstofffrei 0,188 *g* absorbirende Chlorophyllsubstanz pro 1 *qm* Blattfläche. 3. Die Kohlensäure-assimilation wird energischer. An sonnigem Tage am Spätnachmittag untersuchte Blätter von Lupinen und Erbsen zeigten an inficirten Pflanzen ziemlich reichliche Assimilationsstärke in den Chlorophyllkörnern, an nicht inficirten Pflanzen auffallend spärlicher oder ganz fehlend. Damit hängt die grössere Stoffproduction der inficirten Pflanzen zusammen. 4. Die Stickstoffassimilation wird energischer, namentlich diejenige des freien Stickstoffes, wie bei den ganz stickstofffreien Culturen aus der ansehnlichen Vermehrung des Stickstoffgehaltes, den die geernteten Pflanzen gegenüber den ausgesäeten Samen ergaben, hervorgeht. Dadurch ist ebenfalls die gesteigerte Production von Pflanzenmasse, insbesondere von Samen bedingt. 5. Ansammlung von Eiweiss in den Wurzelknöllchen in Form von Bacteroiden und Wiederverbrauch desselben zur Zeit der Fruchtbildung. Woraus dieses Eiweiss entsteht, ist noch völlig unbeantwortet. Die Annahme, dass es hier von dem Knöllchenmicrob aus freiem Stickstoff erzeugt werde, ist eine völlig willkürliche. Zur Bildung dieses Eiweisses ist auch Kohlenstoff nöthig. Es ist kaum zweifelhaft, dass dieser aus der in den Blättern assimilirten Kohlensäure stammen muss; damit steht auch das Auftreten von Stärkemehl in den Bacteroidenzellen und in der Peripherie des Bacteroidengewebes im Einklange. Dass auch der Stickstoff aus der Luft kommen muss, ergibt sich ohne weiteres bei allen Culturen, wo mit stickstofffreiem Boden experimentirt wird. Aber dass der freie Luftstickstoff erst in diesen unterirdischen Organen assimilirt werde, ist erstens durch nichts bewiesen, zweitens wegen der unterirdischen Lage dieser Organe wenig wahrscheinlich. Die andere Möglichkeit, dass der Stickstoff als schon assimilirte Verbindung den Knöllchen zugeführt wird, ist zwar auch nicht bewiesen, aber jedenfalls wahrscheinlicher. Salpetersäure kann es nicht sein, denn davon ist in den stickstofffreien Culturen keine Spur in der Pflanze zu entdecken. Wohl aber finde ich bei diesen Culturen sowohl bei Erbse wie Lupine in den völlig erwachsenen

Blättern sehr viel Asparagin. Da dieses für die erwachsenen Blätter selbst nicht mehr gebraucht werden kann, so dürfte es wahrscheinlicher sein, dass es nicht hierher geleitet, sondern hier gebildet worden und ebenso wie das stickstofffreie Assimilationsproduct zur Auswanderung aus den Blättern bestimmt ist. — Da wir also hier durch die Infection mit dem Knöllchenmicrob eine ganze Reihe von Lebensthätigkeiten befördert sehen, deren jede einzelne als solche von der Pflanze allein ohne Mithilfe von Symbionten ausgeübt wird, so können wir zunächst nur sagen, dass durch die Symbiose hier eine Kräftigung der Lebensthätigkeiten überhaupt hervorgerufen wird. Ein Beweis dafür, dass in Wirklichkeit direct nur eine bestimmte Function der Pflanze gefördert oder bedingt wird, fehlt uns. Und so wäre auch der Gedanke nahe liegend, dass der Einfluss des Knöllchenpilzes auf die Leguminose eher auf gleicher Linie steht mit demjenigen, der in zahllosen anderen Fällen bekannt ist, wo ein fremdes Lebewesen seinen Wirth zu einer ungewöhnlichen Kraftanstrengung in der Bildung von Pflanzenmaterial zwingt, wie wir bei allen Hypertrophien eintreten sahen, also bei den Gallen, bei Blättern, Sprossen u. dergl., die durch Parasiten manchmal zu kolossalen Stoffproductionen veranlasst werden.

In humushaltigem Boden ist das Verhalten der Lupine und Erbse ein wesentlich anderes. Wenn man hier die Infection mit dem Knöllchenmicrob dadurch vereitelt, dass man den Boden vorher sterilisirt, so erscheinen die nun ohne Knöllchen sich entwickelnden Pflanzen keineswegs geschwächt, im Gegentheil sie wachsen noch üppiger als die in dem gleichen unsterilisirten Humusboden wurzelnden, also inficirten und mit Knöllchen versehenen Pflanzen. Letzteres rührt von einer durch die Sterilisirung bewirkten Anschliessung des zur Nahrung für die Pflanze dienenden Humus her, wie ich vor Kurzem nachgewiesen habe. Aber in beiderlei Humusculturen, sowohl in den sterilisirten wie in den unsterilisirten, sind sämtliche Lebensprocesse normal; alles erscheint, namentlich bei der Erbse ungemein üppig und kräftig; ja man erzielt mit einem vielmal kleineren Volum sterilisirten Humusbodens weit grössere Production als sie ein viel grösseres Volum geimpften und mit allen mineralischen Nährstoffen versehenen humuslosen Sandes liefert.

Daraus geht hervor, dass der Lupine und der Erbse die Kräfte, welche sie durch Ernährung mit Humus erhalten, auch durch den Knöllchenpilz verliehen werden; wo Humus genügend vorhanden ist, haben die Knöllchenpilze für die Pflanze keinen Nutzen und sind völlig entbehrlich; wo aber Humus fehlt, ersetzen sie ihn in seiner Wirkung.

Die hier ermittelte Beziehung giebt den Schlüssel zur Erklärung der Thatsache, dass die an und für sich anspruchsvollen Leguminosen

auch auf leichtem Sand ohne allen Humus und organische Düngung, sobald nur für mineralische Nährstoffe gesorgt ist, cultivirbar sind.

Eine vollständige Aufklärung der Art und Weise, wie der Symbiosepilz eingreift, ist durch Vorstehendes noch nicht gewonnen. Wohl aber werden diese Mittheilungen dazu beitragen, der einseitigen Auffassung zu begegnen, durch die man mit den hier vorliegenden complicirten biologischen Verhältnissen kurz sich abzufinden in Gefahr kam, und durch welche auch dem praktischen Ackerbau Irrthümer drohten.

Der Gegenstand wird unter Beigabe der erforderlichen Abbildungen und Analysen in weiterer Ausführung, namentlich auch bezüglich des Vorkommens des Knöllchenmicrobs in den verschiedenen Ackerböden, demnächst in den Landwirthschaftlichen Jahrbüchern veröffentlicht werden.

Pflanzenphysiologisches Institut der Königl. landwirthschaftlichen Hochschule zu Berlin.

45. N. Tischutkin: Die Rolle der Bacterien bei der Veränderung der Eiweissstoffe auf den Blättern von *Pinguicula*.

Eingegangen am 21. October 1889.

Auf Anrathen von Prof. A. BATALIN experimentirte ich im Sommer dieses Jahres an einer insectenfressenden Pflanze — nämlich an *Pinguicula vulgaris* L.

Diese Pflanze ist in die Zahl der insectenfressenden Pflanzen von DARWIN eingereiht worden, denn derselbe hat gezeigt, dass auch *Pinguicula vulgaris*, gleich anderen insectenfressenden Pflanzen, wie z. B. *Dionaea muscipula* Ell., *Drosera rotundifolia* L., auf der Oberfläche ihrer Blätter einen sauren Saft abscheidet, welcher die Eigenschaft besitzt, Eiweiss, Gelatine und Knorpel zu lösen.

Zur Entscheidung der Frage, auf welche Weise die Auflösung erfolgt, stellte DARWIN folgenden Versuch an.¹⁾ Er legte auf die

1) CH. DARWIN. Insectenfressende Pflanzen. Aus dem Englischen übersetzt unter der Redaction von A. T. II. u. III. Lieferung. 1876—1877. S. 298 u. w. (Russisch.)

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

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

Jahr/Year: 1889

Band/Volume: [7](#)

Autor(en)/Author(s): Frank B.

Artikel/Article: [Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. 332-346](#)