

Die Wurzelknöllchen der Lupine

Von HERBERT VIERMANN, Königsberg (Pr.)

Mit 29 Figuren auf einer Tafel

Historischer Teil

Durch die klassischen Untersuchungen von DE SAUSSURE (1804) und von BOUSSINGAULT (1806), deren Arbeiten LAWES, GILBERT und PUGH (1861) fortsetzten, wurde der exakte Nachweis erbracht, daß keine Pflanze freien Stickstoff zu binden vermag. LIEBIG sowie PASTEUR hatten die Assimilation von ammoniakalischem Stickstoff, Nitriten, Nitraten, Ammoniumsalzen und deren organischen Bindungen nachgewiesen, der freie Luftstickstoff dagegen war als für Aufnahme durch die Pflanze ungeeignet befunden worden. Mit dieser Tatsache ließ sich die sehr alte Erfahrung der praktischen Landwirtschaft nicht ohne weiteres in Einklang bringen, daß Hülsenfrüchte eine Stickstoffdüngung entbehren können, was bereits PLINIUS und COLUMELLA bekannt gewesen sein soll. Durch die praktischen Erfahrungen von SCHULTZ-LUPITZ, der die Hülsenfrüchte überhaupt als „Stickstoffsammler“, gegenüber den übrigen Pflanzen, den „Stickstoffressern“, unterschied, wurde die Unmöglichkeit, diese Beobachtungen durch günstige physikalische Veränderungen des Bodens, Beschattung u. dgl. mehr zu erklären, immer offener. Waren die bei den Leguminosen auftretenden Wurzelanschwellungen zwar schon lange bekannt, so versuchte man es jetzt, diese in irgendeine Beziehung zu dem unauferklärten Verhalten der Hülsenfrüchte zu setzen. Hiermit setzte eine sehr intensive Forschungstätigkeit ein, die die Wurzelknöllchen zum Ausgangspunkt nahm.

Da es meiner Erfahrung nach an einer vollständigen und kritischen Zusammenstellung dieser so wichtigen und viel bearbeiteten Probleme mangelt, habe ich mich der Aufgabe unterzogen, soweit es in meinen Kräften stand, alles Erreichbare nicht nur zu sammeln, sondern kritisch zu sichten, um einen Überblick über das tatsächlich bisher Erreichte geben und aus ihm heraus die noch offenen Probleme entwickeln zu können. Vielfach habe ich ausgedehnte Untersuchungen unternommen, nur um mir ein Bild aus eigener Anschauung machen zu können, das nicht aus der Literatur, allein ihrer Widersprüche wegen, gewonnen werden kann.

Ich hoffe, auch dadurch dem künftigen Bearbeiter der Probleme einen brauchbaren Rückblick geliefert zu haben.

Als erster wird DELÉCHAMP (1586) (1) genannt, der die Knöllchen als normale Bildungen der Wurzel, und zwar als Auswüchse des Wurzelgewebes ansieht. MALPIGHI¹⁾ (1666) (2) dagegen sieht in ihnen Insekten-

¹⁾ *Harum interiora tenent utriculorum ordines, viridem referentes colorem, per longum statuti. Interdum perforatas vidi hasce Gallas: et adhuc dubito, an a condito interius verme, an ab exteriori animalculo ingressum teneant.*

gallen, obwohl er weder ein Ei noch eine Larve beobachtet hatte. Nach BIVONA (1816) (1) sind die bei *Lotus* und *Medicago* beobachteten Knöllchen Sklerotien, dementsprechend benennt er sie auch. Derselben Ansicht ist PERSOON (1818) (3), der das „*Sklerotium rhizogonum*“ beschreibt, ihm schließt sich FRIES (1821) (1) an, der beobachtet haben will, daß diese Sklerotien der Wirtspflanze keine Nahrung liefern. DE CANDOLLE (1825) (3) hält die Knöllchen für krankhafte Auswüchse und spricht von ihnen als von „Tumeurs morbides“, wengleich sie anfänglich zwar kleine Schwämme, gleich einem Sklerotium zu sein schienen, während TRICHINETTI (1837) (1) glaubt, es seien Abortivknospen einer verborgenen Frucht („gemme abortive di frutti latenti“). CLOS (1848) (3) ist der einzige, der sie als Lenticellen anspricht, während TULASNE (1851) (1) sich DE CANDOLLES Ansicht anschließt. GASPARRINI (1851) (2) betrachtet die Wurzelknöllchen als „Schwammknöllchen“ (tubercoli spongiolari), „die zur Aufsaugung der Nahrung aus dem Boden bestimmt sind“. Einzigartig ist die Ansicht von TREVIRANUS (1835) (4), die Knöllchen sind nach ihm „unvollkommene Knospen mit knolliger Grundlage“, deren Weiterentwicklung gewöhnlich nicht stattfindet, die jedoch imstande sein sollen, gegebenenfalls neue Pflanzen hervorzubringen. TREVIRANUS führt dabei *Arachis hypogaea*, *Vicia amphicarpa* u. a. als Beispiel an. Er sagt aber: „Dabei ist der Umstand nicht außer acht zu lassen, daß Knöllchenbildung und unterirdische Früchte nicht leicht sich zusammenfinden, vielmehr auf gewisse Weise einander zu ersetzen scheinen.“ KOLACZECK (1856) (1) dagegen hält die Behauptung aufrecht, die Knöllchen seien Schwammwurzeln, während LACHMANN (1858) (2) die Vermutung äußert, daß sie als normale Organe der Pflanze zur Aufspeicherung von Reservematerial dienen.

Waren die bisher aufgeführten Ansichten im großen und ganzen gelegentliche Besprechungen, so war WORONIN (1866) (5) der erste, der eine eingehendere Untersuchung der Wurzelknöllchen vornahm. Die Knöllchen bestehen seiner Meinung nach aus einem Parenchymgewebe, das zwei deutlich verschiedene Schichten aufweist. Das innere Gewebe führt Zellen mit dichtem Plasma, das äußere weist nur Zellen mit wenig Plasma auf. Diese beiden Schichten nennt WORONIN inneres und äußeres Parenchymgewebe. Zwischen den beiden Geweben ziehen sich Gefäßbündelstränge hin, die regelrechte Verzweigungen des Zentralgefäßbündels der Wurzel sind. Das Wachstum des Knöllchens beruht auf der Teilung der „Vegetationsschicht“, der äußersten Zellen des inneren Parenchymgewebes. Da WORONIN in den älteren Zellen des „inneren Parenchyms“ sehr viele bakterienähnliche Körperchen fand, die sich, aus den Zellen durch Ausdrücken in Wasser befreit, sofort oder mitunter erst nach einigen Stunden frei bewegten, so äußerte er die Vermutung, daß diese bakterienähnlichen Körper die Knöllchenbildung hervorrufen könnten. Über die Art oder die Zugehörigkeit dieser Körperchen äußerte er sich aber nicht abschließend.

1874 erschienen die systematischen Untersuchungen ERIKSSONS (6). Ich habe die Originalarbeit nicht einsehen können und stütze mich auf das Referat sowie auf an anderen Orten vorkommende Besprechungen der Arbeit. ERIKSSON untersuchte die Knöllchen von *Faba vulgaris* (*Vicia faba*). Die Anlage des Knöllchens geht in den innersten Rindenzellen vorstatten. Diese füllen sich stark mit Plasma und vermehren sich schnell durch nicht sehr regelmäßige Teilungen. An diesen Stellen beobachtete ERIKSSON ungeteilte „Hyphen“, die

von außen her, quer durch die Zellwände hindurch, auf die Knöllchenanlage zuwachsen, in der sie sich in feinen, aber unregelmäßig dicken Fäden verzweigen. Die äußeren Zellen des entstehenden Knöllchens bilden nach Art eines Kambiums nach außen hin die fünf bis zehn Zellschichten dicke Knöllchenrinde, nach innen zu das „innere Parenchym“ mit um das Zentrum herum angelegten Fibrovasalsträngen. In den älteren Zellen des Knöllchens fand ERIKSSON keine Hyphen, er beobachtete hier vielmehr nur die WORONINSchen Körperchen. Die Ursache der Knöllchenbildung seien die oben erwähnten „Pilzhypphen“.

DE VRIES (7) gibt eine Beschreibung der Knöllchen und hält sie für adventive Sprosse, da sie nicht in der normalen Reihenfolge der Nebenwurzeln angelegt werden. Er hebt den hohen Eiweißgehalt der Knöllchen hervor und beobachtet, daß nach einer deutlichen Differenzierung in eine kleinzellige Rindenschicht und ein großzelliges Mark, sowie nach Ausbildung der im Kreise gestellten Gefäßbündelanlagen sich das Eiweiß auf die meristematische Spitze und die Gefäßbündel beschränkt, während das übrige Gewebe mit Stärkekörnern dicht erfüllt ist, die „in dem Maße, wie die Stärke zum Wachstum der Zellhäute verbraucht wird“, erst im hinteren, dann auch aus den mittleren Teilen verschwinden. „Dagegen füllt sich um diese Zeit das ganze Markgewebe allmählich wieder mit Eiweiß.“ DE VRIES hat zwar „sowohl bakterienähnliche Gebilde, als auch Pilzhypphen in den Knöllchen beobachtet, hat sich aber nicht überzeugen können, daß sie „zu der Entstehung der Knöllchen in ursächlicher Beziehung stehen“. Er hält sie im Gegenteil für „nachträglich eingedrungen“. Infolge des regelmäßigen Vorkommens bei zahlreichen Papilionaceen und ihrer Anwesenheit in allen Entwicklungsstadien der Pflanze ist er der Meinung, daß die Knöllchen einfach verdickte adventive Wurzelzweige mit beschränktem Längenwachstum sind. Da nach der ersten Entleerung von Eiweiß während des Knöllchenwachstums die Pflanze neues Eiweiß im „Mark“ bildet und speichert, hält er diese „mikrochemisch“ nachgewiesene Produktion und Ablagerung von Eiweiß für eine der wesentlichsten Funktionen der Wurzelknöllchen. „Und daß der Zweck dieser Ablagerung der Verbrauch an anderen Orten des Pflanzenkörpers sein muß, daran kann schon deshalb nicht gezweifelt werden, weil das Eiweiß in den Knöllchen keine Verwendung finden kann.“ Diese Neubildung von Eiweiß in einem ausgewachsenen Markgewebe hält DE VRIES für eine isoliert dastehende Erscheinung.

Die von ERIKSSON beschriebenen Fäden hat KNY (1878) (8) ebenfalls gefunden. Er ist aber der Ansicht, daß diese Pilzhypphen rein protoplasmatischen Ursprunges sind, da es ihm nicht gelungen ist, eine Membran zu beobachten, noch diese durch Anwendungen von Reagenzien nachzuweisen. KNY stimmt mit ERIKSSON darin überein, daß die Knöllchen durch Parasiten verursachte krankhafte Bildungen sind, er hält den Parasiten für einen Myxomyceten, verwandt der *Plasmodiophora Brassicae*. Die WORONINSchen Körperchen deutet er als Sporen des parasitischen Plasmodiums, das die Knöllchen entstehen läßt. Über die Art der Sporenbildung etwas auszusagen, unterläßt jedoch KNY.

In demselben Jahre berichtet FRANK (9), daß er die Pilzhypphen allgemein, mit Ausnahme von *Lupinus*, in den Knöllchen sämtlicher Leguminosenpflanzen angetroffen hat. Er beobachtete, daß im Knöllchenmeristem viele Hyphen und wenig Bakterienkörperchen, in den älteren Knöllchenteilen dagegen fast ausschließlich Bakterienkörperchen vorkommen, was ERIKSSON bereits bemerkt hatte:

die Fäden seien als wirkliche „Pilzhypphen“ anzusehen, die in ihrem Verlaufe feinere Auszweigungen austreiben. Die Form und Dicke dieser letzten Verzweigungen ist nach ihm den WORONINSchen Körperchen ähnlich, so daß er zu der Annahme geführt wird, daß diese Körperchen durch Abschnürung, ähnlich den Conidien, und durch weiteren Zerfall der einzelnen Glieder entstehen. Er sieht diese also als „Sproßzellen“ eines Hyphomyceten an, dem er den Namen „*Schinzia Leguminosarum*“ gibt. Hervorzuheben ist ferner, daß FRANK als erster versuchte, sich experimentell Klarheit über die Wurzelknöllchen zu verschaffen. Er zog in sterilen Nährlösungen sowie in ausgeglühter Erde, die er später mit einer sterilen Abkochung von Pferdemist begoß, Erbsenpflanzen. Die Ergebnisse waren jedoch nicht eindeutig, die sterilen Wasserkulturen sowie die Parallelversuche in nichtsterilem Wasser zeigten eine gleichgroße Anzahl infizierter und nichtinfizierter Pflanzen, während die Erbsen in der vorher ausgeglühten Erde keine Knöllchenbildung zeigten. FRANK schloß aus diesem Ergebnis, „daß an der Entstehung der Knöllchen irgendein im Erdboden lebendes Mikrob, das durch Erhitzen abgetötet wird, beteiligt ist“. Er wies ferner darauf hin, daß alle Arten der Leguminosen, auch die ausländischen, unabhängig von der geographischen Verbreitung, den Bodenarten und den natürlichen Standortverhältnissen, diese Knöllchenbildung zeigen. Daraus ginge hervor, daß es sich hierbei nicht um einen „gewöhnlichen Parasitismus“ handle, da man an eine „ubiquistische und konstante Verbreitung der Keime dieser Parasiten“ glauben müßte, „wie sie bei anderen pflanzenbewohnenden Schmarotzern nicht stattfindet“.

Der bisher vorherrschenden Ansicht ERIKSSONS stimmt PRILLIEUX (10) in vielen Punkten bei. Er legt die Entstehung, wie ERIKSSON, in die inneren Rindenschichten und betont, daß die Knöllchen infolge des Entstehungsortes und der anatomischen Verhältnisse als von den Seitenwurzeln durchaus verschiedene Bildungen anzusehen seien. Die Entstehung erfolge durch Parasiten, die er, wie KNY, zu den Myxomyceten rechnet, nahe verwandt mit *Plasmodiophora Brassicae Woronin*. Die stark glänzenden, sich verzweigenden Plasmodienstränge verwandeln sich nach erheblichen Anschwellungen auf allerdings nicht näher angegebene Art in die WORONINSchen Körperchen. Dadurch, daß PRILLIEUX keine Eigenbewegung dieser wahrnehmen können, wie WORONIN sie beobachtete, und durch das Auftreten von verzweigten Formen sei es klar erwiesen, daß Bakterien nicht in Frage kommen können.

Die Behauptung FRANKS (9), daß es sich bei den Leguminosen um keinen Fall von gewöhnlichem Parasitismus handeln könne, wird durch SCHINDLERS Vermutung (1884) (11) dahin erweitert, daß es sich hier nicht um „krankhafte Auswüchse“, sondern um Erscheinungen der Symbiose handeln könne. „Sie (die krankhaften Auswüchse) gehören vielmehr zum normalen Bau der Pflanze, und schon aus diesem Grunde können die darin beobachteten Organismen mit Parasiten im gewöhnlichen Sinne nicht identifiziert werden“. Am nächsten liege wohl die Annahme, daß man es hier mit einer Erscheinung der Symbiose zu tun habe. Auch sei es nicht unmöglich, daß die fraglichen Organismen in irgendwelcher Beziehung zur Stoffbildung und Stoffwanderung im Knöllchen stehen; wenigstens sei es schwer denkbar, daß die Sproßzellen, die in so ungeheuren Mengen die Zellen des zentralen Parenchyms erfüllen, ohne Einfluß auf die genannten Prozesse sein sollten“. Den Grund zu dieser Annahme gibt SCHINDLERS Feststellung, daß in der Zeit der Blüte das „Maximum“ der

Knöllchenproduktion liegt, und daß in der Zeit der Fruchtreife „immer eine Anzahl Knöllchen eingeschrumpft oder vollständig durch Fäulnis ihrer Rinde zerstört ist“, selbst bei perennierenden Pflanzen. Bemerkenswert ist weiter in SCHINDLERS Arbeit, die sich im übrigen mit Versuchen, wie sie FRANK anstellte, beschäftigt, daß auch er die „Sproßzellen“ bei *Lupinus* fand, jedoch keine Fäden.

Wenn auch bisher keiner der Forscher den exakten Nachweis zu erbringen vermochte, daß „die Pilzhypen“ oder die WORONINSchen Körperchen die Knöllchenbildung veranlassen, so war doch bisher die herrschende Ansicht die, daß die beobachteten Erscheinungen in irgendeinem genetischen Zusammenhang mit der Knöllchenbildung stehen müßten. Dieser Ansicht trat BRUNCHORST (12) entgegen, dessen Standpunkt sich in mancher Hinsicht mit dem von DE VRIES (7) eingenommenen deckt. Infolge der oft beobachteten Tatsache, daß die, wie BRUNCHORST selbst zugibt, „unzweifelhaften Pilzhypen“ bei mehreren Pflanzen, wie *Lupinus*, *Phaseolus multiflorus* u. a., fehlen, beziehungsweise seltener beobachtet werden, wie bei *Phaseolus vulgaris*, kann BRUNCHORST nicht die Überzeugung gewinnen, daß diese Hypen mit den Knöllchen in irgendeinem ursächlichen Zusammenhange stehen. Hervorzuheben ist hier allerdings, daß er sich in seiner Auffassung lediglich auf seine mikroskopischen Befunde bezieht, irgendwelche Versuche, die Infektion herbeizuführen, dagegen nicht angestellt hat. Er hält die Knöllchen für normale Bildungen der Leguminosenwurzel, die lediglich als Speicherung für Eiweißreservematerial dienen. Die „Bakteroiden“, wie er die WORONINSchen Körperchen als erster bezeichnet, entstehen nach ihm durch Differenzierung aus einem Teil des Zellplasmas, allerdings nur im jugendlichen Stadium der Knöllchen. Zur Zeit der Reife wird das ganze innere Gewebe, das Bakteroidengewebe, entleert, und er beobachtet, daß nur sehr desorganisierte Überbleibsel zurückbleiben. Da er in dieser Entleerung — und mit Recht — den normalen Abschluß der Knöllchenentwicklung sieht, so zieht er den nicht gerade zwingenden Schluß, daß „die Bakteroiden Gebilde sind, welche von der Pflanze selbst zu irgendeinem Zwecke erzeugt und nach Erfüllung ihres Zweckes wieder resorbiert werden“. Daß sich hieraus der Gedanke ergibt, daß die Knöllchen als normale Organe der Pflanze, ohne irgendeine Veranlassung durch fremde Organismen entstanden, anzusehen sind, liegt nahe.

FRANK (13) schloß sich vollständig den Ansichten BRUNCHORSTs an, durch die in seinem Institute angestellten Versuche BRUNCHORSTs sowie durch die kurz darauf veröffentlichte Arbeit TSCHIRCHs überzeugt. Er sieht damit analog Erlen- und Eläagnaceen-Knöllchen ebenfalls als „Protoplasmakörper der Baumwurzeln, welche als Organe für transitorische Eiweißaufspeicherung funktionieren“, an. Damit hatte FRANK seinen früheren Standpunkt (9) verlassen.

TSCHIRCH (14) unterscheidet zwei Arten von Knöllchen. Den einen Typus entwickelt er an den Lupinenknöllchen, den andern an *Robinia*. Die Unterschiede seien bereits in der Anlage entwickelt. Bei *Lupinus* stellen die Knöllchen „Anschwellungen des zentralen Wurzelbündels“ dar; diese Anschwellungen legen sich mantelartig um die Wurzel oder bilden durch unregelmäßiges Wachstum ein Knöllchen, durch das die Wurzel hindurchgeht. Bei *Robinia* dagegen sitzen die Knöllchen seitlich an der Wurzel an und haben naturgemäß ein größeres Ausdehnungsvermögen. TSCHIRCH gibt alsdann eine eingehende Schilderung des anatomischen Baues und findet die ersten Knöllchenanlagen bereits kurz nachdem die ersten Blätter entwickelt sind, also zu einer Zeit des intensivsten

Wachstums der Pflanze, in der diese schwerlich Übervorräte an Eiweiß anlegen könnte. TSCHIRCH stellt ebenfalls die vollständige Entleerung zur Zeit der Samenreife bei den einjährigen Pflanzen und ihren Beginn bei den ältesten Bakteroidenzellen fest, bei den perennierenden Pflanzen dagegen nur teilweise Entleerung. In der Tatsache der Entleerung sieht TSCHIRCH einen gewichtigen Grund gegen die „pilzliche Natur dieser Bildungen“, während die variable Form der Bakteroiden gegen ihre Bakteriennatur spräche. Den von früheren Forschern beobachteten „Sproßzellen“ oder „WORONINSchen Körperchen“ gegenüber nimmt er BRUNCHORSTS Ansicht an, daß diese durch Differenziation des Protoplasmas entstanden seien, ohne BRUNCHORSTS Vermutung, die Bakteroiden seien möglicherweise organisierte Fermente, beipflichten zu können, gestützt durch WIGANDS (15) „Anamorphose des Protoplasmas“, die „bekanntlich durchaus nicht als generatio aequivoca aufgefaßt wird“, wie TSCHIRCH sich ausdrückt. Er glaubt auf Grund des Verhaltens gegen Anilinfarbstoffe und Reagenzien diese Eiweißkörper in die Gruppe der Pflanzenkaseine stellen zu können und wendet gegen HELLRIEGELS Kulturversuche von Leguminosen in sterilen Böden, die ich unten zu besprechen haben werde, vor allem die Tatsache ein, daß HELLRIEGELS Annahme, die Bakteroiden seien Organismen, die daher außer im Knöllchen auch im Boden vorkommen müßten, durch die negativen Ergebnisse einer von ihm selbst versuchten Reinkultur auf Gelatineplatten vollkommen widerlegt sei. Interessant sind die Feststellungen, die er von den viel beobachteten Fäden macht. Durch Behandlung mit Jod erscheine eine hyaline Randpartie, die eine „durch die Reaktion körnig werdende zentrale Masse“ besitze. Die Fäden sitzen scheibenförmig verdickt auf den Membranen auf, meistens korrespondierend mit den Fäden der anliegenden Zellen. Jedoch sei es ihm nicht gelungen, in irgendeinem Falle das Hindurchgehen der Fäden durch die Membran zu beobachten. Die Tatsachen, daß die Fäden nicht überall vorkommen und nur in jugendlichem Stadium zu finden seien, später bei gleichzeitigem Erscheinen der Bakteroiden aufgelöst würden, ließen nur die Deutung als ein Vorläuferstadium der Bakteroidenbildung zu.

Diese Auffassung von den Knöllchen als normalen Organen für die vorübergehende Speicherung von Eiweißstoffen teilten BENECKE (17) sowie MATTIROLO und BUSCALIONI (18). Nach VAN TIEGHEM und DOULIOT (19) liegt der Ort der Entstehung im Perikambium, und zwar entstehen die Knöllchen vollständig analog den Seitenwurzeln. Im übrigen finden sich in diesen Arbeiten keine neuen Tatsachen.

Wie ich bereits oben erwähnte, waren von anderen Forschern abweichende Theorien über die Knöllchenentstehung und ihr eigentliches Wesen entwickelt worden. HELLRIEGEL (16) hatte Lupinen in sterilisiertem Boden gezogen und den einen Teil dieser Pflanzen mit einem wässerigen Bodenauszug versetzt, da er von der Annahme ausging, daß Organismen die Knöllchenbildung hervorriefen und daher auch im Boden vorkommen müßten; den andern Teil hielt er steril. Die Tatsache, daß der eine mit dem Auszuge versetzte Teil der Kulturen eine gute Entwicklung und Knöllchenansatz zeigte, während der andere kümmerete, auch keine Knöllchenbildung zeigte, ließ sich nicht durch alle von TSCHIRCH u. a. angeführten Momente mit der Reservespeicherung erklären, wenngleich auch andererseits für die Annahme der Beteiligung von Organismen die letzten zwingenden Beweise noch nicht erbracht waren. Es erschienen in der Folgezeit zahlreiche Arbeiten, die durch eingehende mykologische Forschungen

diese Annahme zu erhärten suchten. Es ist da zuerst WARD (20) zu nennen, der die Entwicklung der von ERIKSSON zuerst beobachteten Fäden bei *Vicia faba* genau zu verfolgen suchte. Es war von vielen Forschern gefunden worden, daß Leguminosen in Wasserkulturen keine rechte Knöllchenbildung zeigten, in der Mehrzahl der Fälle blieb diese sogar aus. Man erklärte sich diese Erscheinung teilweise mit der Veränderung, die die Wurzelgewebe in einer Wasserkultur erfahren mußten, teilweise mit einer gewissen „Indisposition zur Bildung der Knöllchen“. WARD zog nun Bohnen in Wasserkulturen, es gelang diese Indisposition dadurch zu beheben, daß er Schnitte alter Knöllchen an den jungen Wurzeln befestigte; es fanden sich an diesen Stellen Knöllchen. Durch verschiedene Versuchsreihen mit den Pflanzen, die er zum Teil erst in gewöhnlicher Gartenerde, einen anderen Teil in steriler Erde keimen ließ und dann beide in sterile Nährsalzlösungen übertrug, gelang ihm der Nachweis, daß nur die in durch keinen Eingriff veränderter Erde angelaufenen Pflanzen Knöllchenbesatz zeigten, die Veranlassung zu dieser Knöllchenanlage also in das Jugendstadium der Bohne zu legen sei. Es traten an diesem Zeitpunkte mit dünnen Membranen versehene Hyphen auf, die durch die Wurzelhaare in die Rinde eindringen und sich dort verzweigten. WARD hielt die Fäden für einen Pilz, den Ustilagineen verwandt, der infolge seiner parasitischen Lebensweise die Dauersporenbildung abgelegt hätte und sich durch Sprossung in Form von Sporulen, „den WORONINSCHEN Körperchen“, vermehre, die durch Fäulnis des Knöllchens wieder in den Boden gelangten. Eine Schädigung der Pflanze durch den Pilz, wie sie BRUNCHORST beobachtet haben will, hat WARD nicht konstatieren können, er nimmt im Gegenteil an, daß hier eine Erscheinung der Symbiose vorliege, wenngleich er diesen Gedanken auch nicht näher begründete.

Dieselbe Annahme spricht VUILLEMENT (21) aus. Das Eindringen der Fäden hat er nicht beobachten können, dagegen sieht er aus kugeligen Blasen der Hyphen Dauersporen („chronisporos“) sich entwickeln, während gleichzeitig Sporangien gebildet werden. Aus diesen sollen dann zahlreiche Zoosporen austreten, die eine Cilie besitzen, sich später wieder abrunden und zu Sporen werden. Er beschreibt den Pilz als Chytridiacee und gibt ihm den Namen *Cladochytrium leguminosarum*, da er mit Chlorzinkjod eine sich bläuende Membran an den Fäden gefunden hätte. Die Bakteroiden hält er dagegen für Plasmadifferenziationen. Den Entstehungsort der Knöllchen verlegt er ins Perikambium und spricht sie als metamorphosierte Seitenwurzeln an.

Die in demselben Jahre erschienene Arbeit LUNDSTROEMS (22) vertritt ebenfalls den Gedanken der Symbiose, spricht sich aber nicht darüber aus, ob nun die Pilze oder die Bakteroiden zu den Knöllchen in ursächlichem Zusammenhang stehen.

Das von den Gegnern der Symbiose hauptsächlich angeführte Moment, daß es bisher niemandem gelungen sei, die fraglichen Organismen irgendwie frei zu kultivieren, und damit einer der schwerwiegendsten Gegengründe, wurde durch BEYERINCKs (23) Arbeit beseitigt. Durch geeignete Entnahme an jungen Teilen des Bakteroidengewebes gelang es, Bakterien auf Gelatineplatten in Strichkulturen zu ziehen. Durch eine vorgenommene künstliche Infektion (24) wurden die letzten Bedenken beseitigt. Somit war klar der Beweis erbracht, daß die Knöllchen durch Infektion von *Bacterium radiciola* Beyerinck entstehen. Auf eine nähere Besprechung der bakteriologischen Seite des Problems in dieser und in folgenden Arbeiten muß ich, als außer dem Rahmen meiner Arbeit liegend,

verzichten. Die Knöllchen sind nach BEYERINCK metamorphosierte Wurzelorgane. Das Eindringen der Bakterien geschieht durch die „Spalten in der primären Rinde, welche bei der Seitenwurzelbildung entstehen“, und zwar sieht BEYERINCK als wahrscheinlich an, daß die Papilionaceenwurzeln gewisse Stoffe in den Boden ergießen, die die Bakterien anlocken. Von hier aus werden die „nächsten rhizogenen Zellen infiziert“ (S. 156). „Eben wie die Initialen für die primäre Seitenwurzelbildung, selbst bei der nämlichen Pflanze, verschieden sein können, so sei es für die Knöllchen: Je näher der Spitze der Tragwurzel, desto mehr sind die Rindenzellschichten außerhalb des Perikambiums befähigt, sich an der Neubildung zu beteiligen; fern vom Vegetationspunkte fungiert nur das Perikambium allein.“ „Die Bakteroiden (BEYERINCK übernimmt diese Bezeichnung von BRUNCHORST) sind geformte Eiweißkörperchen, welche die Pflanze zum Zwecke einer lokalen Eiweißanhäufung aus *Bacterium radicum* züchtet.“ Er sagt weiter, daß diese Bakteroiden also Organe des pflanzlichen Protoplasmas wären, die aus eingewanderten Bakterien entstanden sind, näher spricht er sich leider nicht über die Umwandlung aus, er konstatiert dagegen mehrere Male, daß diese Bakteroiden die Fähigkeit, sich zu vermehren, verloren hätten. Die normale Entwicklung sei die, daß die Pflanze vollkommen die Bakteroidenzellen auflöste, jedoch beobachtet er Fälle, in denen die Bakterien überwuchern; hierbei findet er neben vermehrungsfähig und unverändert gebliebenen Bakterien „Bläschenbakteroiden“. Einzigartig ist seine Stellung zu den Schleimfäden, die im allgemeinen nur im Knöllchenmeristem und in jungen Knöllchen vorkommen, bei *Lupinus*, *Phaseolus* u. a. aber fehlen. Auf Grund ihres Färbungsvermögens bestehen sie „aus Chromatinsubstanzen, zum geringen Teile aus nicht färbbarem Kern- und Cytoplasma; selten ist daran eine Zellulosewand bemerkbar“. Diese Fäden seien Überbleibsel der „Kerntonnen“, die nach beendigter Zellteilung nicht vollständig zu dem Cytoplasma und dem Kerne zurückwandern. Die Infektion von Zelle zu Zelle sei ermöglicht durch die geringe Größe der Bakterien (0,9 μ Länge bei 0,18 μ Dicke bei *Vicia faba*), so daß diese Schwärmer „Löcher (an anderer Stelle sagt er, daß er an die HEITZMANNschen Löcher denke), nicht geräumiger als NEWTONS erster Farbenring (ca. 0,16 μ), passieren können“. „Diese Beobachtung scheint mir die Notwendigkeit der Annahme, daß *Bact. radicum* in die geschlossenen Perikambiumzellen der Papilionaceenwurzeln einzudringen vermag, ohne irgendeine Läsion zu verursachen oder vorzufinden, sehr zu erleichtern.“

Seit SCHINDLER (11) war, obwohl von vielen sehr bekämpft, immer wieder die Vermutung ausgesprochen worden, daß bei den Leguminosen eine Form von Symbiose vorliege. Diese Annahme basierte lediglich auf der Tatsache, daß die Pflanze besondere Gewebe für den Eindringling anlege, daß eine bedeutende Anwesenheit von Kohlehydraten und noch mehr von Eiweiß in den Knöllchen konstatiert wäre, und daß im großen und ganzen die Entleerung entweder periodisch oder zu einer bestimmten Zeit erfolge. HELLRIEGEL (25) hatte bei angestellten Versuchen gefunden, daß knöllchentragende Erbsen, in reinem Sande mit nur Spuren von Stickstoff, dagegen mit genügendem andern anorganischen Nährmaterial gezogen, eine durchaus normale Entwicklung zeigten, während knöllchenfreie Pflanzen unter denselben Bedingungen kümmernten; wurden die knöllchenfreien Pflanzen mit etwas natürlichem Erdboden geimpft, so entwickelten sich die Pflanzen nach einer typischen Hungerperiode unter Bildung von Knöllchen normal weiter. Diese und ähnliche Beobachtungen veranlaßten ihn, die Hypothese

aufzustellen, daß der im Boden lebende Pilz die Verwertung des atmosphärischen Stickstoffes ermögliche. HELLRIEGEL setzte seine Versuche fort (26) und kam, zusammen mit WILFARTH (27), auf Grund vielseitiger Kulturergebnisse zu dem Schluß, daß die Leguminosen ihren Stickstoffbedarf nicht allein aus dem Boden, sondern auch zu einem erheblichen Teile aus der Atmosphäre entnehmen. Diese Fähigkeit käme jedoch nicht ihnen zu, sondern sei auf Vermittlung der durch gewisse Bodenorganismen entstandenen Wurzelknöllchen zurückzuführen. Die Aufnahme dieser Schlußfolgerungen war geteilt. Bereits TSCHIRCH (14) hatte sich gegen HELLRIEGEL gewandt, desgleichen konnte FRANK in zahlreichen Veröffentlichungen (28, 29 u. a.) sich nicht damit einverstanden erklären. FRANK führt die seiner Ansicht nach noch nicht bewiesene Gegenwart von Mikroorganismen in den Knöllchen an (29), ferner eigene Versuche (28), die ergeben sollten, daß sich durch die Sterilisation des Bodens die Knöllchenbildung nicht bei sämtlichen Leguminosen unterdrücken lasse.

FRANK wandte ferner ein, daß die Fähigkeit der Assimilation von atmosphärischem Stickstoff auch andere grüne Pflanzen (30), vor allem in späterer Lebensperiode, mit kräftigeren Assimilationsorganen (28) besitzen, diese Funktion sei an das Plasma der Chlorophyll-tragenden Pflanzen gebunden. Auch bestände durch die Infektion mittels eines wässrigen Bodenausguges — „selbst bei Annahme einer von außen erfolgenden Infektion“ — die Möglichkeit, daß „neben den Infektionsorganismen eine Menge anderer Organismen in den Boden“ hineingelange, die „durch fermentative Prozesse“ den durch die Sterilisation geschädigten Boden für die Leguminosen wieder instand setzen könnten, so daß die Pflanze sich selbst durch ihre Assimilation aus der Hungerperiode heraus günstig entwickeln könne (29). Gegen HELLRIEGEL wandte sich auch DELPINO (31), allerdings hat dieser nur einen Versuch mit *Galega officinalis* angestellt, so daß dieser Arbeit schon infolge einer sehr mangelhaften Versuchsanstellung kein großes Gewicht beizulegen ist.

BEYERINCK hatte durch Untersuchung seiner Knöllchenbakterienkulturen (23) anfänglich nicht nachweisen können, daß sein *Bacillus radicola* freien Stickstoff binde, es gelang ihm nur der Nachweis, daß die Kulturen mit Kohlehydraten und Asparagin sehr üppig wachsen, also Asparagin zu Eiweiß umzuwandeln vermögen. Später (24) bestätigte er, wohl durch BERTHELOTs (32) Versuchsergebnisse, daß durch Bodenmikroben eine Stickstoffanreicherung im Boden, wenn auch in sehr langsamer Bildung, stattfände, bestimmt HELLRIEGELs Ergebnisse. Der erste, der tatsächlich HELLRIEGELs Methodik und Versuchsergebnisse eingehend nachprüfte, war PRAZMOWSKI (33). Im physiologischen Teile seiner Arbeit kommt PRAZMOWSKI zu dem Schluß, daß „die Wurzelknöllchen für die Leguminosen sehr nützliche Organe sind, demnach in die Reihe der symbiontischen Bildungen gehören“. Diese Symbiose kennzeichnet sich dadurch, daß die Bakterien sich durch die von der Pflanze herangeschaffte Nahrung sehr stark vermehren und „dann sowohl in der Vegetationsperiode der Pflanze (falls die Knöllchen durch Insekten und dergleichen beschädigt werden), als namentlich nach deren Tode in vermehrter Anzahl in den Boden wieder gelangen“ — analog der „Bakterienüberwucherung“ BEYERINCKs — während andererseits die Pflanzen unter dem Einfluß der Bakterien die Befähigung erlangen, den atmosphärischen Stickstoff zur Ernährung zu verwenden. Die Resorption der Bakterienkörper stelle dasjenige Mittel dar, durch welches die Pflanzen mit dem atmosphärischen Stickstoff ernährt würden. Hinsichtlich

der Aufnahme des Stickstoffs durch die Bakterien sagt PRAZMOWSKI, daß „die zur Zeit erlangten Resultate im allgemeinen in dem Sinne“ ausgefallen seien, „daß bei Mangel anderer, günstigerer Stickstoffnahrung die Knöllchenbakterien den elementaren Stickstoff der Atmosphäre als Nahrung aufzunehmen vermögen“.

PRAZMOWSKI hatte im ersten Teile seiner Arbeit die Resultate BEYERINCKs durch Plattenkulturversuche mit Knöllchenausstrichen nachgeprüft und war zu denselben Ergebnissen wie dieser gekommen. Er stellt im weiteren fest, „daß die Knöllchenbakterien unter dem Einflusse der Pflanze eine Reihe von sukzessiven Veränderungen erleiden, welche mit einem Wechsel der Gestalt und Abschwächung der Vegetationskraft beginnen und mit einer vollständigen Degeneration und Umwandlung der Bakterienkörper in besondere Eiweißsubstanzen abschließen“. Die Infektion beobachtet er bereits in den ersten Tagen nach Entwicklung der Keimblätter. Er fand Klümpchen von Bakterien den Wurzelhaaren vorgelagert und zum Teil bereits in die Epidermiszellen eingedrungen. Es entwickelte sich in den Wurzelhaaren ein glänzender Faden, der mit Spitzenwachstum das sich krümmende Haar bis zur Innenwand durchwuchs, dort sich verbreiterte und der Membran anlegte, diese durchbohrte, sich ein wenig zwischen beiden Zellmembranen erweiterte, die Zellwand der Nachbarzellen durchwuchs und in verhältnismäßig gerader Richtung über den Zellkern hin zur nächsten Zellwand sich erstreckte. Die durchwachsenen äußeren Rindenzellen ändern sich in ihrem Zustande nicht, erst die inneren füllen sich mit Plasma, und es setzt eine sehr lebhaftete Teilung ein. Diese „vier oder fünf innersten Rindenschichten“, welche sich in dieser Weise vermehrt haben, bilden die Grundlage des im Entstehen begriffenen Knöllchens. Die Bakterien-schläuche erweitern sich in diesen Meristemzellen, platzen schließlich und entlassen die in ihnen enthaltenen Bakterien in das Zellplasma. Dem Orte der Entstehung, dem Fehlen von Wurzelhaaren, der Ausbildung einer eigenen Korkhülle und der eigentümlichen Anordnung der Fibrovasalbündel nach hält PRAZMOWSKI die Wurzelknöllchen für „eigene Organe der Wurzel, die unter dem Einfluß bestimmter Bakterien hervorgebracht werden und deren Struktur den besonderen Zwecken ihrer Entstehung angepaßt ist“. BEYERINCKs Auffassung, daß die Bakterien unsichtbare Poren durchdringen, vermag er sich nicht anzuschließen. Denn wenn es auch BEYERINCK nicht gelungen wäre, die Auflösungs-fähigkeit von Zellulose durch Knöllchenbakterienkulturen nachzuweisen, so hätte man es hier in jugendlichen Stadien (und nur solche würden infiziert) doch noch nicht mit „chemisch metamorphosierten und namentlich verkorkten Membranen“ zu tun. Er ist auf Grund seiner mikroskopischen Befunde der Ansicht, daß die Bakterien zu ihrem Schutze vor dem „schädigenden Einfluß des Plasmas“ selbst die Schläuche erzeugen. Durch das starke Zellwachstum würden sie dann später gedehnt und platzen schließlich. PRAZMOWSKI hat zwar die Eigentümlichkeit der Bakterien, Fäden zu bilden, in seinen Kulturen beobachtet, auch gesehen, daß die Fäden anderen Charakter und andere Konsistenz besitzen als die in der Pflanze vorkommenden, ist aber trotzdem der Ansicht, daß diese Änderung durch die gänzlich anderen Bedingungen in der Pflanze verursacht sein können.

Die Beschreibung der Entleerung weist keine neuen Beobachtungen oder Ansichten auf, außer daß die nicht geplatzenen „Hyphen“ die Entleerung der Knöllchen überdauern, zu wachsen beginnen und die Zellen füllen. Der Zeitpunkt der Entleerung hänge ganz von den näheren Bedingungen ab, unter

denen die Pflanzen wachsen und sich ernähren; in fruchtbarem Gartenboden zeigen die Knöllchen erst zur Zeit der Blüte an ihrer Basis Entleerungserscheinungen, während auf sehr stickstoffarmen Sandböden die Entleerung bereits einsetzt, wenn die Knöllchen eine gewisse Größe erreicht haben. Die Pflanze greife demnach ihre Eiweißvorräte in den Bakteroiden „nicht nur zur Samenreife, als der Zeit größten Eiweißbedarfes“, sondern bereits zu ihrem Wachstum an, so daß diese frühzeitig entleerten Knöllchen „meistenteils in der Entwicklung sehr zurückbleiben“.

In demselben Jahre erschien nach einer vorher ergangenen vorläufigen Mitteilung (34) eine größere Arbeit FRANKs (35), in der er in den meisten Punkten seine früheren Ansichten ändert.

Er bestätigt BEYERINCKs „*Bacillus radicolica*“ als den Urheber der Papilionaceenknöllchen, nennt ihn aber *Rhizobium Leguminosarum*, an welchem Namen er trotz wiederholten Hinweises anderer Forscher, so u. a. von MÖLLER (36), festhält. Er stellt zwei Formen der Infektion fest, die Einwanderung mittels Infektionsfäden und die Einwanderung ohne Infektionsfäden. Bei der erstgenannten Form betrachtet FRANK den in den Wurzelhaaren und äußeren Rindenschichten auftretenden Faden als das Primäre, die einsetzende Vermehrung der inneren Rindenschichten, die eigentliche Knöllchenbildung, als das Sekundäre. War bisher eine Art Spitzenwachstum der Fäden behauptet worden, so glaubt FRANK dies ganz und gar nicht beobachtet zu haben. Ich möchte seine eigenen Worte hier anführen: „Seine Endigung zeigte nun aber nicht die Erscheinung einer wachsenden Pilzfadenspitze: anstatt mit scharf abgegrenzter Kuppe zu endigen, schien er sich an dieser Stelle vielmehr durch allmähliche Ansammlung von Plasma des Wurzelhaares zu konstituieren. Er verlor sich hier allmählich in dem Plasma der Zelle, welches daselbst augenscheinlich reichlicher in einer die Richtung des Fadens fortsetzenden Partie sich sammelte, jedoch dabei noch die schwach lichtbrechende gewöhnliche Beschaffenheit des Wurzelplasmas besaß.“ „Ich sehe in ihm ein Gebilde der Pflanze, einen aus dem Zellprotoplasma aufgebauten Leiter, durch welchen die Pflanze selbst den Symbiosemikroorganismus, den wir in den kleinen Kokken vor uns haben, nach denjenigen Zellen führt, wo seine Entwicklung stattfinden soll.“ Den protoplasmatischen Ursprung weist er durch das Verhalten dieser Infektionsfäden gegenüber Reagenzien nach. „Mit dieser Erklärung (des protoplasmatischen Ursprungs) fällt auch sogleich eine Schwierigkeit hinweg, die sich bisher der Deutung des Pilzes entgegenstellte, und die darin lag, daß der Infektionsfaden bei gewissen Leguminosen, wie *Lupinus* und *Phaseolus*, regelmäßig fehlt. Ist er ein Organ der Pflanze, so kann und muß er fehlen, wo er nicht gebraucht wird, und letzteres ist dort auch wirklich der Fall, weil das Protoplasma seine Infektion schon in den äußersten Partien der Wurzeln direkt empfängt“. Die Infektion ohne Fäden erfolgt nach FRANKs Beobachtung bei der Lupine „nicht wie bei der Erbse in den tieferen Schichten der Wurzel, sondern unmittelbar unter der Epidermis“. Bisweilen wachsen die Bakterien aufnehmenden Zellen weit nach außen gegen die Infektionsstelle hin und schieben die über ihnen liegenden Epidermiszellen zur Seite, so daß die Bakterien direkt einwandern können. Ebenso wie die Pilzfäden sind nach FRANK auch die Bakteroiden protoplasmatischen Ursprungs. Die eingedrungenen Bakterien vermischen sich innig mit dem reichen Plasma und stellen das „Mycoplasma“ dar; die Pflanze bildet nun um die Mikroben herum die Bakteroiden aus Eiweißstoffen, die in

Form von Asparagin dem Knöllchen zugeführt würden (es war ihm gelungen, im Bakteroidengewebe selbst sowie in den Zuleitungsgeweben Asparaginkristalle durch Einwirkung von absolutem Alkohol zu erhalten). Bei der Entleerung würden aber nur die eigenen Eiweißstoffe verwertet, während die in ihnen eingeschlossenen Mikroben „unberührt“ die Pflanze wieder verließen. Diese Auffassung steht der BEYERINCKS, daß die Bakteroiden „geformte Eiweißkörperchen seien“, „die die Pflanze aus *Bacillus radiculicola* züchtet“, sowie der PRAZMOWSKIS, daß die Pflanze sich nach und nach der Bakterien bemächtigt und sich ihre Körpersubstanz zunutze mache, diametral entgegen. Ebenso wäre, nach FRANK, der Nutzen der Symbiose demnach ein ganz verschiedener für die Pflanze. Diese würde durch den Reiz des anwesenden Mikrobes in ihren gesamten Lebensäußerungen, wie Ausbildung der assimilierenden Organe, Assimilation, Stoffwechsel usw. sehr stark gekräftigt, damit setze eine vermehrte Aufnahme des atmosphärischen Stickstoffes durch die oberen Organe und dementsprechend ein höherer Eiweißgewinn ein, so daß auf Grund dieses Anreizes die Pflanze befähigt sei, auf stickstoffarmen oder -freien Böden kräftig zu gedeihen. FRANK erwähnt als Analogon hierzu u. a. die Wirkung von *Peronospora* auf Cruciferenblüten sowie die der Gallen, hält sogar die Betrachtung der Knöllchen als Galle auf Grund ihrer physiologischen Wirkung für berechtigt. Bei manchen Leguminosen, die auf Grund der Bodenverhältnisse auf keinen Anreiz angewiesen wären, sowie bei *Phaseolus*, bei der er eine Förderung der Entwicklung, „welche andere Papilionaceen der Symbiose verdanken“, nicht habe beobachten können, trete der Pilz nur als gewöhnlicher Schmarotzer auf. Die Bakteroiden hat FRANK außer in den Knöllchen in fast jedem Organ der Pflanze, wie Stempel, Blätter, ja sogar in einem Falle in den Kotyledonen des jungen, noch in Entwicklung begriffenen Embryos von *Phaseolus* gefunden, jedoch keine Bakterien, es sei aber anzunehmen, daß die Pflanze eine Totalinfektion erfahre. Hinsichtlich der bisher für jede Pflanze angenommenen eigenen Bakterienarten glaubt FRANK annehmen zu können, daß es sich nur um eine einzige Spezies handele, die mit jeder Leguminose in Symbiose treten könne; es sei aber nicht ausgeschlossen, „daß durch fortdauernde Wiederholung des Anbaues ein und derselben Leguminosenart auf einem Acker eine Rasse des *Rhizobium* gezüchtet wird, welche mit dieser Spezies leichter die Symbiose eingeht und größere Wirkung ausübt, als sie einer anderen Leguminosenspezies gegenüber anfänglich wenigstens vermag“.

FRANKS Deutung des protoplasmatischen Ursprungs der Fäden sowie der Bakteroiden konnten sich weder PRAZMOWSKI (33) (Nachtrag) noch BEYERINCK (37) anschließen, auch stellt letzterer fest, daß von einer Durchdringung der Pflanze mit den Bakterien nach seinen letzten Nachforschungen nicht die Rede sein könne, während BRÉAL (38) mit Kulturen von *Phaseolus* das nach FRANK bei dieser Pflanze lediglich parasitäre Verhalten der Bakterien widerlegt, mit anderen Versuchen wiederum die Ergebnisse PRAZMOWSKIS bestätigt. Ebenso konnte FRANK mit der bereits öfter behaupteten (siehe oben) Assimilation des atmosphärischen Stickstoffes durch die Pflanze, die er auf Grund der Differenz zwischen Boden + Ernte und Boden + Samen für erwiesen hielt, nicht durchdringen. MÖLLER (36) schloß sich zwar FRANKS Ansicht an, begründete dies aber nicht ausführlicher. Man hielt die von FRANK bisher geführten Beweise den in der Einleitung erwähnten klassischen Versuchen von DE SAUSSURE, BOUSSINGAULT u. a. gegenüber teils für nicht ausreißend genug (PRAZMOWSKI,

33, Nachtrag), teils wandte sich WAGENER (39), PFEIFFER und FRANKE (40) sowie AEBY (41) und NOBBE und HILTNER (42) gegen seine neueren Versuchsergebnisse (43) und gaben Arbeiten heraus, die FRANKs Behauptung nicht nur nicht bestätigten, sondern, wie NOBBE und HILTNER (42), auf BERTHELOTs (44) und WINOGRADSKIs Arbeiten hinwiesen, nach denen die Stickstoffbildung außer den Knöllchenbakterien im Boden selbst durch Mikroben erfolge. Der Stickstoffgewinn wurde ebenfalls durch die Arbeiten von SCHLÖSSING und LAURENT (51), LAURENT (52), ferner PETERMANN (53) festgestellt, sowie durch die praktischen Feldversuche von PROVE (54), SALFELDT (55) u. a. KOSSOWITSCH (56) gelang es durch Erbsenkulturen in Wasserstoff-, Sauerstoff- und Kohlensäureatmosphäre sowie durch Kulturen, deren ober- und unterirdische Teile getrennt mit stickstofffreiem Gasgemisch umgeben waren, die Stickstoffaufnahme durch die Wurzeln nachzuweisen. So zeigte z. B. eine 14 Tage mit ihren Wurzeln im freien Gasgemisch befindliche Pflanze typische Hungererscheinungen, Gelbwerden der älteren, dann der jüngeren Organe usw., ergrünte aber kräftig und erholte sich beim Durchleiten gewöhnlicher Luft durch die Erde. In der Frage des Ursprungs der Fäden und der Bakteroiden nahmen NOBBE, SCHMID, HILTNER und HOTTER (45) eine vermittelnde Stellung ein. Es wurden Erbsen mit Lupinenknöllchenbakterien geimpft — bei der Lupine war bekanntlich keine Fadenbildung bisher beobachtet worden —; es zeigten sich Fäden, auch wurden bei *Robinia* 2—3 dicht nebeneinanderliegende Bakterienreihen gefunden, die der Umhüllung entbehrten. Die Fadenmasse bilde sich also erst durch die vordringenden Bakterien, zwar aus dem Plasma des Wurzelhaares, aber erst auf Anregung der Bakterien, Fadenanlagen ohne Bakterien hätten sich nie gefunden. Daraus schlossen die Verfasser, daß die Fäden zwar plasmatischen Ursprunges seien, jedoch von einem Fangapparat im Sinne FRANKs nicht gesprochen werden könne. Ebenso könne, wie sie in einer weiteren Arbeit (46) darlegten, von einer planmäßigen Verteilung der Knöllchen nicht die Rede sein, die Knöllchen säßen unregelmäßig an der Wurzel verteilt, auch trete die Infektion stets nur, ohne Rücksicht auf das Alter der Pflanze, an jungen, noch mit Wurzelhaaren versehenen Wurzeln auf. Dagegen hätten sie, wie bereits frühere Forscher, bakteroidenähnliche Gebilde in derselben Größe auch außerhalb der Pflanze in Kulturen gefunden. Die Bakteroiden seien demnach aus den Bakterien hervorgegangen, stellten aber nicht ein einzelnes Bakterienindividuum, sondern einen kleinen zooglöartigen Verband dar. Nach ihren Erfahrungen wäre der Eiweißgewinn der Pflanze aus den Bakteroiden sehr gering, die Wirksamkeit der Knöllchen für die Pflanze zeige sich schon lange vor der Auflösung, daher sei „in der Hauptsache nicht durch die Resorption der Bakterien, sondern vielmehr durch deren Stoffwechselprodukte die Förderung der Leguminosen veranlaßt“.

Im folgenden Jahre (1892) gibt FRANK (47) zu, daß die Bakteroiden durch Degeneration aus den Bakterien entstanden seien. macht aber auf einen Dimorphismus der Wurzelknöllchen der Erbse aufmerksam, demzufolge eine kleinere Art von Knöllchen Bakteroiden aus Amylodextrin enthalten soll, die ebenfalls von der Pflanze resorbiert werden, jedoch in den meisten Fällen „schon frühzeitig mancherlei Tieren des Erdbodens zum Opfer fielen, während die Eiweißknöllchen entleert wurden“; „man könnte demnach versucht sein, solche Knöllchen als Köder für schädliche Tiere zu betrachten, welche dadurch von anderen Teilen der Wurzeln abgeleitet werden“. Diesen Dimorphismus wies

MÖLLER (36 u. 48) als unzutreffend zurück, das „Amylodextrin“ sei eine cholesterinartige Substanz, entstanden zu denken als eine Art fettiger Degeneration des Eiweißes der eingewanderten, dann durch die Hypertrophie in die Evolutionsform der Bakteroiden überführten, abgestorbenen Bakterien. An derselben Stelle (36) äußert sich MÖLLER über die Infektionsfäden. KOCH (49) hatte durch Reaktionen den Nachweis, der, wie KOCH mitteilt, auch PRAZMOWSKI persönlich überzeugte, erbringen können, daß die Membranwände der Fäden unzweifelhafte Zellulosenatur haben, ohne sich jedoch über die Herkunft der Fäden auszusprechen. MÖLLER nimmt nun den Standpunkt ein, daß die Fäden „reichverzweigte Arme einer eindringenden Bakterien-Zoogloä“ seien, die „als Fremdkörper infolge des geäußerten Reizes von dem Protoplasma der Pflanzenzellen durch eine Cellulosemembran eingeschlossen werden“. Da die Bakterien junge, chemisch unveränderte Zellulose zu durchdringen und zu lösen vermögen, so würden die Bakterien durch allmähliches Auflösen dieser Membran frei und könnten ins Zellplasma gelangen; daher wären in den älteren Knöllchen diese „Schläuche“ auch nicht mehr zu beobachten. Es wäre also die Pflanze, die diese Membran bilde, was durch NOBBE, SCHMID, HILTNER und HOTTERS oben erwähnten Versuch der Infektion von Erbsenwurzeln durch Lupinenknöllchenbakterien bestätigt würde. BEYERINCK (50) weist demgegenüber an dem Schleim von *Vicia lathyroides*-Kulturen ebenfalls die Zellulosereaktion nach, der Schleim sei als Hautschicht aufzufassen, da, wie es längst bekannt sei, der Schleim der Schleimbakterien überhaupt nur als stark gequollene Zellwand aufzufassen sei. Es sei ihm gelungen, durch Schieben und Drücken des Deckglases alle möglichen Gestalten der Fäden, wie sie in der Pflanze beobachtet worden seien, künstlich herzustellen; der Schleim würde beim Anhaften an der Zellwand durch das Wachstum sehr stark gedehnt, auch durch die Zellteilung geteilt, wodurch es zu erklären sei, daß die Fäden so außerordentlich oft auf die Kerne gerichtet seien. Die „Kerntonnen“ BEYERINCKs sind demnach als erledigt zu betrachten.

Hatte man bisher bei den Wurzelknöllchen eine gewöhnliche Korkhaut gefunden, die nicht nur den osmotischen Austausch von Flüssigkeiten, sondern auch den Gaswechsel unterbinden sollte, so gelang es jetzt FRANK (57), ein System von durch die Korkhaut und das Rindengewebe kontinuierlich hindurchgehenden Interzellulargängen nachzuweisen. Die Interzellularen beginnen an der freien Oberfläche und „dringen in radialer Richtung sowie auch seitlich zwischen die Zellen ein“. Das Bakteroidengewebe, mit Ausnahme des Meristems, ist ebenfalls mit Luftgängen durchzogen, jedoch das kambiale Gewebe, das die Rinde vom Bakteroidengewebe trennt, nur an sehr seltenen Stellen, so daß „eine regelmäßige Luftkommunikation zwischen innen und außen, infolge der im Kambialgewebe sehr seltenen Luftgänge nicht bedingt werden könne“. Gemäß seiner Anschauung von der Symbiose nimmt FRANK denn auch an, daß es hier „wohl weniger auf eine direkte Einsaugung der zu assimilierenden stickstoffhaltigen Luft abgesehen sei“, als vielmehr eine Erleichterung der Entbindung von Gasen. Die von ihm versuchten eudiometrischen Bestimmungen der eingeschlossenen Luft sowohl auf ihre Zusammensetzung wie Menge hin ergaben aber Anhaltspunkte für den normalen Prozeß: es ließ sich Sauerstoff und Kohlensäure nachweisen, durch Einführung von Pyrogallussäure auch das spätere Verhältnis von Stickstoff zu Sauerstoff, die beide eine Zunahme durch die Atmung erfahren haben sollen, bestimmen, aber es traten bald auch „gewisse gasförmige stickstoffhaltige

Verbindungen, die offenbar Zersetzungsprodukte sind“ auf, da FRANK nur mit abgeschnittenen Knöllchen arbeiten konnte.

In der Frage der Arteinheit der Knöllchen, die FRANK bereits angedeutet hatte (35), war es bereits LAURENT (52) geglückt, an Zwergerbsen mit Kulturen von dreißig verschiedenen Leguminosenknöllchenbakterien Knöllchen zu erzeugen. NOBBE, HILTNER und SCHMID (58) unternahmen es nunmehr, die Wirkungskraft der Knöllchenbakterien der verschiedenen Gruppen und Gattungen der Leguminosen zu untersuchen. Sie konnten nur gradweise, keine absoluten Unterschiede finden: „Die verschiedenen Knöllchen entstammenden Reinkulturen repräsentieren nicht verschiedene Arten, sondern nur Formen. Alle, selbst die der Mimosaceen, gehören einer und derselben Art, nämlich *Bacillus radicicola* *Beyerinck*, an.“ GONNERMANN dagegen glaubte auf Grund seines Kulturenwachstums mehrere Arten feststellen zu müssen. Er hat jedoch keine wirklich spezifischen Unterschiede angeben können, so daß ich von einer näheren Besprechung seiner Arbeit absehen kann.

Hatte FRANK (35) nur angegeben, daß er in allen oberirdischen Teilen der knöllchentragenden Papilionaceen Bakteroiden gefunden hätte, also eine Gesamtinfektion angenommen, auch den Gedanken einer hereditären Infektion durch den Befund von Bakteroiden in dem embryonalen Gewebe bei *Phaseolus vulgaris* ausgesprochen, so glaubte GONNERMANN ebenfalls, in unentwickeltem Samen, in Blättern und Stempeln, im Embryo, überhaupt in der Nähe von Saftbahnen gabelförmige, allerdings nicht vermehrungsfähige Bakteroiden gefunden zu haben, während andere Forscher, wie FERNBACH (60), LAURENT (61) und RUSSEL (62), feststellten, daß in gesunden und normalen Pflanzengeweben Bakterien nicht vorkämen. Die Aufklärung dieser einander widersprechenden Befunde übernahm ZINSSER (63). Er untersuchte die Samen, die oberirdischen Pflanzenteile und die inneren Partien der knöllchenfreien und -tragenden Wurzeln der verschiedensten Leguminosen und erbrachte den Nachweis, daß diese Pflanzenteile durchaus frei von Bakterien sind. Er wies ferner nach, daß die Bakterien aus den Knöllchen nicht in andere Teile weiter zu wandern vermögen, ja, daß sogar künstlich in das Gewebe der betreffenden Leguminosen eingeführte Knöllchenbakterien sich ohne die zur Knöllchenbildung erforderlichen Einrichtungen und Bedingungen nicht dauernd lebend erhalten können. Für junge Gewebe sei nun ein ungünstiger Einfluß der Pflanzen auf die Bakterien anzunehmen, für ältere Pflanzenteile ließe sich nicht mit Bestimmtheit diese Aktivität feststellen, da das Knöllchenrhizom ja auch bei Fehlen der Existenzbedingungen ohne diesen Einfluß zugrunde gehen könne. ZINSSER gelang es ebenfalls, durch Versuche mit 42 Arten das von verschiedenen Forschern, wie GONNERMANN (59) bei *Raphanus Raphanistrum* und NOBBE (46), behauptete Vorkommen von Knöllchenbakterien in anderen Pflanzen zu widerlegen. Durch ZINSSERS Arbeit ist also die Frage der Gesamtinfektion der Pflanze als erledigt zu betrachten.

PARLATORE (64) gibt eine anatomische Beschreibung der ausgewachsenen Wurzelknöllchen. Er sucht nachzuweisen, daß die Knöllchen aus dem Periblem einer Nebenwurzelanlage hervorgehen, eingelagert zwischen Zentralzylinder und Rindenparenchym. Er betrachtet das Knöllchen als eine Neubildung einer Sekundärwurzel, der Ort der Entstehung läge nicht im Rindenparenchym, sondern noch innerhalb des Endoderms in einer Zelle des Zentralzylinders: „Il tubercolo non puo nascere dal parenchima corticale, perche questo è sempre limitato dall' endoderma, ma da cellule del cilindro centrale, e nel caso nostro

dal periciclo.“ Dieses Endoderm umziehe den Vegetationskegel einer entstehenden Nebenwurzel, aus dem Dermatogen und dem Periblem entstehe durch starke Zellteilung das Bakterienparenchym, das von einer sich meristematisch haltenden Zone umschlossen sei; die Knöllchenstele gehe aus dem Plerom hervor und verzweige sich in Knöllchen, aus dem Periblem dagegen entstände das Endoderm, das die Knöllchenstele und ihre Verzweigungen umgebe. Die Wurzelknöllchen seien daher als umgebildete Würzelchen (*radichetta trasformata*) zu betrachten. PARLATORE wendet sich sodann der Beschreibung der Zellen der einzelnen Gewebe zu, wobei er neben SCHNEIDER (65) als erster dem Zellkern größere Beachtung schenkt. In den stark mit Plasma gefüllten großen Bakterienzellen liege ein sehr großer Nukleus; diese Vergrößerung führt PARLATORE auf die Erhöhung seiner Aktivität zurück. Neben den Nuklei von normaler Struktur mit nuklearem Netz, großen Chromosomen und Nukleolen mit Zentralvakuolen beobachtet er, wie bereits SCHNEIDER, amöboide Formen, auch Teilungen der Nukleolen, daneben große, ebenso wie der Nukleolus aussehende und färbbare Kernkörper. Die von ihm vielfach beobachteten flachgedrückten und halbmondförmig erscheinenden Nukleolen führt er auf den durch das Bakterienwachstum in den Zellen herrschenden Druck zurück. Er beschreibt ferner nukleare Degenerationsformen sowie das Verschwinden des Nukleolus. Der Zellkern verwandelt sich langsam vom Rande her in eine plastische, wenig färbbare Masse um, bis schließlich die Fetzen des Nuklearnetzes (*brandelli di reticolo nucleare*) ebenfalls verschwinden. Die Degenerationsformen begleiten das Absterben der Zelle, das darauf zurückzuführen sei, daß die nicht in Bakteroiden umgewandelten Bakterien das Protoplasma der Zelle und die Bakteroiden angreifen, wenn die Pflanze keine Nahrung mehr liefere und den Zellinhalt in eine stark zuckerhaltige Flüssigkeit umwandle, die von der Pflanze absorbiert würde, während die unveränderten Bakterien durch Poren und Risse, die sich durch den Auflösungs Vorgang in der Knöllchenrinde bildeten, wieder in die Erde gelangten.

In einer späteren Arbeit (66) beschreibt PARLATORE dann die von ihm bei *Vicia faba* beobachtete Entwicklung der Bakterien in Bakteroiden und bestätigt in demselben Jahre (67) seine Beobachtungen über die Veränderungen des Zellkerns während der Degeneration. Der Nukleolus stelle ein hypertrophisches und differenziertes Chromosom dar, er sei als Austauschzentrum des Nukleus und speziell des Chromatins zu betrachten (*il nucleolo sia un centro di ricambio del nucleo e specialmente delle chromatina*). MATTIROLO (68) untersuchte den Zusammenhang zwischen Blüten bzw. Samen und Knöllchen. Er entfernte fortgesetzt die Blüten einiger knöllchentragenden Leguminosen und verglich den Stickstoffgehalt der Knöllchen bei kastrierten und nichtkastrierten Pflanzen zur Zeit der Samenreife. Die fortgesetzte Exstirpation der Blüten rief ein außerordentliches Wachstum des vegetativen Systems der Pflanze (Stiel, Blätter und Wurzeln) hervor, auch die Menge und das Gewicht der Wurzelknöllchen nahm erheblich zu. MATTIROLO konnte eine konstante Beziehung zwischen den Früchten und den Knöllchen während der Reifeperiode feststellen; bei der normalen Pflanze verschwand der Knöllcheninhalt in dieser Zeit, bei der kastrierten Pflanze blieben die Knöllchen dagegen saftig und reich an Inhalt. Die zahlenmäßig festgestellten Ergebnisse lassen Schlüsse auf den Stickstoffgewinn der Pflanze zu.

Ich möchte hier den hormonalen Zusammenhang zwischen Blüten und Bakterienverdauung hervorheben.

PEIRCE (69) dagegen betrachtet das Symbioseverhältnis lediglich als einen Parasitismus (the bacteria are parasites, not benefiting, but injuring, if not finally killing. — S. 296), der zur Zerstörung und Tötung der sie aufnehmenden Zellen führe. Die Knöllchen seien Lateralwurzeln, entstanden als das Resultat einer Bakterienstimulation, die Stärkeansammlung um die infizierten Zellen sowie das tiefe Eindringen der Wurzeln in den Boden seien als Abwehrreaktionen der Pflanze gegen die Infektion aufzufassen, die besondere Größe der Bakterienzellen rühre von dem Wachstumsdruck der Bakterien, „wahrscheinlich also vom großen Reiz in diesen Zellen“ her. Er untersuchte besonders das Eindringen der Bakterien durch die Wurzelhaare; die Bakterien würden angezogen durch Chemotropie, durch gewisse aus der Pflanze in das Bodenwasser diffundierende Substanzen (CZAPECK, 1896, 70). Durch Auflösung oder Auflockerung der Zellenwände gelange der Parasit in die tieferen Gewebe, wo er dann zur Entwicklung der Knöllchen Veranlassung gebe.

Das bereits von Anfang der Knöllchenforschungen an beobachtete Fehlen der Infektionsfäden bei Lupinen führt STEFAN (71) darauf zurück, daß die Knöllchen am Rande von Wurzellentizellen liegen, die äußeren Gewebe daher der an dieser Stelle eindringenden Bakterie keinen erheblichen Widerstand leisten. Diese Vermutung vermag STEFAN aber nicht näher zu begründen, eine Infektion hat er nicht beobachten können bzw. selbst durchgeführt. Die Knöllchen entstehen nach seinen Beobachtungen durch rasche Vermehrung des Rindenparenchyms, „vielleicht mit Ausnahme von *Lupinus*, wo die Entwicklung vom Grundparenchym zwischen der Endodermis und den Gefäßbündeln ausgehen soll“. Er sieht die Knöllchen „als abnormale Wurzelbündel, die eventuell als Reserveorgane dienen“, an. Die Degeneration der Knöllchen im Verlaufe der Vegetationsperiode seien als Erscheinungen der Virulenz der Bakterien anzusehen. „Allgemein läßt sich behaupten, daß die Einwirkung der Fäden (bzw. Bakterien) auf die Wirtszellen schädlich ist, aber in direkter Weise zustande kommt. Die Schädlichkeit zeigt sich einfach darin, daß die Knöllchen von den hintersten, d. h. am längsten von den Parasiten bewohnten Zellpartien des Bakteroidenparenchyms abzusterben beginnen, also gerade umgekehrt, als man bei normalen Wurzeln erwarten könnte. — Das erste Kennzeichen des schädlichen Einflusses ist die abnormale Vergrößerung des Kernes, der auf seiner Peripherie lappenförmig wird.“ Als das eigentliche Ziel des Parasitenangriffes sieht er dagegen das Protoplasma an. An der Degeneration des Parasiten sei vor allem die Anhäufung eigener schädlicher Produkte beteiligt, „welche zugleich die Degeneration der Wirtszellen und schließlich der ganzen Knöllchen bewirkt. Ja, die Degeneration der Zelle beginnt früher (der Kern!), so daß von einem Aussaugen von seiten der Pflanze kaum die Rede sein kann.“ Leider begründet STEFAN seine von den meisten bisherigen Forschungsergebnissen abweichenden Ansichten viel zu wenig, ebenso wie auch der Nachweis der von ihm behaupteten Vorgänge weder durch eine eingehende Beschreibung noch durch Zeichnungen geführt ist.

Eine eingehende Untersuchung der anatomischen Knöllchenverhältnisse unternahm WENDEL (72). Die Autorin gibt eine gute Übersicht über die in den Knöllchen der Leguminosen auftretenden Gewebearten und ordnet sie den einzelnen anatomisch-physiologischen Systemen ein. Die Arbeit beschäftigt sich jedoch nur mit den bereits ausgewachsenen Knöllchen, so daß Schlüsse auf die Entstehungsart der einzelnen Gewebe nur bedingt zulässig erscheinen. WENDEL

fund ebenfalls in den Bakterienzellen größere Nuklei mit großen Nukleolen, in einigen Präparaten auch mehrere Nukleolen in oder um einen Zellkern herum. Diese letztere Erscheinung deutet sie als das Auftreten von Prochromosomen. Ich werde darauf im letzten Teil meiner Arbeit zurückzukommen haben.

Zur Ergänzung des Bildes, das uns die kurz skizzierten Wege und Ergebnisse der Knöllchenforschung geben soll, gehört noch eine Reihe nicht rein botanischer Arbeiten der letzten Jahre, die in ihren Ergebnissen nur kurz gestreift sein sollen.

In der Frage der Arteinheit der Knöllchenbakterien kamen KRÜGER (73) und KRIEGER (74) durch Anwendung der Agglutination, Komplementbindung und vereinzelt der Präzipitation zur Aufstellung besonderer Verwandtschaftsgruppen, die auch VOGEL und ZIPFEL (75) fanden:

1. *Lupinus perennis*, *L. angustifolius*, *L. luteus*, *Ornithopus sativus*.
2. *Vicia sativa*, *Pisum arvense*.
3. *Medicago lupulina*, *M. sativa*, *Melilotus albus*, *Trigonella Foenumgraecum*.
4. *Lotus uliginosus*, *Anthyllis vulneraria*, *Tetragonolobus purpureus*.

Die Wurzelbakterien von *Vicia sativa* und *Vicia faba* sind nicht verwandt, ebenso wie die Bakterien von *Phaseolus vulgaris*, *Trifolium pratense*, *Onobrychis sativa* und *Soja hispida* weder untereinander noch sonst verwandt sind. Durch Impfung einiger Arten von Knöllchenbakterien auf einige andere Leguminosen wurden diese Ergebnisse zum Teil bestätigt. GERMAN und DIDLAKE (76) fanden, daß auf allen *Trifolium*-Arten Bakterien einer *Trifolium*-Art Knöllchenbildung hervorriefen, ebenso Bakterien von *Medicago sativa* bei *M. alba*, *M. lupulina*, *M. denticulata*, dagegen keine Wirkung zeigten bei *Vicia*, *Pisum*, *Phaseolus* usw. „Daher umfassen die Knöllchenbakterien der Leguminosen mehrere verschiedene, in ihrem physiologischen Verhalten voneinander unabhängige Arten. Eine bestimmte Bakterienart kann einer einzigen Leguminosenart, aber auch mehreren Arten dieser Familie zugleich, die in der Regel, aber nicht notwendigerweise, derselben Gattung angehören, eigen sein.“ Versuche, eine Bakterienart, die ihrer Natur nach auf den Wurzeln einer bestimmten Pflanze keine Knöllchen hervorruft, dieser neuen Wirtspflanze künstlich, z. B. durch längere Kultur (bis 1 Jahr) im Aufguß der neuen Pflanze, anzupassen, schlugen fehl, während sie auf der Stammpflanze wieder Knöllchenbildung hervorbrachten. LIESKE (77) stellte auf Grund von Pfropfversuchen fest, daß die Bakterie von *Vicia faba* nur an mit *Vicia* in Pfropfsymbiose lebenden Eiweißverwandten Knöllchenbildung ergaben.

Vergleicht man mit diesen Ansichten die Ergebnisse LAURENTS sowie von NOBBE, HILTNER und SCHMID, so sieht man, daß in der Artenfrage doch noch viele Fragen zu klären sind, wie ja auch die Nomenklatur noch schwankend ist, von *Bacillus radicolus* Beyerinck, *Bacterium radicolus* bis zu *Rhizobium Beyerinck* bei *Lupinus* und *Ornithopus*, *Rhizobium radicolus* bei den übrigen Leguminosen, wie BOAS und MERKENSCHLAGER (78) vorschlugen. Ebenso harren in der Frage der Bedeutung der Knöllchenbakterien für die Wirtspflanze noch sehr viele Punkte der Klärung, gehen hier doch die Meinungen sehr weit auseinander. BEYERINCK (79) weist darauf hin, daß die meisten Handbücher der Pflanzenphysiologie die bisher nur für einige Pflanzen tatsächlich ermittelte Bedeutung der Stickstoffbindung ohne weiteres verallgemeinern. Bisher sei nur bei *Ornithopus sativus* und *Lupinus luteus* auf stickstoffarmen Sandböden erwiesen worden, daß „für diese beiden die Zahl und das Gewicht der Knöllchen von

einiger Bedeutung im Hinblick auf das Gesamtgewicht der Pflanze ist“. Bei anderen, wie z. B. als Extrem *Robinia pseudacacia* stände die Zahl und die Größe der Knöllchen in einem augenscheinlichen Mißverhältnis zu dem Stickstoffbedarf des Individuums, selbst bei Annahme der intensivsten Tätigkeit der Wurzelknöllchen. BEYERINCK weist ferner darauf hin, daß es ihm trotz der unzweifelhaften Intensität der Stickstoffbindung nie gelungen sei, gasometrisch — selbst bei Verwendung bis zu 1 kg Wurzelknöllchen — die Stickstoffbindung nachzuweisen, wie ja auch die Bakterien in Reinkultur auf Platten oder in Kolben außerhalb der Pflanze nie diese Eigenschaft zeigen. Die große Rolle, die hier die Pflanze bzw. das pflanzliche Protoplasma spielt, ist noch gänzlich ungeklärt.

Ein genaues Studium der Entwicklung der Knöllchen haben nur PRAZMOWSKI bei der Erbsee und FRANK bei einigen anderen Leguminosenspezies durchzuführen gesucht, sämtliche anderen Forscher haben sich mit Teilfragen oder mit Untersuchungen einzelner in verschiedenen Entwicklungsstadien befindlicher Knöllchen befaßt. PRAZMOWSKI hat sich, wie ebenso FRANK, mit den letzten Vorgängen, dem Absterben der Bakteroiden, der Resorption und dem endlichen Schicksal des Knöllchens gegenüber dem ersten Teil der Entwicklung weniger eingehend beschäftigt, es bleiben hierfür nur PARLATORE und die gelegentlichen Beobachtungen SCHNEIDERS maßgebend, die ein größeres Eingehen auf diese Probleme erwünschen lassen.

Diese Lücke habe ich mit einem Versuch einer genauen Untersuchung der Entwicklungsgeschichte der Lupinenknöllchen, und zwar lediglich von der Pflanze ausgehend, zu schließen gesucht.

Der Grund, weswegen wir nur eine einzige Pflanze monographisch genommen haben, ist die Konzentration. Durch diese Einschränkung ist es uns möglich, wirklich alles behandeln zu können. Die Lupine wurde aus dem Grunde gewählt, weil bei ihr vor allem die Bedeutung des Stickstoffgewinns feststeht, wir also annehmen dürfen, gerade bei dieser Pflanze den funktionell „zweckmäßigsten“ Bau der Knöllchen vorzufinden sowie die Erscheinungen der Resorption viel präziser verfolgen zu können als bei Pflanzen, bei denen die erhebliche Bedeutung der Wurzelknöllchen für die ganze Pflanze nicht in derart ausgeprägtem Maße vorliegt wie beispielsweise bei *Robinia* oder *Phaseolus*.

Methodischer Teil

Ich wählte eine einjährige Pflanze, und zwar *Lupinus luteus* L., die ich am 10. Mai im hiesigen botanischen Garten in ungefähr 200 Exemplaren auf leichterem Boden aussäen ließ, auf dem bereits Lupinen gewachsen waren. Die Pflanzen brachten am 19./20. Mai die ersten Blättchen hervor und entwickelten sich bis auf wenige Exemplare gut bis zum Schlusse ihrer Vegetationsperiode, zeigten auch durchaus normalen Knöllchenbesatz. Zu Vergleichen verwandte ich *Lupinus polyphyllus* L. aus dem botanischen Garten.

Vom Erscheinen der ersten Blätter ab grub ich jeden vierten Tag einige Exemplare aus und fixierte genügend zerkleinerte Teile der Wurzel, an denen die beginnende Knöllchenbildung zu vermuten war, sofort mit Alkohol-Eisessig nach CARNOY, einen anderen Teil mit

Chromessigsäure. Vom Sichtbarwerden der Knöllchen ab wurden Quer- und Längsschnitte der Knöllchen auf in Petrischalen ausgegossene Gelatineplatten von der Zusammensetzung 2,5% Phenol und 10% Gelatine gelegt, um den Fermentgehalt der Knöllchen bzw. das Auftreten von Fermenten durch Verflüssigung der Gelatine beobachten zu können (TUNMANN, Mikrochemie). Die fixierten Objekte wurden nach genügendem Auswaschen über sechs Alkoholstufen und Chloroform in Paraffin überführt, das kombinierte Einbettungsverfahren mit Paraffin-Agar nach STRASBURGER wandte ich bei den weiter unten besprochenen sterilen Lupinenkulturen an, während ich von der Celloidinmethode Abstand nahm. Die anatomische Untersuchung nahm ich in der Regel an frischen Handschnitten mit den üblichen Reagenzien vor, verwandte später aber auch Paraffinmaterial.

Die Färbemethode für die cytologischen Untersuchungen erprobte ich an Alkoholmaterial von *Robinia pseudacacia*. Ich verwandte Pikrocarmin, Alauncarmin, Eosin-Methylenblau nach GIEMSA, Hämatoxylin nach HEIDENHAIN, das FLEMMINGSche Dreifarbenmischung in der Modifikation von PEIRCE (69), sowie die Becherfarben Naphtazarin und Gallozyanin. Ich erhielt die besten Resultate mit Hämatoxylin (HEIDENHAIN). Die Differenzierung der Schnitte kontrollierte ich mit einer für Verwendung ohne Deckglas korrigierten Wasserimmersion LEITZ und den Becherfarben; FLEMMING wandte ich nach vorheriger Fixierung mit Chromessigsäure nur zu Kontrollfärbungen in der zweiten Versuchsperiode an, während GIEMSA als nicht lichtbeständig genug immer weniger verwandt wurde. Von der Anwendung der übrigen Farbstoffe mußte ich absehen, da die Bakterien und Bakteroiden während des größten Teiles der Entwicklung den Kernen gleich die Farben annehmen und somit stark verdeckend wirkten. Gegen eventuelle Täuschung durch Färb- oder Fixiermittel habe ich mich durch die Anwendung verschiedener Farb- und Fixationsstoffe zu schützen gesucht, indem ich stets mehrere Parallelpräparate anlegte, die mir eine gewisse Einheitlichkeit meiner Beobachtungen ermöglichten. Für die zytologischen Untersuchungen genügten Mikrotomschnitte von 10—15 μ , als Einbettungsmedien wählte ich Kanadabalsam und Dammar-Xylol.

Das Paraffinmaterial des ersten Jahres untersuchte ich von September 1926 bis Februar 1927 und wandte mich gleichzeitig dem Studium der umfangreichen Literatur zu, am 28. April 1927 säte ich nochmals zirka 200 Pflanzen aus, die ich, wie im ersten Jahre, allerdings in sechstägigen Pausen, untersuchte. Dies Material diente

mir hauptsächlich zur Nachprüfung der im Vorjahre gefundenen Ergebnisse, wie auch zur Kontrolle der Kernveränderungen nach den von einzelnen Forschern, wie PARLATORE (66, 67), PEIRCE (69) u. a. angegebenen Methoden.

Es ist mir nicht gelungen, an meinen im Garten gezogenen Lupinen den Zeitpunkt der Infektion, die näheren Einzelheiten dieser und der einsetzenden primären Entwicklung bis zum äußeren Sichtbarwerden der Knöllchen lückenlos zu verfolgen, ich versuchte daher im Dezember 1926 diese Vorgänge an künstlich gezogenen Lupinen zu verfolgen. Durch die Liebenswürdigkeit des Herrn Geheimrats APPEL, dem ich nochmals an dieser Stelle danken möchte, erhielt ich aus der biologischen Reichsanstalt Knöllchenbakterien von *Lupinus mutabilis* und *Vicia Faba*. Ich stellte mir eine Agarnährlösung von der Zusammensetzung: Kalziumsulfat 0,1%, Magnesiumsulfat 0,03%, sekundäres Kaliumphosphat 0,2%, Maltose 0,4%, Agar 1,5% her, goß damit 5 bis 6 Zentimeter hoch fünf 1000-cm-Erlenmeyerkolben aus und sterilisierte diese im Autoklaven. Fünf weitere Kolben goß ich mit einer Agarlösung, erhalten aus einer Gartenerdeabkochung mit 0,05% sekundärem Kaliumphosphat, 1% Mannit und 1½% Agar aus und sterilisierte sie ebenfalls. Die einzuführenden Samen von *Lupinus mutabilis* bürstete ich nach KLEIN und KISSER (81) trocken ab, schüttelte sie mit Seifenpulver und Wasser 2 Minuten, danach zur Entfernung von Luft und Fettresten je 2 Minuten mit Alkohol und Äther und sterilisierte sie 30 Minuten mit einer 1%-Bromlösung, spülte mehrere Male mit sterilem Wasser nach und übertrug sie, je drei Samen in einen Kolben. Auf die Agarmasse goß ich noch eine ¼ cm hohe Schicht steriles Wasser, um die Quellung der Samenschale zu erleichtern. Nach dem Keimen der Pflanzen — die Brombehandlung wurde ohne große Schädigung durchweg gut vertragen — impfte ich die Nährböden möglichst in Nähe der Pflänzchen mit der Knöllchenbakterienkultur. Nach Ausbildung des ersten Blattes sprengte ich einen Kolben ab und entnahm eine Pflanze, das Würzelchen nach Möglichkeit mit den umgebenden Agarstücken herausausschneidend, fixierte und bettete dann in Paraffin ein. Nach der Entnahme der ersten Pflanze zeigte sich jedoch ein Schimmelrasen, worauf ich später sofort alle drei Pflanzen nach Öffnung entnahm. Auf diese Weise war es mir möglich, die ersten Stadien der Infektion bis zur Ausbildung des vierten Blattes in steriler Kultur zu untersuchen.

Bei einigen der im Garten gezogenen Pflanzen bemerkte ich das Eindringen von Pilzhyphen in die bereits entwickelten Knöllchen, es

handelte sich hier um *Thielavia basicola* Zopf, deren Bestimmung liebenswürdigerweise Herr Geheimrat APPEL unternahm, wofür ich ebenfalls meinen Dank auszusprechen nicht unterlassen möchte. Dieser Pilz tritt bekanntlich des öfteren als Schädling bei Leguminosen auf, über sein Auftreten in den Wurzelknöllchen habe ich bisher keine Nachricht finden können. Die eindringenden Pilzhyphen zeigten mitunter sehr seltsame Bilder, so daß ich mich einige Male des Eindruckes nicht erwehren konnte, als ob einige der älteren Literaturangaben von sehr genau beobachtenden Forschern über Infektionsfäden in den erwachsenen Knöllchen sowie Konidienbildung möglicherweise auf diesen Parasiten zurückzuführen wären. Eine spätere Bearbeitung behalte ich mir vor.

Nach dieser kurzen Besprechung der Methoden, unter denen vorgehen ich für ratsam hielt, komme ich sodann zu den eigentlichen Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Aus Zweckmäßigkeitsgründen beginne ich mit der Schilderung der Anatomie der Wurzel und der Infektion der Tragwurzel, die ich „Primär-Infektion“ bezeichnen will. Es folgt die Gewebeentwicklung zum Knöllchen, der sich die Zytologie der Bakterienzellen sowie die der Verdauung anschließt.

Anatomie der Wurzel und Seitenwurzelanlagen

Die junge Lupinenwurzel zeigt in den meisten Fällen einen diarchen Bau des Zentralzylinders; infolgedessen ist die Anordnung der Seitenwurzeln in der Hauptsache zweizeilig. An älteren Wurzeln treten jedoch noch je zwei Reihen auf, die den Eindruck einer vierzeiligen Anordnung erwecken, indem sich an den Xylenteil nach rechts oder links verschoben je zwei Reihen anschließen. NORDHAUSEN (82) beobachtete außer den normalen zweizeiligen Nebenwurzeln noch zwei Reihen von Extrawurzeln, die kreuzweise zur normalen Anordnung stehen, sich aber meistens nur bei Dekapitation zeigen. Das diarche Leitbündel stellt die Hauptmasse des Zentralzylinders, umgeben ist das Perizykel mit einer Endodermis, deren Ausbildung aus einer Art „Stärkescheide“ man deutlich beobachten kann. Ich hebe diesen Bildungsmodus, der bei Wurzeln nach Mitteilung von ZIEGENSPECK sehr häufig vorkommt, hervor, weil er wenig bekannt ist. Es ist ein schönes Beispiel für Sparreservestärke. Zuerst treten nach der Stärkeabscheidung CASPARYSche Streifen auf, später entwickelt sich eine regelrecht verkorkte Endodermis mit Durchlaßzellen (Intermediärstadium). Auf die Endodermis folgt die primäre Rinde, ein parenchymatisches Gewebe mit reichlichen Interzellularen.

das nach außen durch die wurzelhaartragende Rhizodermis begrenzt ist. Das Absorptionsgewebe mit den Wurzelhaaren kollabiert nach einiiger Zeit, es setzt sich ein schwaches Periderm an seine Stelle.

Die Wurzel behält für die ganze Dauer der Entwicklung ihren Pfahlwurzelcharakter und erreicht eine Tiefe bis zu 60 cm, an ihrem oberen Teile treten hauptsächlich, jedoch nicht ausschließlich die Wurzelknöllchen auf. Eine so planmäßige Verteilung, wie FRANK (35, S. 545 f.) sie gefunden hat, daß entweder jede Seitenwurzel an ihrer oberen Gabelung oder aber die Hauptwurzel oberhalb der ersten Gabelung regelmäßig Knöllchen trägt, so daß keine Verbindung von Wurzel zu Stamm ohne Knöllchen ist, kann ich nicht bestätigen. Die Wurzelknöllchen traten bedeutend unregelmäßiger auf, in 5 bis 25 cm Tiefe am häufigsten, in tieferen Schichten seltener — ebenso wie das Auftreten der Wurzelknöllchen nicht zeitlich begrenzt ist. Es treten selbst bis gegen Schluß der Vegetationsperiode junge Knöllchen auf, unter welchen Bedingungen, werden wir weiter unten bei der Besprechung der Infektion entwickeln. Die Seitenwurzeln entstehen aus dem Perizykel, und zwar gewöhnlich vor einer Hadromplatte, die parenchymatischen Zellen des Perizykels treten in lebhafte Teilungen ein, zerdehnen die meistens noch nicht verkorkte Endodermis, die Rinde wird durchbrochen. Der Vegetationskegel zeigt die gewohnte Ausbildung.

Bevor wir die Organographie entwicklungsgeschichtlich betrachten können, müssen wir die

Primär-Infektion der Tragwurzeln

besprechen. Das Eindringen der Bakterien kann nur an jungen Wurzeln erfolgen, weil diese allein keine Außenschicht aus Kork haben. Wir finden deshalb die Infektion nur an ganz jungen Wurzeln, damit ist eine gewisse zeitliche Begrenzung der Infektion gegeben; sowie die Wurzel in ihrem Wachstum die Erdschicht durchbohrt hat, in der die Bodenbakterien zu leben pflegen, finden wir auch keine Knöllchenbildung mehr, dagegen kommen diese noch an den Seitenwurzeln vor, die die Pflanze in dieser im allgemeinen 15—20 cm Tiefe nicht überschreitenden bakterienhaltigen Erdschicht ausbildet. Damit haben wir auch die Erklärung für das Auftreten von jungen Knöllchen bis gegen Ende der Vegetationsperiode hin. Ob die reichliche Gegenwart von Sauerstoff, die eine Vorbedingung für eine energetisch günstige Stickstoffbindung durch aerobe Vorgänge ist, dabei als Reiz oder als Vorbedingung für das Vorkommen der Bakterien

wirkt, müssen wir offen lassen. Im allgemeinen findet man, daß die Hauptzahl der Knöllchen in der ersten Zeit des Wachstums der Hauptwurzel entsteht. Nur die in dieser Zeit angelegten Knöllchen kommen zur endgültigen Entwicklung und unterliegen am Schluß der Vegetationsperiode der Resorption. Knöllchenbildung dagegen beim Durchbrechen einer Nebenwurzel habe ich in keinem Falle bei der Lupine beobachten können.

Es erhebt sich nun die Frage, wie erfolgt das Eindringen der Bakterien in die Tragwurzel. BEYERINCK beobachtete in zu diesem Zwecke veranstalteten Versuchen, daß *Bacterium radicolola* fertige Zellulose nicht anzugreifen vermag, es ist somit eine Infektion eines ausgewachsenen Wurzelhaares undenkbar, ich habe sie auch nicht beobachten können. Betrachten wir das langsame Wachstum der Wurzelhaare der Pfahlwurzel der Lupine, so wird uns die Art des Eindringens verständlich. Die Spitzen der Wurzelhaare, ja schon deren erste Ausstülpung, sind ja bei fast allen Pflanzen durch einen Amyloidzustand ausgezeichnet. Wie alle langsam wachsenden Wurzelhaare haben sie nur eine geringe Bläuung mit Jod in älteren, noch wachsenden Stadien, ganz junge, kaum angelegte Haare in der beginnenden Ausstülpung zeigen die Jod-Bläuung sehr gut. In diesem jungen, stark amyloidischen Zustande erfolgt die Infektion. Nach dem Eindringen der Bakterien ist das Wachsen des Haares sistiert, man beobachtet bald ein Einschrumpfen und Absterben der Zellen. Ob dieses Absterben auf die Perforation der Zellwand, wie FRANK (35) es annimmt, zurückzuführen ist oder auf einen Verbrauch der Kohlehydrate, muß ich dahingestellt sein lassen. Nach Versuchen von NOBBE, SCHMID, HILTNER und HOTTER (46) ist die Verbreitungsfähigkeit der Leguminosen im Boden verhältnismäßig groß, rechnen wir dazu noch die durch die Wurzelausscheidungen (CZAPECK, 70) ermöglichte Chemotaxis hinzu, so ist uns das bei Anwesenheit der betreffenden Bakterien nicht ausbleibende Auftreten der Knöllchen verständlich. Um bei diesem schon aus der Literatur bekannten Umstände jeglichen Fehlschluß auszuschließen, der durch irgendwelche Saprophyten und Parasiten hervorgerufen sein könnte, betteten wir, wie bereits beschrieben, absolut steril gezogene Pflanzen und mit zugehörigen Bakterien in Reinkultur infizierte Agarstückchen ein. Diese entnahmen wir so, daß sie sowohl die Tragwurzel wie die Umgebung enthielten. Unter einer Vielzahl von Präparaten gelang es bei einigen zu beobachten, daß die Bakterien deutlich nach der Pflanze zu wuchsen und sich um Wurzelhaare herumlegten, wo sie durch intensive Vermehrung Klümpchen bildeten. Das Bakterien-

klümpchen legt sich an das wachsende Wurzelhaar an (s. Fig. 1), und erst nach einiger Zeit scheint eine Lösung der Zellwand vor sich gegangen zu sein; denn eine Krümmung des Haares tritt erst ein, nachdem bereits Bakterien in der Zelle selbst sichtbar sind (Fig. 2). Widerstand scheinen die Bakterien an der Innenwand der Zelle zu finden, denn lagen sie bisher zu zwei bis dreien nebeneinander, so sammeln sie sich an der Innenwand an und gelangen erst nach einiger Zeit in die darunterliegende Parenchymzelle (Fig. 3). Es muß wohl eine Erweiterung der Plasmodesmen erfolgen; ob diese Erweiterung durch den Reiz auf die Pflanzenzelle oder auf irgendeine lösende Eigenschaft der Bakterien zurückzuführen ist, lasse ich dahingestellt. Dasselbe Bild haben wir auch später des öfteren, daß sich eine etwas größere Verbreiterung der Bakterienzüge zwischen den beiden Zellwänden zweier benachbarter Zellen findet (Fig. 15), gut sichtbar durch Isolation des Farbenbildes (STRASBURGER, 83, S. 468), durch Lichtüberfluten mit einem aplanatischen Kondensator LEITZ. Einen erheblichen Widerstand dieser jugendlichen parenchymatischen Zellen werden wir nicht anzunehmen haben, dieser setzt sofort bei einer etwas dickeren Membran mit ausgesprochener Zellulosereaktion ein, zum Beispiel den Wänden der Stärkezellschicht. Hierdurch wird uns die erfolgreiche Lokalisation des Bakteroidengewebes verständlich. Die Folge dieser Infektion des Rindengewebes der Tragwurzel ist eine Ansammlung von bakterienführenden Zellen in der Rinde derselben. Sie füllen sich stärker mit Plasma und erscheinen etwas dunkler durch die Bakterien als die übrigen. Es erfolgen noch außerhalb der Endodermis, die auf dem CASPARY-Zustand steht, einige rasche, unregelmäßige Zellteilungen. Sie regen das Gewebe zur Bildung von Vorbeulungen an (Fig. 4). Nach außen hin erhebt sich eine geringe Schwellung (Fig. 4).

FRANK (35, S. 533) glaubte bei der Lupine beobachtet zu haben, daß „die die Infektion aufnehmenden äußersten Rindenzellen noch weiter dem aus dem Boden kommenden Mikrob entgegengehen: Sie wachsen mitunter so weit nach außen gegen die Infektionsstelle hin, daß sie die über ihnen liegenden Epidermiszellen zur Seite schieben und sich nun selbst frei an die Oberfläche hervordrängen, um hier aus erster Hand den Infektionsstoff sich zu holen.“ Die Deutung einiger von FRANK beigelegter Zeichnungen wird verständlich, wenn man weiß, daß FRANK der Ansicht ist, die Pflanze locke die Mikroben an und fange sie in von ihr angelegten Leitbahnen ein, wobei die Leitbahnen also das Primäre wären. Ich habe keinerlei Bilder gefunden, die FRANKS Ansicht bestätigen könnten, es sind vielmehr die

eindringenden Bakterien das Primäre, die Zellteilungen erfolgen auf den Anreiz der Endophyten. Auf diese primären Infektionsherde bleibt die Reaktion nicht beschränkt, sondern es wird eine Anlage einer Nebenwurzel zum Austreiben angeregt. Wir möchten glauben, daß dabei „Wuchshormone“ in Wirkung treten, welche gerade von diesen ersten Zellteilungen, dem „Gallengewebe“ ausgehen. Wir wollen daher ganz kurz eine solche schlafende Anlage beschreiben. Sie treiben ohne Infektion nur dann aus, wenn eine Seitenwurzel ihrer Nachbarschaft verletzt wird oder wenn die Hauptwurzel gekappt ist. Es liegt also eine doppelte korrelative Hemmung vor, erstens von der Pfahlwurzel ausgehend, zweitens von der Seitenwurzel. Diese Anlagen können oft ganz klein sein, ja nur aus wenigen embryonalen Zellen des Perizykels bestehen. Zumeist ist jedoch eine größere Anzahl auf dem primären Zustande stehen geblieben. Es ist nun ganz kennzeichnend, wie solche korrelativ gehemmten Augen einerseits normal austreiben, wenn die geförderte Saugwurzel wegfällt; andererseits vermag die Infektion der Tragwurzel mit Endophyten denselben Effekt, aber in anderer Richtung, auszulösen, nämlich in der

Gewebeentwicklung zum Knöllchen.

Vom allerersten Anfang ist ihr Austreiben von dem einer normalen Seitenwurzel dadurch unterschieden, daß die Wurzelhaube in dem gewohnten Gewande fehlt. Auch hiervon gilt jener Ausspruch von GOEBEL (84, S. 1259): „Selbstverständlich sind diese haubenlosen Wurzeln solche, welche ihre Haube entbehren können. Aber nichts spricht dafür, daß die Hauben verkümmerten, weil sie nicht benutzt werden. Vielmehr handelt es sich wohl überall um Wurzeln, die in ihrer Ausbildung gehemmt waren und bei denen die Hemmung sich auch auf die Wurzelhaube erstreckte.“ Diesen Gedanken spricht GOEBEL im Hinblick auf die manche Ähnlichkeit zeigenden Kurzwurzeln der Roßkastanie aus, sie ist völlig auf die ebenfalls mit Endophyten versehenen Wurzeln von Cycadeen, *Alnus* usw. übertragbar. Während die Hemmung bei der unbesiedelten Kurzwurzel von *Aesculus* sich durch den Knospencharakter ausdrückt, kann das durch die Gegenwart des primären Infektionsherdes in unserem Falle bedingt sein. Der Reiz zur Entwicklung ist eben ein andersartiger als bei der Ausbildung treibender Seitenwurzeln.

Wollen wir ganz kurz die Art der Organentwicklung kennzeichnen, so können wir, ohne den Dingen einen allzugroßen Zwang anzutun, sagen: Die sich entfaltende Nebenwurzel nimmt in ihren äußeren Schichten die ausdifferenzierte Gestalt der Zellen an, wenn das Innen-

gewebe noch auf einem ganz jugendlichen Zustande steht. Also würde die normale Ausbildung der Innenschichten gehemmt. Das geht so weit, daß sich außen bereits ein Korkgewebe (Intercutis) ausgliedert und sogar von ihm umschlossen ein Collenchym (Fig. 5). Dieses besitzt unregelmäßig verdickte Wandungen und kann vielleicht als Knorpelcollenchym (WENDEL, 72) benannt werden. Die Wandbeschaffenheit ermöglicht eine gewisse Dehnungsfähigkeit. Diese erfordert das Anschwellen des Innengewebes, daneben bietet es doch eine gewisse Festigung gegen radialen Druck. Nicht nur das Längenwachstum des Meristems ist sistiert, sondern das Teilungsgewebe bleibt sehr lange auf einem embryonalen Zustande. Das macht sich in der Größe der Nucleoli, der Kerne und der großen Kernplasma-relation bemerkbar, auch läßt das alveoläre Protoplasma besonders in den inneren Schichten die Vakuolisierung vermissen. Hervorzuheben ist der große Stärkegehalt dieser Zellen. Die Zellen teilen sich nach allen Richtungen, nicht nur in der periklinalen, hierdurch verbreitert sich der Scheitel, und es liefert zunächst eine überbreite Teilungszone ihre Zellen. Die Folge ist ein Anschwellen des Knöllchens. Wir wollen jetzt das genaue Bild der Entwicklung des Knöllchens wiedergeben.

Bereits die Bilder einer ganz jungen Infektion ergaben ein Gallengewebe, das sich etwas über die Tragwurzel hinaus vorbeulte (Fig. 4—6). Die Rinde unter dem primären Infektionsherde sowie an den Seiten wird zu einem adventiven Bildungsgewebe, das besonders an den Flanken tätig ist und nach innen neues Gewebe bildet, in das die Bakterien nach und nach hineinwachsen. Nach außen verkorken die Parenchymschichten. Ich möchte hier gleich betonen, daß die Knöllchenrinde mit der Entwicklung der Tragwurzel Schritt hält und sich ihr vollkommen angleicht. Die Darstellung dieser und der folgenden Vorgänge habe ich aus Gründen der Übersicht schematisch vornehmen müssen. Das durch die Einwanderung der Bakterien entstehende Bildungsgewebe habe ich mit GM (Gallenmeristem) in Fig. 7a, b, d, e bezeichnet, auf der Fig. 6 von FRANK ist es in seinen Anfängen gleichfalls zu sehen. Sehr bald beginnt nun eine Seitenwurzelanlage in Tätigkeit zu treten (S. M. auf Fig. 7). Diese stößt gegen den primären Infektionsherd, der durch die oben erwähnten Zellteilungen sich vergrößert hat und den wir der Einfachheit halber mit Gallengewebe bezeichnen wollen, ohne dabei irgendwelche anderen Vorstellungen mit dieser Bezeichnung zu verbinden. Das Gallengewebe wird durch das Verwachsen der Seitenwurzeln hinausgedrängt, während die Bakterien langsam gegen die Wurzelmitte zu

in die jungen parenchymatischen Zellen eindringen (Fig. 7a—d, Fig. 8a—e). Nach einiger Zeit verbreitert sich das Meristem der Seitenwurzeln (Fig. 7e S.M.). Die Mitte des Kegels hört allmählich auf, intensive Zellteilungen vorzunehmen, während die Flanken rasch zur Seite vorstoßen (Fig. 7f, 8f). Die sich ausbildenden Gefäßbündel verzweigen sich an dieser Stelle. Das Gallenmeristem (G. M.) sowie das Meristem der sich verzweigenden Nebenwurzel (S. M.) verschmelzen miteinander und bilden das gemeinsame Knöllchenmeristem (K. M.), das ich in Fig. 9 besonders dargestellt habe. Durch das Verlegen der Meristempunkte auf die Flanken bildet sich eine meristematische Zone aus, die nach der Wurzel zu mit dem Kambium des Wurzelbündels verschmilzt, ich habe sie als Bindemeristem (B. M.) bezeichnet. Das Bindemeristem bleibt während des ganzen Knöllchenwachstums in Tätigkeit und bewirkt durch Bildung von Parenchymzellen den Anschluß an die Wurzel, nach außen hin verkorken diese „Füllzellen“ und schließen die Knöllchenrinde an die Wurzelrinde an (Fig. 9).

Das Knöllchenmeristem, entstanden durch Verschmelzung des Meristemkegels der Seitenwurzel und des adventiven „Gallenmeristems“, zeigt ein eigenartiges Wachstum. Eine deutliche Gliederung in Gewebe wie Pleron, Periblem, Dermatogen und Calyptragen ist nicht zu beobachten, diese fehlt bekanntlich der Spitze der Lupinenwurzel. Es entstehen nach außen parenchymatische Zellen wie bei einer Wurzelhaube, nur verwandeln sie sich in Korkgewebe (K., Fig. 9). Wir bezeichnen dieses am besten als eine Intercutis, da an ihrer Bildung kein Phellogen im eigentlichsten Sinne des Wortes beteiligt ist. Ähnliche Umwandlungen sind bei Wurzelspitzen, die nicht rasch vortreiben, sehr weit verbreitet und als Metacutisierung beschrieben (MÜLLER, 80).

Etwas weiter innen gelegene Schichten werden zu einer Art Periblem. Dieses arbeitet nach zwei Seiten verschieden, auf die Bakterien zu erzeugt es eine große Gewebemasse, in der sich drei bis vier Schichten ausgliedern. Die äußerste Schicht schließt an die spätere Intercutis an und gibt dem oben beschriebenen Collenchym (Fig. 9, Kol.) Entstehung, die zweite wird sehr stärkereich und erzeugt nur kleine Zellen mit dickerer Membran, die sogenannte Stärkezellenschicht (Fig. 9, St.). Die dritte ergibt das Bakteroidengewebe (B., Fig. 9). Im Anfang ist es den Stärkezellen ungemein ähnlich, die Zellen strecken sich jedoch bald und vergrößern sich unter Erhaltenbleiben größerer Kerne. Die vierte Zone ist wieder eine Stärkeschicht, darauf folgen die Gefäßbündel sowie eine Parenchymzellenschicht, die

den Anschluß an das Bindemeristem gibt. Da das Kambium der Tragwurzel ebenfalls an der Verbindungsstelle nur Parenchym erzeugt, ist es unmöglich, die einzelnen Meristemzonen zu unterscheiden. Durch ihre Tätigkeit wird die Ansatzstelle des Knöllchens verbreitert.

Im Innern gliedert das Knöllchenmeristem eine Art Plerom heraus, auf der dem Bakteriengewebe zugewandten Seite werden weniger Zellen erzeugt, die ganze Anlage wird also langsam nach außen gedrängt (Fig. 10, 11).

Nach einiger Zeit beobachtet man einen merkwürdigen Vorgang, den wir am treffendsten als Umwallung der Stele schildern können. Die Anlage der Stele verbreitert sich, man könnte im übertragenen Sinne von einem Plerom sprechen. Nach kurzer Zeit teilen sich die Flanken rascher, während die Mitte zurückbleibt. Es ist eine Gabelung der Wurzel, endogen angelegt, wie wir sie bereits beim Meristem der Seitenwurzel kennen gelernt haben. Man könnte sagen, es ist die endogene Anlage einer Nebenwurzel „auf die Spitze gerückt“. Der Mittelteil hört auf zu wachsen. Es sind aus einer Stele zwei entstanden.

Das Rindengewebe erleidet eine ähnliche Verbreiterung, nur hinkt sie etwas nach; des öfteren kann man sogar einen Einriß in das Rindengewebe beobachten. Die sich ausdifferenzierende Stele bringt wieder als Schutz gegen das Eindringen der Bakterien einen Mantel der eigentümlichen Stärkezellen hervor, während in das herumliegende Parenchymgewebe Bakterien einwandern. Fig. 12 zeigt eine solche umwallte Stele, von denen das Bakteroidengewebe zahlreich durchzogen ist. Durch Schnitte, die diese Stele oder die sie umgebenden Parenchymzellen treffen, entsteht der Eindruck von Bakteroidengewebeinseln, wie Fig. 13 sie zeigt, während tatsächlich das ganze Bakteroidengewebe des Knöllchens ein zusammenhängendes Gewebe darstellt, durchzogen von diesen durch Stärkezellen geschützten Stelen. Zuletzt gabelt sich auch der Bildungsherd der Außenringe. Während sich das Wachstum des der Tragwurzel zugewandten Knöllchenmeristems genau so weiter verhält, wie oben geschildert, erlischt langsam die Produktion im anderen Gabelaste. Durch die Tätigkeit des neuen Knöllchenmeristems sowie des Bindemeristems entsteht also eine neue große „Bakteroideninsel“, das Knöllchen wächst von der Wurzel ab, die Basis verbreitert sich erheblich (Fig. 7f, 10b). Diese Gabelung des Knöllchenmeristems erfolgt noch einige Male, bis auch hier das Anlegen des Bakteriengewebes unterbleibt und nur noch Stärkegewebe gebildet wird, das also am Schlusse des Knöllchenwachstums innen und außen das gesamte

Bakteroidengewebe umfaßt. Die Stele biegt am Ende manches Mal noch herum, und dadurch umfaßt das Bündelchen außen das Bakteriengewebe. Die Entwicklung des Knöllchens verläuft nun durchaus nicht so regelmäßig in den zwei Ebenen, die die Schemata 7 und 8 zeigen, sondern ist gegen die Horizontale und die Senkrechte verschoben, man erhält also stets Schnitte, die sowohl das Bakteroidengewebe, abgesehen von kleinen Einbuchtungen, die durch das oben genannte Abweichen der Stele hervorgerufen sind, als zusammenhängendes Gewebe, wie auch Inselbildung zeigen können. Ich mußte jedoch schematisieren, um die Entwicklung deutlich zeichnen zu können.

Die erste Gabelung des Seitenwurzelmeristems (Fig. 7e) kann mitunter den Anschein haben, als ob sich eine Adventivwurzel dicht an der Spitze bildet. Ihr Teilungsgewebe bildet zusammen mit der meristematischen Zone des „Gallengewebes“ das Knöllchenmeristem. Es können auch von Anfang an zwei Stelen angelegt werden, die Perizykelzellen gehen dann über zwei Hadromlinien in das Knöllchen ein, der oben geschilderte Fall ist mir aber am häufigsten vorgekommen, weshalb ich ihn für die eingehendere Schilderung wählte.

Die Entwicklung der perennierenden Lupinenknöllchen zeigt keine Abweichung, nur finden wir an den Seiten und an der Spitze *kein* Erlöschen des Meristems, dieses bleibt während der Winterruhe untätig und setzt für die nächste Vegetationsperiode den Bildungsherd fort.

Wenden wir uns jetzt der

Zytologie der Bakterienzellen

zu.

Bei der Behandlung der Meristeme hatten wir hervorgehoben, daß sich sehr bald eine mächtige mittlere Rindenlage heraushebt.

Im Anfang ist sie nicht von der ebenfalls stark stärkeführenden Rinde auf beiden Seiten zu unterscheiden. Während die der Intercutis wie die dem Bündel zu liegenden Stärkezellen auf ihrem Zustande stehen bleiben, bilden sich die Zellen des Bakteroidengewebes anders aus. Sie erzeugen zunächst ein kräftiges Interzellularsystem (Fig. 14). Eine ausgiebige Durchlüftung ist ja wegen der Zufuhr von Atemluft und Stickstoff unbedingte Voraussetzung der Funktion der Bakterien. Sauerstoff dient als Atmungsstoff und Kraftquelle für die Zuckerverbrennung der Bakterien.

Das Protoplasma behält sehr lange die starke Färbbarkeit der Embryonal- und Drüsenzellen. Die Kerne im Innern zeigen auch

von Anfang an eine sonst nur bei ganz jugendlichen Meristemzellen bekannte Merkwürdigkeit. Sie besitzen einen übermäßig großen Nukleolus. Er ist so groß, daß er von vielen Beobachtern offenbar, den Zeichnungen nach zu urteilen, mit dem Zellkerne selbst verwechselt wurde. Die chromosomale Substanz und das ganze sonstige Kerngerüst ist nur eine dünne Schicht.

Wenn sich solche Zellen teilen, und das findet, wenn auch selten, bei der weiten Ausbildung der Bakteroidenzellen statt, so verläuft die Kernteilung nicht ganz, wie wir sie sonst zu sehen gewohnt sind. Sicher wird der Nukleolus *nicht* aufgelöst, sondern persistiert, dagegen leitet er förmlich die Teilung ein. Er wird quer durchgeschnürt. Die Chromosomen sind neben ihm in dem dichten Plasma kaum zu erkennen. Für das Studium der genauen Vorgänge ist unser Objekt leider deshalb wenig geeignet, wir schreiben daher das Folgende mit allem Vorbehalte.

Die Kernwandung bleibt bei der ganzen Teilung völlig erhalten. Es ist aber keine amitotische Kernteilung, sondern es kommen Chromosomen zur Ausbildung. Sie lagern sich um den Nukleolus herum und wandern an die durch seine Einschnürung gegebenen Pole. Bei einer solchen Kernteilung nach Art einer „Promitose“, wie sie Pilzen usw. eignet, können daher etwa schon in die Zelle eingedrungene Bakterien nicht im geringsten stören.

Bei der Entstehung des primären Infektionsherdes hatten wir das Wandern der Bakterien von Zelle zu Zelle bereits eingehend geschildert, auch bei dem sekundären Bakteriengewebe findet es auf dem Wege der Plasmastränge auf den Zellkern zu statt. Der Durchtritt durch die Wand gelingt auf dem Wege der Plasmaverbindungen, welche etwas erweitert angelegt erscheinen. Fig. 15 zeigt solche Bakterienzüge bei Lichtüberflutung. Nochmals die Schilderung zu wiederholen, halten wir für zwecklos, wir verweisen auf die Schilderung der Primärinfektion.

Die Bakterien vermögen der raschen Ausgliederung der Wirtszellen nicht zu folgen und bleiben daher immer in einer gewissen Entfernung, während die abschließenden Stärkezellen auf beiden Seiten bereits deutlich zu erkennen sind (Fig. 9). Wir sehen, daß die Pflanze nach dem ersten Hinausdrängen des primären Infektionsherdes durch diese Differenziation die Endophyten erfolgreich lokalisiert. Die Bakterien dringen *nicht wahllos* in die Zellen ein, wo es „etwas zu holen“ gibt, sondern nur dahin, wo ein *vorbestimmter Bau ihre Gegenwart „erwünscht“ erscheinen läßt.*

Die junge Zelle bekommt von Anfang an eine große Masse von Stärke mit, die das „Betriebskapital“ für die Stickstoffbindung darstellt. Die Bakterien dringen durch die Plasmodesmen in Zügen zu 3—4 nebeneinander, mit ihren Schmalseiten voran, in die Zelle ein und wandern auf den Kern zu. Dieser verhält sich völlig passiv, auch vor dem Eindringen konnten wir an ihm keine Veränderungen wahrnehmen. Hier verteilen sie sich um den Kern, vermehren sich kräftig, während andere in Zügen der Plasmodesmen folgend weiter vordringen (Fig. 15, 16, 17, 18b).

Bei der Vermehrung der Bakterien wird die Stärke langsam verzuckert und verbraucht, was deutlich an Hand von Jodpräparaten sichtbar ist: das langsame Abnehmen der Stärke von den nicht bis zu jüngst infizierten bis zu den von Bakterien reich besetzten Zellen.

Bei dieser Verzuckerung regt sich der Zellkern nicht, hierin unterscheiden sich diese Vorgänge von denen in der Mykorrhiza der Orchideen usw., wo die Verzuckerung zur Anlockung der Pilze unter der Fermentbildung im Kerne erfolgt. Dort trifft man eine Körnchenabspaltung an, hier dagegen nicht. Fig. 16 zeigt eine solche Zelle, wir sehen deutlich, daß die Stärke noch vorhanden ist, wenn die Bakterien eingedrungen sind. Während der weiteren Vermehrung der Bakterien und dem Verbrauch der Stärke ruht der Kern völlig, die Zellen sind ungemein dicht von den Symbionten erfüllt, der Kern liegt meistens seitlich, der Riesennukleolus ist ohne Hof von der dünnen Kernwand umgeben. Fig. 18 zeigt die Kerne junger Bakteroidenzellen, b im Vergleich mit einer Stärkezelle, a bei gleicher Vergrößerung.

Das Bild bleibt nun stehen, es erfolgen keine weiteren Wandlungen. Die das Zellinnere dicht erfüllenden Bakterien können ihre „Bakteroidengestalt“ annehmen. Ob bei diesen „Degenerationsformen“ auch eine Art Phagie vorkommt — wir erinnern nur an die von BEYERINCK und anderen Forschern beobachteten „Bläschenbakteroiden“ — haben wir nicht untersucht, wie zweifellos das Studium der Entwicklung zu Bakteroiden manches Neue ergeben würde. Mit dieser Umwandlung in den älteren Teilen des infizierten Gewebes geht das Wachsen und Infizieren neuer Teile an den Flanken des Knöllchens fort, so daß man in den Schnitten aus dieser Zeit meistens die Sekundärinfektion hinter den Meristemen, wie auch die Bakteroidenbildung zugleich zu beobachten vermag. Nach einiger Zeit, bei $\frac{2}{3}$ bis $\frac{3}{4}$ des Wurzelumfanges, hört der Neuzuwachs auf, das Knöllchen hat seine endgültige Ausbildung, seine „Reife“, erreicht. Bei perennierenden Pflanzen dagegen erlöschen die Meristeme nicht, sie ruhen während der Ruhezeit der Wurzel, im nächsten Jahre findet

ein neues Wachstum statt, so daß die Pflanze auch im nächsten Vegetationsjahre die Möglichkeit hat, junge Knöllchen an die alten heranzusetzen. Eine Neuinfektion der Tragwurzel mit den im Boden lebenden Bakterien kann ja aus den oben angeführten Gründen bei einer alten Wurzel nicht mehr stattfinden. Diese geschilderte Entwicklung geht bis zur Blütezeit.

Die Zytologie der „Verdauung“

Mit Eintreten und Fortschreiten der Blüte beobachtet man Veränderungen, die in den Nuklei vorgehen. Das starre Kerngerüst verschwindet, der Kern nimmt lappenförmige, amöboide Formen an. Der Nukleolus sondert erst eins, dann mehrere feste Körperchen ab, die kleinen Nukleolen gleichen, dagegen nicht die Zentralvakuole besitzen. Diese Körperchen wandern langsam im Zellkern bis an die Grenze der amöboid gewordenen Kernwand (Fig. 19), wandern ferner meistens in die pseudopodienähnlichen Fortsätze, durchdringen die Kernwand und verteilen sich langsam im Protoplasma und der Bakterienmasse, dem „Mykoplasma“ FRANKS (Fig. 20, 21). Wie ich im methodischen Teile erwähnte, hatte ich Knöllchenschnitte auf Karbolgelatineplatten von Anfang der Kultur an in gleichen Zeiträumen ausgelegt, um beim Eintreten der Verflüssigung der Gelatine das Auftreten der die Bakteroiden auflösenden Fermente kontrollieren zu können, bei gleichzeitiger anatomischer und zytologischer Kontrolle der Präparate. Zuerst zeigten die aus diesem oben geschilderten Entwicklungszustande entnommenen Schnitte Verflüssigung der Phenolgelatine. Ich war also gezwungen, die Ausstoßung der Körperchen aus dem Zellkerne mit der Verflüssigung in Verbindung zu setzen. Ein Glycerinauszug dieser Knöllchen zeigte ebenfalls Verflüssigung. Um die aus den „Pseudopodien“ des Kernes ausgestoßenen Körperchen beginnt sich mit deren allmählichem Verschwinden ein leerer Raum in der dicken undurchsichtigen Bakteroidenmasse auszubreiten (Fig. 22—26), und zwar in demselben Maße, wie diese Körperchen verblassen und schließlich die Konturen verlieren. Versuche, diese Vorgänge zu photographieren, verliefen leider nicht glücklich. Der Nukleolus scheidet immer aufs neue Körperchen ab, die Kernwandung verschwindet vollkommen (Fig. 27, 28a), der Nukleolus wird immer kleiner, verschwommen und blasser, endlich ist die Zelle nur noch von einer gleichmäßigen Flüssigkeit angefüllt, in der man zahlreiche Bakteroidenreste sowie einige wenige Reste oder Bruchstücke des Nukleolus oder seiner Körperchen bemerkt (Fig. 28b)

Die Verdauung der Bakteroiden ist beendet mit dem Wachstum der Früchte, man findet nur noch breiige, weiche Knöllchen, die langsam einschrumpfen. Ich möchte hierbei an die Arbeit MATTIROS (68) erinnern, der zeigte, daß bei fortgesetzter Exstirpation der Blüten einiger Papilionaceen die Knöllchen prall und fest blieben. auch in ihrer Größe eine Zunahme erfuhren, wir werden ohne Zweifel auch bei dieser Erscheinung Gesamtbeziehungen in der ganzen Pflanze anzunehmen haben.

Es erhebt sich nun die Frage, wohin gelangen die Stoffe, die aus dem Verdauungsvorgange resultierten? Die Stoffe müssen in die Gefäßbündel abgegeben werden. Dabei müssen sie die das Bakteriengewebe umscheidende Stärkezellschicht durchdringen. Die Zellen führen in diesem Zustande keine allzu starken Wandungen, sind somit passabel. FRANK hat in diesen Schichten sowie in den Gefäßen bei Behandeln mit konz. Alkohol Asparaginkristalle gefunden; wir glauben daran, weil dieser Stoff und wohl daneben noch andere die „Leitungsform“ der Eiweißstoffe, zum mindesten bei den Leguminosen, darstellt. Das Gefäßbündel hat bis zu dieser Zeit noch in der Endodermis das Primärstadium mit einem allseitig offenen CASPARY-Zustand der Zellen, dadurch ist sowohl die Abgabe von Stoffen aus dem Bündel, wie auch das Eintreten von solchen gegeben. Die Abgabe von Stoffen höheren Nährwertes halten wir aber nach der Besiedelung mit Bakterien für nicht vorhanden, da sonst die Endophyten in der Umgebung der Zuleitungsstränge viel zahlreicher vorkommen müßten; davon ist nichts zu bemerken. Dagegen ist an eine Abgabe von Stärke und sonstigem „Brennmaterial“ vor der Besiedelung mit Bakterien sehr wohl zu denken, denn diese Massen von solchen Stoffen können nicht alle im Embryonalzustande der Zelle hineinbefördert worden sein. Wir werden ferner den Abtransport der während der Lebenstätigkeit der Bakterien entstehenden N-Verbindungen als Aufgabe des gut ausgebildeten Gefäßsystems anzunehmen haben, schreiben viele Forscher doch diesen Produkten einen höheren N-Gewinn für die Pflanze als den aus der Auflösung der Bakteroiden resultierenden zu.

Bei der Resorption der Verdauungssäfte in das Bündel beobachtet man ein Auflockern und teilweises Lösen der Bakteriengewebezellen. Das muß aber noch unter der Fermenteinwirkung der Kerne der Zellen selbst erfolgen, denn es erscheint, ebenso wie die Verdauung selbst, von den Bündeln entfernt, die fernen Zonen geben somit ihr Material zuerst ab. Wir möchten daran erinnern, daß das im Grunde genommen völlig einem sich entleerenden Reservebehälter gleicht.

auch bei einem solchen erfolgt die Lösung in den vom Ableitungsgewebe fernen Zonen zuerst. Hierbei sind die Zellen um das Bündel noch als Vermittler tätig.

Die Zellwandungen des Bakteroidengewebes lassen mit Jodjodkali in ihren Wandungen nach Beseitigung aller störenden Stoffe eine leichte Blaufärbung erkennen, wir müssen dabei die Dünne der Wandungen berücksichtigen. Sind die Zellen zusammengedrückt, somit die Schicht der Wandungen dicker, so wird die Bläuung deutlich. Hiernach ist anzunehmen, daß es sich in den Wandungen um Membranen handelt, die dem „Amyloid“-Zustande nahestehen, einer fermentativen Einwirkung also leichter als reine Zellulose zugänglich sind; eine zum mindesten teilweise Lösung der Wandungen wird dadurch verständlich.

Die Lösung der Bakteroiden wendet sich gegen die Außenrinde rascher als gegen die Bündel, es entstehen dabei große Löcher im Knöllchen. Kurz bevor die Stärkezelle der Außenrinde erreicht ist, vollziehen sich chemische Umsätze in der Stärkeschicht, die Stärke wird verzuckert, sofern nicht schon eine Verarbeitung vorher stattgefunden hat. Ob diese schon vorher verbrauchte Stärke zur Verfestigung der Außenrinde verwendet oder zum Teil den Bakterien zugeführt wurde, lassen wir offen, man kann sich jedenfalls beides sehr gut vorstellen. Der letzte Rest der Stärke wird jetzt für die Auflage von Suberinlamellen auf die Zellwandungen verbraucht, sie erfolgt nach Art einer Intercutisbildung in 2—3 Zellen, in denen allein noch Stärke gelagert hatte, man könnte hier von Umbau-Sparstärke sprechen.

Dieselbe Art des Abschlusses befolgen auch die Stärkescheiden um die Bündel, sobald die verdauten Zellen an sie herangerückt sind. Der Vorgang beginnt der Außenwand des Knöllchens genähert und geht langsam gegen die Tragwurzel. Damit wird das Bakteroidengewebe an den nicht perennierenden Zonen völlig abgeschlossen, es bleibt ein leerer Korkbeutel zurück, das ganze Bündel wird zum Absterben gebracht, und damit verlieren die Außenzonen des Knöllchens ihre Nahrungszufuhr. Bei perennierenden Knöllchen erleiden diese Umwandlungen alle Zonen, außer den jüngst angelegten. Hier wird ein Teil des Bakteroidengewebes, welches gerade infiziert ist, gegen das entwickelte Bakteriengewebe durch eine Korkzone abgeschlossen (Fig. 29), die durch eine nur einseitige Auflage von Korklamellen auf die Wandungen gegen die zu verdauenden Zellen hin gebildet wird.

Die Vermehrung der über die Verdauung hin in den Meristemen aufbewahrten Bakterien ist nur sehr gering und wird in der Ruhe-

zeit gänzlich unterbunden, es grenzen an die infizierten Zonen dicht mit Stärke erfüllte spätere Bakteroidenzellen, die trotzdem eine Infektion nicht erkennen lassen, diese erfolgt erst wieder nach der Ruhezeit. Wir werden daher schließen können, daß nicht die Bakterien die Infektion bestimmen, sondern die Pflanze hierzu die *Möglichkeit* gibt. Das Austreiben solcher „Knöllchenknospen“ im Frühjahr erfolgt genau wie das oben geschilderte Wachstum, die Folge ist die Gegenwart zweier Knöllchen, die zwischen sich einen verschrumpften Korkbeutel lassen, die in diesen mündenden Stränge sind durch Wundkorkbildung abgeriegelt worden. Wir finden daher diese Knöllchen warzenähnlich mit ihrer Höckerform. An ganz jungen Wurzelteilen finden sich immer im Herbst noch jugendliche Knöllchen, natürlich weitaus in der Minderzahl. Diese bleiben vollständig von Verdauungserscheinungen verschont und verharren bei perennierenden Lupinen auf diesem Zustande bis zum nächsten Jahre oder gehen an einjährigen Pflanzen mit der Wurzel zugrunde, das ist die einzige Möglichkeit, bei der ich das Zurücktreten der Bakterien in den Boden beobachten konnte. Sonst habe ich nie finden können, daß Bakterien in reichlicher Zahl dem endlichen Schicksal, das die Pflanze bestimmt, entgehen konnten.

Wir haben hiermit die Knöllchenentwicklung bis an ihr Ende verfolgt. Es ist uns gelungen, die Produktion von Fermenten aus dem Zellkern in ganz eindeutiger Weise mit der Auflösung von übergroßen Nukleolen zusammenbringen zu können. So reizend es wäre, die Parallelen mit anderen Fermenterzeugungen im Pflanzenreiche zu ziehen, so völlig gleichend manche Beobachtungen an Insektivorendrüsen, an Orchideenwurzeln u. a. sind, so wollen wir doch darauf verzichten, es würde unsere Arbeit zu sehr anschwellen, ohne doch wirklich Neues hinzuzufügen. Auch meine Arbeit ist in dieser Hinsicht ein Glied in der Kette der Untersuchungen über die Rolle des Nukleolus als Fermentdepot. Ich weise auf die Besprechung der Arbeit KRÜGERS (85) durch ZIEGENSPECK (86) hin, wo er die Theorie entwickelt, und gleichzeitig die Voranzeige meiner Befunde in dieser Hinsicht mitgeteilt werden.

Zusammenfassung

1. Das *Bacterium radicola* dringt in die junge Wurzel durch amyloide Membranstellen der primären Wurzelrinde ein und vermehrt sich dort.

2. Durch den Reiz der Endophyten entsteht durch rasche Zellteilungen in der primären Rinde der Tragwurzel eine Vorwölbung (Galle).

3. Die sich bildende Vorwölbung regt eine ruhende Seitenwurzelanlage zum Austreiben an. Diese stößt vor und drängt das Gallengewebe, den primären Infektionsherd hinaus. Die Bakterien wachsen in Zügen auf dem Wege der Plasmodesmen in die durch die „Gallenmeristemzone“ neugebildeten Parenchymzellen hinein und vermehren sich dort.

4. Das Meristem der vorgetriebenen Seitenwurzelanlage gabelt sich und wächst an den Flanken weiter. Es verschmilzt mit der meristematischen Zone des primären Infektionsherdes und bildet das Knöllchenmeristem, das sich allseitig vermehrt.

5. Das Knöllchenmeristem erzeugt parenchymatische Zellen, die sich in Collenchym, Stärkezellenschicht, Bakteroidengewebe, Stärkeschicht und Stele ausgliedert.

Der Anschluß an die Tragwurzel wird durch eine meristematische Verbindungszone mit dem Cambialgewebe der Wurzel, dem Binde-meristem erwirkt. Dieses bringt parenchymatische Zellen, „das Füllgewebe“, hervor.

6. Das Knöllchenmeristem gabelt sich, der den Bakterien zugewandte Ast wird „unwallt“. Die Bakterien vermögen dem Verwachsen der Meristeme nicht zu folgen und werden durch die Anlage der Stärkezellenschicht in einem zusammenhängenden Gewebe, das von isolierten Stelen durchzogen ist, erfolgreich lokalisiert.

7. Die Meristeme erlöschen bei den einjährigen Pflanzen, die Stelen umfassen das Bakteroidengewebe außen. Bei perennierenden Lupinen bleiben die Meristeme erhalten, um im nächsten Vegetationsjahre durch neues Wachstum die neuen Knöllchen hervorzubringen.

8. Die Bakteroidenzellen werden mit sehr großen Nukleolen angelegt und erhalten sehr viel Stärke mit, die während des Wachstums der Bakterien aufgebraucht wird.

9. Zu Beginn der Blütezeit treten von den ältesten Teilen des Bakteroidengewebes aus eigentümliche Kernveränderungen auf. Der Kern wird lappig und nimmt amöboide Formen an. Der Nukleolus gliedert Körperchen aus, die sich in dem Kern verteilen und in die „Pseudopodien“ des Kernes wandern.

10. Die Körperchen gehen durch die Kernwand, in diesem Zeitpunkte tritt Verflüssigung von Karbolgelatine ein, es treten Verdauungsfermente auf.

11. Die Körperchen verteilen sich, lösen sich allmählich auf unter Lösung der Bakteroiden.

12. Der Nukleolus scheidet immer aufs neue Körperchen ab, wird kleiner und verblaßt vollkommen, wenn der Inhalt der Zelle in eine homogene Flüssigkeit umgewandelt ist.

13. Die Zellsäfte werden durch die Gefäße abtransportiert unter teilweiser Lösung und Zusammenpressen der Zellwänden des Bakteroidengewebes. Die Stärkezellen bilden eine Suberinlamelle aus und schließen das entleerte Bakteroidengewebe dicht als Korksack ab.

14. Die Gefäße werden abgeriegelt und gehen mit den entleerten Knöllchen zugrunde.

15. Bei perennierenden Pflanzen werden die Meristeme mit darin enthaltenen wachstumsfähigen Bakterien durch eine auf die Zellwänden aufgelegte Korklamelle abgeriegelt und so vor den Zersetzungserscheinungen bewahrt. Aus ihnen geht im nächsten Jahre das neue Knöllchen hervor.

Abstract

1. The *Bacterium radicola* enters into the young root through the amyloid membrane spots of the primary root epidermis, and there it propagates.

2. Through the stimulus of the endophyte, by a quick cell division in the primary cortex of the principal root, there originates a bump-like swelling (gall).

3. The thus forming bump stimulates a resting lateral root-meristem to sprout. This pushes forward and expels the gall tissues, the primary hearth of infection. The bacteria grow in lines, in the way of the plasmodesmes, into the parenchym cells, newly formed by the „gall meristem zone“, and there they multiply.

4. The meristem of the sprouted lateral root primordium now forkes itself and growth further to the flanks. It joins the meristemical zone of the primary hearth of infection and forms the bulblet meristem which multiplies in all directions.

5. The bulblet meristem forms parenchymatical cells which separate into collenchym, starch cell layer, bacteroid tissue, starch layer, and vascular bundels. The connection with the principal root is caused by a meristemical connective zone with the cambial tissue of the root, the connective meristem. This again brings forth parenchymatical cells, the „plerome“.

6. The bulblet meristem forkes itself, the branch turned to the bacteria, becomes healed over. The bacteria are not able to follow the growing forth of the meristem and are localised by the forming of the starch cell layer in a connective tissue which is traversed by isolated steles.

7. The meristems die away in the annual plant, the steles surround the bacteroid tissue from outside. In the perennial lupines the meristems remain preserved in order to produce additional bulblets in a new growth of next year's vegetation.

8. The bacteroid cells are formed with very large nucleoli and receive at the same time a large supply of starch which is used up during the growth of the bacteria.

9. In the beginning of the florescence there appear peculiar changes of the nucleus from the older parts of the bacteroid tissue. The nucleus grows lobated and takes an amoeboid shape. The nucleolus divides into little corpuscles which get into the nucleus and invade the „pseudopodies“ of the nucleus.

10. The corpuscles go through the nuclear membrane, at the same time happens a liquefaction of carbol gelatine, there appear, therefore, digestive ferments.

11. The corpuscles divide and gradually dissolve during solution of the bacteroides.

12. The nucleolus constantly expels new corpuscles, is getting smaller and fades completely when the cell volume has been changed into a homogeneous liquid.

13. The cell-saps are removed by the vascular bundles during a partial solution and compression of the cell walls of the bacteroid tissue. The starch cells form a suberin-lamella and closely shut up the emptied bacteroid tissue as a cork sac.

14. The vascular bundles are cut off and die with the emptied bulblets.

15. In the perennial plants the meristems with their contents of living bacteria are shut off by a cork lamella, put on to the cell walls, and in this way are protected of decay. From them new bulblets will arise next year.

Verzeichnis der angeführten Literatur

1. cit. nach MATTIROLLO: Sulla influenza che la estirpazione dei Fiori esercita sui Tubercoli radicali delle Piante Leguminose. *Malpighia* 1899 Bd. 13. S. 382. — 2. cit. nach PARLATORE: Ricerche istologiche sui tubercoli radicali delle Leguminose. *Malpighia* 1899 Bd. 13. S. 211. — 3. cit. nach PRAZMOWSKI: Die Wurzelknöllchen der Erbse. Die Landwirtschaftlichen Versuchsstationen 1890 S. 169. — 4. TREVIRANUS: Über die Neigung der Hülsengewächse zu unterirdischer Knollenbildung. *Botan. Ztg.* 1853 S. 393. — 5. WORONIN: Über die an der Schwarzerle und der gewöhnlichen Gartenlupine auftretenden Wurzelanschwellungen. *Ref. botan. Ztg.* 1866 S. 329. — 6. ERIKSOON: Studien öfver Leguminosennas rotknölar 1874. *Ref. botan. Ztg.* 1874 S. 382. — 7. DE VRIES: Wachstumsgeschichte des roten Klees. *Landwirtschaftliche Jahrbücher* 6, 1877 S. 933. — 8. KNY: Über die Wurzelanschwellungen der Leguminosen und ihre Erzeugung durch Einfluß von Parasiten. *Sitz-Ber. d. bot. Ver. der Prov. Brandenburg. Bot. Ztg.* 1879 S. 57. — 9. FRANK: Über die Parasiten in den Wurzelanschwellungen der Papilionaceen. *Bot. Ztg.* 1879. — 10. PRILLIEUX: Sur la nature et sur la cause de la formation des tubercles sur les racines des Légumineuses. *Bull. Soc. bot. de France. T. 26/1879.* — 11. SCHINDLER: Zur Kenntnis der Wurzelknöllchen der Papilionaceen. *Bot. Centralbl.* 1884/II S. 84. — 12. BRUNCHORST: Über die Knöllchen an den Leguminosenwurzeln. *Ber. d. d. bot. Gesellschaft* Bd. III 1885. — 13. FRANK: Sind die Wurzelanschwellungen der Erlen und Elaeagnaceen Pilzgallen? *Ber. d. d. bot. Gesellschaft* Bd. V 1887. S. 57. — 14. TSCHIRCH: Beiträge zur Kenntnis der Wurzelknöllchen der Leguminosen. *Ber. d. d. bot. Gesellschaft* Bd. V 1887. S. 58. — 15. WIGAND:

Entstehung und Fermentbildung der Bakterien. Marburg 1884, cit. n. TSCHIRCH. — 16. HELLRIEGEL: Tageblatt der Naturforscher-Versammlung in Berlin 1886 S. 290, cit. n. PRAZMOWSKI. — 17. BENECKE: Über die Knöllchen an der Leguminosenwurzel. Bot. Centralbl. 1887. — 18. MATTIROLO und BUSCALIONI: Si contengono bacteri nei tubercoli radicali delle Leguminose? Malpighia I/1887. — 19. VAN TIEGHEM et DOULIOT: Origine, structure et nature morphologique des tubercles radicaux des Légumineuses. Bull. de la Soc. bot. de France XXXV 1888. — 20. WARD: On the tubercular swellings on the roots of *Vicia Faba*. Philos. Transact. of the Roy. Soc. of London 1887. Ref. bot. Centralbl. 1888. — 21. VUILLEMENT: Les tubercles radicaux des Légumineuses. Journ. de Bot. Nancy 1888. — 22. LUNDSTROEM: Über Mykodomatien an den Wurzeln der Papilionaceen. Bot. Centralbl. 1888 S. 185. — 23. BEYERINCK: Die Bakterien der Papilionaceenknöllchen. Verzamelde Geschriften Delft. 1921, tweede Deel S. 155. — 24. BEYERINCK: Verzamelde Geschriften Delft. 1921, tweede Deel 321. — 25. HELLRIEGEL: Welche Stickstoffquellen stehen der Pflanze zu Gebote? Tageblatt der 59. Versammlung deutsch. Naturforscher und Ärzte in Berlin 1886. — 26. HELLRIEGEL: Zeitschrift des Vereins für die Rübenzuckerindustrie, November 1888. — 27. HELLRIEGEL und WILFARTH: Erfolgt die Assimilation des freien Stickstoffs durch die Leguminosen unter Mitwirkung niederer Organismen? Ber. d. d. bot. Gesellschaft 1889. — 28. FRANK: Untersuchungen über die Ernährung der Pflanze mit Stickstoff. Landw. Jahrbücher 1888. — 29. FRANK: Zur Kenntnis der Assimilation elementaren Stickstoffs. Ber. d. d. bot. Gesellschaft 1889. — 30. FRANK: Über den experimentellen Nachweis der Assimilation freien Stickstoffs durch erdbewohnende Algen. Ber. d. d. bot. Gesellschaft 1889. — 31. DELPINO: Malpighia 1889. — 32. BERTHELOT: Comptes rendues 1888 S. 569. — 33. PRAZMOWSKI: Die Wurzelknöllchen der Erbse. Die landwirtschaftl. Versuchsstation 1890 S. 169. — 34. FRANK: Über die Pilzsymbiose der Leguminosen, vorläufige Mitteilung. Ber. d. d. bot. Gesellschaft 1889 Heft 8. — 35. FRANK: Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. Landwirtschaftl. Jahrbücher 1890 S. 523. — 36. MÖLLER: Bemerkungen zu Franks Mitteilung über den Dimorphismus der Wurzelknöllchen der Erbse. Ber. d. d. bot. Gesellschaft 1892, 10 S. 246. — 37. BEYERINCK: Künstliche Infektion von *Vicia Faba* mit *Bac. radicum*, Ernährungsbedingungen dieser Bakterien. Bot. Ztg. 1890 Bd. 52. S. 838. — 38. BRÉAL: Expériences sur la culture des Légumineuses, Ann. agronom. Tome XV Nr. 12/1889. — 39. WAGENER: Deutsche Landwirtschaftliche Presse 1893. — 40. PFEIFFER und FRANKE: Beitrag zur Frage der Verwertung elementaren Stickstoffs durch den Senf. Die Landwirtschaftlichen Versuchsstationen 1895 Bd. 46. S. 117. — 41. AEBY: Beitrag zur Frage der Stickstoffernährung der Pflanzen. Die Landwirtschaftlichen Versuchsstationen 1895 Bd. 46. — 42. NOBBE und HILTNER: Vermögen auch Nichtleguminosen freien Stickstoff aufzunehmen? Landw. Versuchsstation. 1895 Bd. 45. S. 155. — 43. FRANK: Die Assimilation freien Stickstoffs bei den Pflanzen in ihrer Abhängigkeit von Spezies, von Ernährungsverhältnissen und von Bodenarten. Landwirtschaftliche Jahrbücher 21, 1892 sowie Ber. d. d. bot. Gesellschaft Juli 1891 S. 1. — 44. BERTHELOT: Fixation de l'azote par la terre végétale nue, ou avec le concours des Légumineuses. Comptes rendues hebdomadaires des séances de l'academ. des sciences Paris 1889. Ref. bot. Ztg. 1890 S. 209. — 45. NOBBE, SCHMID, HILTNER und HOTTER: Versuche über die Stickstoffassimilation der Leguminosen. Landwirtsch. Versuchsstation. 39, 1891.

- S. 327. — 46. NOBBE, SCHMID, HILTNER und HOTTER: Über die Verbreitungsfähigkeit der Leguminosenbakterien im Boden. Landwirtsch. Versuchsstation. 41, 1892. S. 138. — 47. FRANK: Über den Dimorphismus der Wurzelknöllchen der Erbse. Ber. d. d. bot. Ges. 1892. S. 170. — 48. MÖLLER: Entgegnung gegen Frank, betreffend den angeblichen Dimorphismus der Wurzelknöllchen der Erbse. Ber. d. d. bot. Ges. 1892. S. 568. — 49. KOCH: Zur Kenntnis der Fäden in den Wurzelknöllchen der Leguminosen. Bot. Ztg. 1890. S. 607. — 50. BEYERINCK: Über die Natur der Fäden der Papilionaceenknöllchen. Verzamelde Geschriften Delft 1921. Derde Deel, S. 49. — 51. SCHLÖSING et LAURENT: Sur la fixation de l'azote gazeuse par les Légumineuses. Compt. rend. 1890. — 52. LAURENT: Recherches sur les nodosités radicales des Légumineuses. Ann. de l'Inst. Pasteur. S. 124. — 53a. PETERMANN: Contribution à la question de l'azote. Prem. note, Mém. couronnés et autr. Mém. publ. par l'acad. roy. de Belg. XIV Bruxelles 1890. Ref. bot. Centralbl. 1892. S. 51. — 53b. PETERMANN: Contribution à la question de l'azote. Sec. note, ibidem 1892. Ref. bot. Centralbl. 1893. — 54. PROVE: Untersuchungen über die Stickstoffnahrung der Erbsen. Ztschr. d. Landw. Verein in Bayern 1892. S. 85. Ref. bot. Centralbl. 1893. S. 186. — 55. SALFELDT: Die landwirtschaftliche Presse 1892. S. 648. — 56. KOSSOWITSCH: Durch welche Organe nehmen die Leguminosen den freien Stickstoff auf? Bot. Ztg. 50, 1892. S. 98. — 57. FRANK: Über die auf den Gasaustausch bezüglichen Einrichtungen und Tätigkeit der Wurzelknöllchen der Leguminosen. Ber. d. d. bot. Ges. 10, 1892. S. 271. — 58. NOBBE, HILTNER, SCHMID: Versuche über die Biologie der Knöllchenbakterien der Leguminosen, insbesondere über die Frage der Arteinheit derselben. Die Landwirtschaftl. Versuchsstation. 45, 1895. S. 1. — 59. GONNERMANN: Die Bakterien in den Wurzelknöllchen der Leguminosen. Landw. Jahrbücher 23, 1894. S. 649. — 60. FERNBACH: De l'absence des microbes dans les tissus végétaux. Annal. de l'Inst. Pasteur 1888. — 61. LAURENT: Sur l'existence de microbes dans les tissus des plantes supérieures. Bull. de l'ac. roy. de Belg. I X. S. 38. I XIX. S. 468. — 62. RUSSEL: Bacteria in their relation to vegetable tissues. Ref. bot. Centr. Bl. 1894. S. 375. — 63. ZINSSER: Über das Verhalten von Bakterien, insbesondere von Knöllchenbakterien in lebenden pflanzlichen Geweben. Pringsh. Jahrb. 30, 1897. S. 423. — 64. PARLATORE: Ricerche istologiche sui tubercoli radicali delle Leguminose. Malpighia 13, 1899. S. 211. — 65. SCHNEIDER: The morphology of root tubercles of Legum., The American Naturalist, 1892. Ref. bot. Centralbl. 1894. — 66. PARLATORE: Sul polimorfismo del Bacillus radicolica Bey. Malpighia 15, 1901. S. 176. — 67. PARLATORE: Ricerche su la struttura e le alterazioni del nucleo nei tubercoli radicali delle Leguminose. Malpighia 15, 1901. S. 178. — 68. MATTIROLO: Sulla influenza de la estirpazione dei Fiori esercita sui Tubercoli radicali delle Piante Leguminose. Malpighia 13, 1899. S. 382. — 69. PEIRCE: The Root-Tubercles of Bur Clover and of some other Leguminous plants Proceed. of the Californ. academ. of sciences, third ser., Botany. Vol. II. Nr. 10. — 70. CZAPECK: Zur Lehre von den Wurzelabscheidungen. Pringsh. Jahrb. Bd. 29, 1896. — 71. STEFAN: Studien zur Frage der Leguminosenknöllchen. Centralbl. f. Bact. 2. Abt., Bd. 16. S. 131. — 72. WENDEL: Zur physiologischen Anatomie der Wurzelknöllchen einiger Leguminosen. Beiträge zur allgem. Botanik 1917. Bd. I. S. 150. — 73. KRÜGER: Beiträge zur Artenfrage der Knöllchenbakterien einiger Leguminosen. Diss. Leipzig 55, 1913. Ref. bot. Centralbl. 1915. S. 576. — 74. KRIEGER: Beiträge zur Kenntnis der Artenfrage der Knöllchenbakterien

einiger Leguminosen. Diss. Leipzig 1914. Ref. bot. Centralbl. 1915, Bd. 130. — 75. VOGEL und ZIPFEL: Centralbl. f. Bakteriologie, 11, 1921. Bd. 54. S. 13. — 76. GERMAN und DIDLAKE: Versuche in Kentucky über die Impfung von sechs Arten von Knöllchenbakterien auf die wichtigsten Leguminosen. Intern. agrikultur. techn. Rundschau VII. S. 399. 1916. Ref. bot. Centralbl. 1917. S. 391. — 77. LIESKE: Ber. d. d. bot. Gesellschaft 1920. S. 358. — 78. BOAS und MERKENSCHLAGER: Die Lupine als Objekt der Pflanzenforschung. Verlag Paul Parey, Berlin 1923. — 79. BEYERINCK: The Significance of the tubercle bacteria of the Papilionaceae for the host plant. Verzamelde Geschriften, Delft 1922. vijfde Deel. S. 264. — 80. MÜLLER: Metakutisierung der Wurzelspitze. Bot. Ztg. 1906, Bd. 64. Heft 2. — 81. KLEIN und KISSER: Die sterile Kultur der höheren Pflanzen, Jena, Verlag von G. Fischer, 1924. — 82. NORDHAUSEN: Pringsh. Jahrb. 44. S. 562. 1907. — 83. STRASBURGER: Das botanische Praktikum. Jena, Verlag von G. Fischer, 1913. — 84. GOEBEL: Organographie 3. Bd. — 85. KRÜGER: Die Rolle des Kerns im Zellgeschehen. Naturwissenschaften XV 1926, Heft 47. S. 1021 bis 1029. — 86. Mez, Archiv, Echo. S. 173 f.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Botanisches Archiv. Zeitschrift für die gesamte Botanik](#)

Jahr/Year: 1929

Band/Volume: [25](#)

Autor(en)/Author(s): Viermann Herbert

Artikel/Article: [Die Wurzelknöllchen der Lupine 45-86](#)