

Ueber experimentelle Systematik der Blütenpflanzen.

Von E. Hannig.

Die Systematik hat zwei verschiedene Aufgaben zu lösen, eine praktische und eine theoretische, die Identifizierung der Arten und die Ermittlung ihres Zusammenhangs. Die erste ist gelöst, wenn alle Arten in irgend einer Weise so geordnet sind, dass sie sich bestimmen lassen, für die zweite kann es keine strenge Lösung geben, weil die Wurzeln dieses Problems in der Vergangenheit liegen und daher der direkten Untersuchung unzugänglich sind. Sie war ihrer Deutung nach immer von den naturphilosophischen Anschauungen der Zeit abhängig und bedeutet jetzt, und zwar seit Darwin, so viel wie die Aufgabe, den entwicklungsgeschichtlichen Zusammenhang oder die Stammesverwandtschaft der kleineren und grösseren Pflanzengruppen, der Sippen, so weit als möglich festzustellen.

Diese Aufgabe versuchte man zunächst durch Vergleich der Gliederung der Pflanzen, also morphologisch, zu lösen. Im weiteren Sinne gehört zu der morphologischen Untersuchung auch die Berücksichtigung des anatomischen Baues, der Kernverhältnisse (Chromosomenzahl) usw. und schliesslich auch der Palaeophytologie.

Auf vergleichender Untersuchung, nicht der Gliederung, sondern eigentümlicher chemischer Bestandteile, beruht eine weitere Hilfsmethode, die phytochemische, mittels deren sich in manchen zweifelhaften Fällen verwandtschaftliche Beziehungen feststellen lassen¹⁾.

Seit einigen Jahren ist der Begriff der experimentellen Systematik aufgekommen: es sollen an Stelle der theoretischen Konstruktionen experimentell ermittelbare Verwandtschaftsnachweise treten.

Es gibt in der Tat eine einwandfreie Methode des Verwandtschaftsnachweises auf experimenteller Grundlage, die genetische. Durch Bastardierungen oder durch experimentelle Veränderung des Genoms einer Pflanze lassen sich unter Umständen natürliche Arten künstlich herstellen und so die verwandtschaftlichen Beziehungen von Arten untereinander, günstigenfalls auch von Gattungen zu Gattungen vollständig aufdecken. Bei dem vielfältigen Ineinandergreifen von Kreuzungen und der Komplikation durch Mutationen könnten aber praktisch nur verschwindend wenige Fälle vollkommen geklärt werden und diese würden nur die Beziehungen

1) Vgl. z. B. Jaretzki, R., Die Bedeutung der „Phytochemie“ für die Systematik. Ber. d. d. pharm. Ges. 1928, Heft 8.

der kleineren und jedenfalls nur jetzt noch existierender Sippen, nicht die phylogenetischen Zusammenhänge der grossen Pflanzengruppen betreffen. Es könnte auf diese Weise innerhalb eines Systems hier und da eine Ordnung im Kleinen erzielt, nicht aber ein ganzes System aufgebaut werden.

Diese letztere, eigentliche Aufgabe der Systematik ist in neuerer Zeit auf einem anderen, auch als „experimentell“ bezeichneten Wege, nämlich durch biochemische Analyse der Eiweisskörper mittels der von der Medizin her bekannten serologischen Methoden in Angriff genommen worden. Es stehen sich somit für den Aufbau des Systems der höheren Pflanzengruppen, der Pflanzenfamilien, zur Zeit zwei Methoden gegenüber, die morphologische und die serologische. Es wird oft übersehen, dass kein ausschliessender Gegensatz zwischen diesen beiden Methoden besteht: ohne Vorarbeit d. h. ohne den Unterbau der morphologischen Familiensystematik wäre die serologische nicht denkbar. Um zeigen zu können, worin die Schwierigkeiten der morphologischen Systematik bestehen, müssen wir kurz auf das Wesen der morphologischen Methode eingehen.

Die nachdarwinistische Ordnung der Pflanzensippen gründet sich auf der Annahme, dass die Pflanzenwelt sich aus wenigen einfachen Formen durch allmähliche Veränderungen zu vielen mannigfaltigen, zum Teil sehr hoch ausgebildeten Gruppen entwickelt hat, und auf der weiteren Annahme, dass sich bis in unsere Zeit sowohl niedrige als auch höhere und höchststehende Stufen dieser Entwicklung nebeneinander erhalten haben. Die allmählichen Veränderungen kommen in erster Linie in der äusseren Gestalt, in der Morphologie, zum Ausdruck. Gewisse Erscheinungen, wie z. B. die sogenannten Anpassungserscheinungen, sind dabei im allgemeinen von den phylogenetischen Veränderungen unabhängig, andere sind dagegen von besonderer Bedeutung. Entscheidenden Wert für die Gruppierung haben, wie zuerst Linné auf Grund unendlich vieler Einzeluntersuchungen festgelegt hat, die Stellung, Zahl und Anordnung der Sexualblätter der Blüten und ihrer Hüllen, also der Fruchtblätter und Staubblätter, ferner der Blütenblätter und Kelchblätter, während die vegetative Gliederung erst in zweiter Linie in Frage kommt.

Eine vergleichend-morphologische Untersuchung der jetzigen Blütenpflanzen zeigt, dass die phylogenetische Entwicklung im Laufe der geologischen Epochen einen Typus der höheren Pflanzen hervorgebracht hat¹⁾, um den sich die ganze Mannigfaltigkeit der-

1) Von der Spaltung in zwei unabhängige Reihen (Dikotylen und Monokotylen) können wir hier absehen.

selben gruppieren lässt. Das sind Blütenpflanzen mit einer doppelten Blütenhülle, in der Kelch und Krone unterschieden sind, in der Kelchblattkreis und Blumenblattkreis fünfzählige, alternierende Wirtel darstellen, in der zwei fünfzählige Staubblattkreise mit einander abwechselnd stehen und die schliesslich einen fünfgliedrigen Fruchtblattkreis besitzen.

Ein grosser Teil der übrigen Blütenpflanzen zeigt einfacheren Blütenbau: nur eine Blütenhülle, überhaupt keine Blütenhülle, weniger gegliedertes Androeceum oder Gynoeceum, also anscheinend primitive Merkmale; andere Pflanzen weisen komplizierteren Bau auf: Verwachsungen innerhalb der einzelnen Kreise oder von Kreisen untereinander, unterständigen Fruchtknoten, nicht strahligen, sondern symmetrischen Bau (Zygomorphie) oder auch ausgesprochene Anpassungen an besondere Bestäubungsverhältnisse usw., also anscheinend progressive Merkmale. Jene müssten als Vorläufer des fünfzähligen Typus, diese als abgeleitete, also später entstandene Veränderungen betrachtet werden, — wenn die Entwicklung einen graden Weg vom einfachen über den fünfzähligen zum metamorphisierten Typus gegangen wäre.

Die Schwierigkeit der morphologischen Systematik liegt darin, dass der Weg nicht immer „nach vorn“, d. h. zu höherer Organisation, sondern häufig auch nach rückwärts, zu Vereinfachungen der Gliederung geführt hat, und dass schliesslich auf Gabelästen des Entwicklungsweges an den verschiedensten Stellen und in verschiedenen Blütenkreisen unabhängig voneinander progressive und regressive Merkmale aufgetreten sind.

Nur wenn sich die progressiven Merkmale häufen, kann mit einiger Sicherheit von hochstehenden Formen gesprochen werden; nach dem Grade der Häufung kann man zunächst nur die Stufung der Organisationshöhe abschätzen und mit einiger Wahrscheinlichkeit höhere und höchststehende Formen unterscheiden; daneben zeigt der Grad der Ähnlichkeit ev. die grössere oder geringere Verwandtschaft an.

Wo sich aber primitive Merkmale zeigen oder in grösserer Menge beisammen finden, lässt sich, wie die Erfahrung gelehrt hat oft überhaupt nicht mit Bestimmtheit entscheiden, ob primitive oder regressive Merkmale, ob diese je nur für sich oder ob sie gemischt vorliegen. Deshalb kann man wohl ungefähr den mittleren Typus der Blütenpflanzen und einigermassen auch die folgenden höheren Abstufungen, aber nicht mit ebensolcher Wahrscheinlichkeit die einfacher gegliederten Typen zusammenfassen. Schliesslich bleibt auch dann, wenn kein entschiedenes Vorwiegen bestimmter Merkmalsgruppen vorhanden ist, die Stellung der Organisationshöhe noch unsicher. Selbst wenn gewisse Gruppen, wie z. B. die Poly-

gonaceen und Caryophyllaceen auf Grund weitgehender Übereinstimmung in der Gliederung als verwandte Familien betrachtet werden müssen, lässt sich nicht beweisen, welche von zwei solchen Gruppen die ältere und welche die abgeleitete ist. Es ist also im Grossen und Ganzen unmöglich einen sicheren linearen Zusammenhang, einen sogenannten Stammbaum mittels der morphologischen Methode zu rekonstruieren.

Die systematische Stellung vieler Familien ist somit für die morphologische Systematik deshalb nicht eindeutig, weil an verschiedenen Stellen im Verlauf der phylogenetischen Entwicklung dieselben progressiven oder dieselben regressiven Merkmale aufgetreten sind und sogar an ein und derselben Blüte in mannigfaltiger Weise kombiniert sein können. Als erschwerende Umstände für die morphologische Beurteilung treten hierzu noch die vielen Lücken in den Entwicklungsreihen, die teils durch Aussterben von Formen, teils durch noch ungenügende Kenntnis der vorhandenen Formen bedingt sind.

Man wird sich fragen, wie es möglich sein soll, diese Schwierigkeiten auf dem Wege der einfachen serologischen, d. h. chemischen Analyse zu überwinden.

Es wäre denkbar, dass die chemischen Eigenschaften der Protoplasten und zwar insbesondere ihrer Eiweissbestandteile den phylogenetischen Zusammenhang der Sippen reiner zum Ausdruck bringen, als ihr Bau. Es müssten dann für systematische Untersuchungen alle Pflanzen in der gleichen Weise, wie sie bisher morphologisch verglichen wurden, zur Feststellung ihrer verwandtschaftlichen Beziehungen eiweisschemisch analysiert und verglichen werden. An derartige direkte Untersuchungen kann aber überhaupt nicht gedacht werden. Einmal wäre das eine so ausgedehnte Arbeit, dass in absehbarer Zeit ausreichende Ergebnisse nicht gesammelt werden könnten, dann aber ist die Eiweisschemie bis jetzt überhaupt noch nicht so weit, dass sie mit Sicherheit die verschiedenen pflanzlichen Proteine isolieren und bestimmen kann.

An Stelle der rein chemischen ist daher eine biochemische, indirekte Analyse angewendet worden, die schon genannte aus der Immunforschung stammende serologische Methode.

Sie geht, um an Bekanntes anzuknüpfen, zurück auf Versuche von Behrings in den 90er Jahren.

von Behring hatte Diphtheriegift in die Blutbahn von Pferden injiziert und gefunden, dass das Serum des Tierblutes ein Gegen Gift gegen das Bakteriengift erzeugt, das nur dieses Gift neutralisiert, also spezifisch ist. In ähnlicher Weise wehrt sich der Tierkörper gegen Bakterien, die in die Blutbahn eingepflegt werden; er ballt eine Aufschwemmung gleichartiger Bakterien im Reagensglas zu-

sammen. Auch diese Gegenwirkung trifft nur die zur Injektion benutzten Bakterien, sie ist ebenfalls spezifisch. Werden statt der Bakterien selbst filtrierte Extrakte eingespritzt, welche die gelösten bazillären Eiweisskörper enthalten, so treten wieder entsprechende Gegenwirkungen im Serum des behandelten Tieres auf, die zu der bazillären Proteinlösung hinzugesetzt, in dieser einen Niederschlag, ein Praezipitat erzeugen. Diese Stoffe heissen Praezipitine. Auch sie sind spezifisch. Schliesslich zeigte sich, dass auch Milcharten, tierische Eiweissarten und pflanzliche Eiweisskörper spezifische Praezipitine bilden. Es ist ein unbestreitbares, grosses Verdienst von Mez, diese Eigenschaft des Serums als allgemeine Eigenschaft in Bezug auf pflanzliche Eiweisskörper nachgewiesen zu haben¹⁾. Wir können heute sagen, dass das Blutserum der Tiere die fast unbegreifliche Fähigkeit besitzt, gegen jede Art von tierischem und pflanzlichem Eiweiss einen Gegenkörper zu bilden.

Wir nennen diese spezifischen Gegenkörper auch Antikörper, die Eiweisstoffe, welche ihre Bildung verursachen, Antigene. Die Reaktionen, durch welche die Bildung solcher Gegenkörper nachgewiesen wird — es gibt noch eine Reihe anderer als die genannte Praezipitinreaktion — können wir, weil sie spezifisch sind, Identitätsreaktionen nennen.

Uhlenhut, dem wir die äußerst sorgfältige Ausarbeitung der Praezipitinreaktion verdanken, ist aber schon auf eine Ausnahme von der Spezifitätsregel gestossen, und gerade diese ist es, die für unsere Untersuchungen die Grundlage bildet.

Uhlenhut fand, dass die Sera von Tieren, die mit menschlichem Blut behandelt waren (Immunsera), nicht nur mit dem Blut von Menschen, sondern auch mit dem Blut von Affen, ja von noch weniger nahestehenden Säugetieren, typische Praezipitate gaben. Bei weiterer Untersuchung zeigte sich, dass auch andere Antikörper sich ähnlich verhalten.

Es handelt sich hierbei aber nur scheinbar um eine Ausnahme, wie Uhlenhut selbst schon festgestellt hat. Es ergab sich nämlich, dass bei der Serumreaktion der quantitative Ausfall ebenso beachtet werden muss wie der qualitative. Man bestimmt den Wirkungswert der praecipitierenden Immunsera dadurch, dass man entweder das Serum oder das Antigen so weit verdünnt, bis das Immunserum mit dem zugehörigen Antigen keine Reaktion mehr gibt. Sera, die noch in Verdünnungen der Antigene 1 : 20000, 1 : 40000, ja 1 : 80000 praecipitieren, können in vielen Fällen bei sachgemäsem Impfverfahren leicht erhalten werden.

1) Vgl. Mez u. Gohlke, Cohns Beitr. z. Biol. d. Pfl. 1913, 12 u. die Arbeiten seiner Schüler im Bot. Arch. 1922—28.

Vergleicht man nun die Verdünnungsgrade, bei denen einerseits das zum Immunisieren verwendete Blut, andererseits das Blut eines verwandten Tieres noch gerade praezipitiert, so findet man ganz konstante Differenzen, während bei nicht verwandten bzw. sehr fernstehenden Tiergruppen überhaupt keine Reaktion eintritt. Da die Reaktionen, welche schwächer sind als die Identitätsreaktionen nur mit verwandten Tierarten auftraten, bezeichnete man sie als Verwandtschaftsreaktionen.

Diese Bezeichnung stünde auf schwachen Füßen, wenn sie nicht noch besonders begründet worden wäre.

Ein englischer Immunforscher, Nuttal, hat (1904) mit Hilfe der Praecipitiummethode an 900 verschiedenen Blutsorten mit 30 verschiedenen Antiseris die verwandtschaftlichen Beziehungen in der Säugetierreihe untersucht. Er fand dabei, dass in Uebereinstimmung mit der morphologischen Systematik, starke Niederschläge nahe Verwandtschaft bedeuten, dass die Verwandtschaft um so ferner ist, je schwächer die Praecipitinreaktion ausfällt.

Erst auf Grund dieser Untersuchungen, deren Resultate in der Tat im Allgemeinen mit denen der morphologischen Systematik übereinstimmten, kann man mit einem gewissen Recht von einer Verwandtschaftsreaktion sprechen. Gleiche Beweiskraft, wie etwa rein chemischen Reaktionen, könnte aber diesen Verwandtschaftsreaktionen erst auf Grund einer weit exakteren Beweisführung zuerkannt werden.

Es war ganz selbstverständlich, dass nun die Frage entstand, ob sich mit pflanzlichem Eiweiss analoge Reaktionen ausführen liessen wie mit dem Blut der Säugetierreihe, und ob ihnen ähnliche Bedeutung zukommt.

Zum ersten Mal ist der Berliner Botaniker Werner Magnus (1906)¹⁾ in Gemeinschaft mit dem medizinischen Physiologen Friedenthal an diese Frage herangetreten. Er untersuchte unter anderem eine grössere Anzahl von Gräsern und fand, dass diejenigen Immunsera, die durch sehr oft wiederholte Impfung (bis zu $\frac{3}{4}$ Jahren) gewonnen waren, mit allen übrigen Gras-Antigenen, aber mit keinem Eiweiss aus irgend einer anderen Familie Praecipitinreaktion gaben. Von fremden Familien hat er jedoch nur 6 Gattungen geprüft. Seine allgemeine Schlussfolgerung, dass man die serologische Methode benützen könne, um die Stellung kritischer Arten in den Familien zu bestimmen, war auf Grund von so wenigen Versuchen nicht berechtigt.

Im Jahre 1913 hat Mez das Problem wieder aufgenommen und auf breiterer Grundlage die allgemeine Frage zu beantworten

1) Ber. d. d. bot. Ges. 1906 u. 1908.

versucht, ob die serologische Methode für den Nachweis der Familienverwandtschaft der Blütenpflanzen brauchbar und zuverlässig sei. „Sollte die Methode sich als brauchbar erweisen, so musste zunächst nachgewiesen werden, dass sie in keinem einzigen Falle wirklich unzweifelhafter Verwandtschaft versagte“ und dass sie bei unzweifelhaft fehlender Verwandtschaft negativ ausfiel.

Auf Grund von über 200 verschiedenen Reaktionen mit 10 verschiedenen Immunseris bejahte Mez' Schüler Gohlke diese Frage. Alle geprüften pflanzlichen Eiweissarten hatten, wie die Blutarten bei Nuttal, Praezipitinreaktion gegeben und alle Praezipitinreaktionen standen mit den systematischen Ergebnissen in Einklang. Mez schloss daraus, dass auch für pflanzliches Eiweiss die Praezipitinreaktion den Wert einer Verwandtschaftsreaktion habe. Nach dem Umfang der ersten Versuche war es wahrscheinlich, dass die Methode ganz allgemein für das ganze Pflanzenreich anwendbar war.

Mez ist mit ausserordentlicher Energie darangegangen, das ganze Pflanzenreich serologisch durchzuarbeiten. Mit Hilfe einer grösseren Anzahl von Schülern hat er seit dem Jahre 1913 zuerst die Blütenpflanzen, dann die Gymnospermen, schliesslich auch die Moose, Algen und Bakterien, wie er selbst sagt in hunderttausenden von Reaktionen untersuchen lassen und auf Grund dieser Untersuchungen den sog. „Königsberger diagnostischen Stammbaum“ aufgestellt, der mit aller Entschiedenheit den Anspruch erhebt, die wirklichen phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen der Pflanzenfamilien darzustellen.

Das Gerüst der bisherigen morphologischen Anordnung war im Laufe von etwa 150 Jahren aufgebaut, das Ergebnis ein Wahrscheinlichkeitssystem, das sich in manchen Zügen in dem Masse ändern wird, wie die Kenntnis der Pflanzenwelt zunimmt kein phylogenetisches Verwandtschaftssystem, sondern bestenfalls eine Anordnung der Familien, teils nach der ungefähren Organisationshöhe, teils nach undurchsichtigen Verwandtschaftsbeziehungen. Von Mez wird in wenigen Jahren experimentel in System konstruiert, dass das Geheimnis der Entwicklung im Laufe der Gesamtgeschichte der Pflanzenwelt vollständig enthüllen soll. Das wäre in der Tat ein Fortschritt, der sich mit allen anderen Leistungen in der Biologie messen könnte; es wäre nebenbei zugleich ein experimenteller Beweis der Entwicklungstheorie.

Wenn viele Jahre hindurch die Systematiker und überhaupt die Botaniker die experimentelle Systematik der Königsberger Schule fast allgemein ablehnten, hat das seinen Grund darin, dass die experimentelle Grundlage der Mez'schen Versuche nicht in überzeugender Weise ausgearbeitet war, ein Bedenken, das sich

wesentlich verstärkte, als auch der Stammbaum der Algen ohne Benützung von Reinkulturen aufgestellt wurde.

Die Brauchbarkeit der serologischen Methode für den Nachweis der Familienverwandtschaft ist erst in letzter Zeit auch von anderer Seite untersucht worden (Gilg. E. und Schürhof, P. N. und deren Schüler; Hannig und Slatmann¹). Es ist aber, um das gleich vorweg zu nehmen, bei diesen Arbeiten weder gelungen, die Ergebnisse der Mezschen Schule zu bestätigen, noch mit Sicherheit zu ermitteln, worauf die Verschiedenheit der beiderseitigen Resultate beruht²).

Der Nachweis der Präzipitinreaktion, die neben der Konglutinationsmethode von der Mezschen Schule verwendet wurde³), geschieht entweder in der Weise, dass man Immuserum und Antigenlösung miteinander mischt, oder dadurch, dass man über das spezifisch schwerere Immuserum vorsichtig die Antigenlösung überschichtet. Im ersteren Falle entsteht bei positiver Reaktion sogleich eine Trübung, dann bildet sich ein Niederschlag; im zweiten Falle tritt sofort an der Berührungsfläche von Immuserum und Antigen eine grauweiße milchige Trübung auf, welche die positive Reaktion anzeigt. Die erste Methode bezeichnet man als Misch-, die zweite als Ringprobe.

Mez hat nach anfänglicher Verwendung die Ringprobe fallengelassen und für die Präzipitinreaktion nur noch die Mischprobe verwendet. Er beobachtete aber die Reaktionen nicht, wie das sonst in der serologischen Technik üblich ist, gleich nach der Mischung, sondern erst nach 12-stündigem Stehenlassen im Brutschrank.

Bei der Nachprüfung dieses Verfahrens fanden sowohl Gilg und Schürhoff als wir, dass in den meisten Fällen die Kontrollversuche mit Normalserum ebenfalls Trübungen und Ausfällungen zeigten. Von 86 Reaktionen mit 34 Antigenen, die Herr Dr. Slatmann nach der Mezschen Vorschrift angestellt hatte, mussten 64, also rund 75⁰/₁₀₀ ausgeschieden werden.

1) Die wichtigste Lit. auch für später genannte Autoren s. *Planta* 1928, 5, 158 ff. u. 6, 312 ff.

2) In einer nach Abschluss des Vortrags erschienenen Untersuchung hat O. Moritz (*Biol. Zentrbl.* 48, 1928) diese Frage theoretisch behandelt. Wir müssen die von ihm angekündigten Experimentaluntersuchungen abwarten, ehe wir auf seine Erklärungsversuche eingehen können.

3) Die Mezsche Konglutinationsmethode, die eine Abänderung der Präzipitationsmethode darstellen soll, lassen wir der Einfachheit halber ausser acht. Sie müsste ja in ihren Resultaten mit der Präzipitationsmethode übereinstimmen; ausserdem sind gegen dies Verfahren noch besondere Bedenken zu erheben.

Sowohl die Schüler von Gilg und Schürhoff als auch wir haben deshalb das Mischungsverfahren nach der Mezschen Vorschrift aufgegeben und das in der forensischen Praxis bevorzugte Ringverfahren, neuerdings in Rörchen von ca 3 mm lichter Weite, benutzt.

Bei der Anwendung des Ringverfahrens tritt aber noch eine technische Schwierigkeit auf.

Die Praecipitinreaktion beruht darauf, dass einmal Immuns serum, zu der unerlässlichen Kontrolle aber auch Normalserum mit der zu untersuchenden Eiweisslösung in Reaktion gebracht wird. Nur wenn das Normalserum keine Reaktion gibt, bei dem Immuns erum aber Trübungen auftreten, kann von einer Immunreaktion gesprochen werden. Nun zeigte sich aber, dass die meisten pflanzlichen Eiweisse schon mit Normalserum Ringreaktion geben. Von 50 Antigenen beispielsweise, die wir anfangs daraufhin prüften, waren nur 5 beim Überschichten mit Normalserum klar geblieben. Die Normalringe verschwinden allerdings zum Teil schon in schwächeren Verdünnungen, während die Immunringe mehr oder weniger weit reichen. Bei einer grossen Zahl von Antigenen ist aber die Normalringbildung so stark, dass auch bei den letzten Verdünnungen, in denen Immunringe auftreten, die Kontrollverdünnungen des Normalserums ebenso starke Ringe bilden. In diesen Fällen lässt sich also nicht mehr feststellen, ob Immunisierung vorliegt.

Wir haben daher zunächst versucht, die störenden Normalringe auszuschalten.

Als geeignetes Mittel dafür fanden wir Zusatz von Kaliumphosphat mit dem $p_{\text{H}} = 6,5$ bei Verwendung von weiten Rörchen (9 mm l. Weite) und Ammoniumphosphat mit dem $p_{\text{H}} = 6,0$ bei Verwendung von engen Rörchen (2–3 mm l. Weite).

Die folgende Tabelle zeigt die Reaktionen ohne Phosphat und mit Phosphat.

Ohne Phosphat treten im Normalserum bis zur Verdünnung 1:1600 Ringe auf, mit Phosphat bleibt das Normalserum überall klar, während die Immunreaktion unverändert abläuft.

Während bei dem Verfahren von Gilg und Schürhoff für eine ganze Reihe von Pflanzenpulvern wegen des Auftretens von Normalringen die Immunreaktionen nicht ausgewertet werden konnten, ist die Phosphatmethode nicht nur auf alle Fälle anwendbar, sondern, wie sich weiterhin ergab, auch empfindlicher als die Reaktionen mit ungepufferten Lösungen.

Nachstehende Tabelle zeigt zugleich, dass das Auftreten von Normalringen bei dem üblichen Verfahren ohne Phosphat die Zuverlässigkeit der Immunreaktionen in keiner Weise beeinflusst. Für die grundsätzliche Frage, ob die serologische Methode für die

Titerbestimmung von Helianthus-Immunserum, a) mit Phosphat, b) ohne Phosphat.

I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400

a) Mit Phosphat

	Je 0.1 ccm Immunserum						Je 0,1 ccm Normalserum					
0'	+ ±	+ ±	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—
10'	+ ±	+ ±	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—
30'	+ ±	+ ±	+	+	±	±	—	—	—	—	—	—
60'	+ ±	+ ±	+	+	±	±	—	—	—	—	—	—

b) Ohne Phosphat

0'	+ ±	+ ±	+ ±	+	—	—	+ ±	+ ±	+	—	—	—
10'	+++	++	+ ±	+	±	—	+++	+ ±	+	±	—	—
30'	+++	+++	++	+	±	±	+++	+ ±	+	±	—	—
60'	+++	+++	++	+	±	±	+++	+ ±	+	±	—	—

Verwandtschaftsforschung zulässig sei, kommt es nun aber nur darauf an, ob bei methodisch einwandfreien Reaktionen Widersprüche gegen anerkannte Verwandtschaftsbeziehungen in grösserem Umfange auftreten oder nicht. Methodisch einwandfrei sind die Reaktionen, gleichgültig, welche Vorbehandlungen vorgenommen waren und welches Verfahren (Praecipitation, Konglutination, usw.) gewählt wird, wenn sich bei den Serienversuchen mit dem Immunserum Trübungen bilden, das Normalserum aber klar bleibt.

Bei der Nachprüfung der Mezschen Angaben durch die Schüler von Gilg und Schürhoff ergaben sich leider so zahlreiche Widersprüche in vielerlei Beziehungen, dass die Untersucher eine Anwendung der serologischen Methode für die Feststellung von Familienverwandtschaft ablehnen mussten.

Das Auftreten einer unzulässig grossen Zahl von Widersprüchen hat weiterhin auch Slatman mit Hilfe der Phosphatmethode bestätigt.

Es traten bei seinen Versuchen positive Reaktionen auf, die der morphologischen Klassifizierung und auch der Anordnung nach Mez widersprechen. Z. B. reagierte das Immunserum von *Helianthus annuus* positiv mit *Pinus Pinea* und *Fagus silvatica*, das Immunserum von *Fagopyrum esculentum* mit *Ribes rubrum*, das Immunserum von *Fagus silvatica* mit einigen Ranunculaceen, mit *Magnolia*, *Lens*, *Helianthus*, *Curcubita* u. s. w., das Immunserum von *Lens esculenta* mit *Zea Mays*, *Brassica*, *Datura*, *Cornus* u. s. w.

Ebenso fehlten positive Reaktionen in solchen Fällen, in denen sie nach der morphologischen Anordnung, auch nach Mez, auftreten müssten. Es reagierten unter anderem *Helianthus annuus* Immuneserum negativ mit *Campanula nobilis*, Immuneserum vom *Fagopyrum esculentum* negativ mit *Juglans regia*, *Polygonum convolvulus*, *Rumex acetosa*, *Spinacia oleracea* u. s. w., Immuneserum von *Fagus silvatica* negativ mit *Juglans regia* u. s. w., Immuneserum von *Lens esculenta* negativ mit *Pirus malus*, *Prunus cerasus*, *Prunus amygdalus* u. s. w.

Ausserdem fanden sowohl Gilg und Schürhoff als auch Slatmann dass verschiedene Gattungen einer Familie und sogar verschiedene Arten einer Gattung mit demselben Immuneserum entgegengesetzte Resultate gaben.

Wie sind diese Widersprüche gegen die Mez'schen Untersuchungen zu erklären? In dieser Frage ist zweierlei enthalten. 1. Wie ist es bei einer so anerkannten Methode möglich, dass verschiedene Untersucher, verschiedene Reaktionen erhalten? und 2., wie ist es möglich, dass Mez im Gegensatz zu anderen Untersuchern fast stets Reaktionen erhielt, die mit der morphologischen Klassifizierung übereinstimmen?

Die erste Frage ist bis zu einem gewissen Grade zu beantworten. Schon Magnus hat darauf hingewiesen, dass die Praezipitinreaktionen um so weiter reichen, je stärker der Immunitationswert, der Titer, eines Immuneserums ist. Da der Titer bestimmt wird mit Hilfe von Verdünnungen der Sera bzw. der Antigene, auf welche die Sera einwirken, ist er sowohl von der Konzentration der Antigene, als auch von der Individualität des immunisierten Tieres abhängig. Während chemische Reaktionen jederzeit von jedem Experimentator exakt quantitativ nachgeprüft oder wiederholt werden können, ist das bei den serologischen Reaktionen mit pflanzlichen Extrakten nicht möglich. Es gibt anerkanntermassen zur Zeit keine Methode, die erlaubt, Eiweissgemische, deren Zusammensetzung zudem bei den pflanzlichen Extrakten nicht genau bekannt ist, mit ausreichender Genauigkeit auf eine bestimmte Konzentration einzustellen.

Dazu kommen noch die sehr bedeutenden individuellen Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit der Versuchstiere, auf die wir bei unseren Untersuchungen aufmerksam geworden sind. Wir haben von vornherein als Grundsatz aufgestellt, dass stets mindestens drei Tiere mit demselben Antigen geimpft werden müssen. Bei diesem Verfahren hat sich nun bemerkenswerter Weise gezeigt, dass in den meisten Fällen die drei Tiere verschieden reagierten.

Es waren z. B. die Tiere 1, 2 u. 3 in gleichen Zeitabständen mit Samenausgüssen von *Fagus silvatica* geimpft und hierbei auf

denselben Titer von 1:25600 gebracht worden. Es war ferner von derselben Antigenlösung je $\frac{1}{3}$ für die Reaktionen mit je einem der drei Tiere verwendet worden. Trotzdem fielen die Reaktionen verschieden aus: „In einigen Fällen reagierte nur ein Serum positiv [*Rumex acetosa* (Serum 1), *Mirabilis Jalapa* (Serum 2), *Akebia quinata* (Serum 1), *Anamirta cocculus* (Serum 1), *Cucurbita Pepo* (Serum 1)]; in anderen Fällen reagierten zwei Sera positiv, das dritte negativ: [*Maclura aurantiaca* (Serum 1 und 3), *Mesembrianthemum cristallinum* (Serum 1 und 3), *Linum usitatissimum* (Serum 2 und 3), *Primula officinalis* (Serum 1 und 3)]; zuweilen reagierte Serum 1 am stärksten (*Castanea vesca*, *Lens esculenta*, *Citrus aurantiacum*), zuweilen Serum 2 stärker als die anderen (*Amaranthus caudatus*, *Evonymus latifolia*); drittens endlich gab auch Serum 3 den grössten Ausschlag (*Delphinium grandiflorum*, *Echinops* sp.)“¹⁾.

Aus diesem bisher nicht beachteten individuell verschiedenen Verhalten der Versuchstiere erklären sich wohl eine ganze Reihe widersprechender Resultate. Es ergibt sich aber vor allem daraus für pflanzliche serologische Untersuchungen das wichtige Resultat, dass negative Reaktionen keine Bedeutung haben, solange sie nur mit einem oder wenigen Tieren angestellt sind. Auch drei Tiere sind, solange nicht durch umfangreichere Untersuchungen das Gegenteil bewiesen wird, noch nicht ausreichend. Für die Praxis der phytoserologischen Untersuchungen bedeutet das eine sehr grosse Erschwerung, so weit es darauf ankommt negative Resultate festzustellen; und es muss ja, wenn die Zulässigkeit der Methode bewiesen werden soll, gerade gezeigt werden, dass mit nicht verwandten Formen keine positive Reaktion auftritt.

Es muss im Zusammenhang mit diesen Beobachtungen ausdrücklich betont werden, dass alle Versuchstiere immunisiert werden konnten, dass also jedesmal alle drei gleichermassen die Identitätsreaktion gaben und dass sie nur bei den Verwandtschaftsreaktionen sich verschieden verhielten.

Angesichts dieser methodischen Komplikation ist die oben besprochene durchschnittliche Übereinstimmung der Resultate von Mez mit der morphologischen Klassifizierung noch weniger verständlich.

Zu den methodischen Bedenken kommen nun noch sachliche, die es sehr unwahrscheinlich erscheinen lassen, dass Samenpulver oder Pulver von vegetativen Pflanzen-Organen zum Nachweis der Familienverwandtschaft geeignet sind.

Die Grundtatsache der Immunforschung, um die es sich hier handelt, ist die, dass bei Injektion eines Gemisches von Eiweissarten gegen jeden der Bestandteile ein besonderer Antikörper ge-

1) Slatmann, l. c. S. 303.

bildet wird. Jedes gewöhnliche Pflanzenpulver ist ein solches Eiweissgemisch; ein Samen-Antigen z. B. stellt ein Gemisch von mehreren Teilantigenen, Partialantigenen oder Partigenen dar. Identische Pulverextrakte stimmen natürlich in allen Bestandteilen des Gemischs überein, Gemische von nahe verwandten Pflanzen haben den grössten Teil der Partigene gemeinschaftlich. Je weniger Pflanzen mit einander verwandt sind, desto geringer ist im Allgemeinen auch die Partigengemeinschaft. Ist die Partigengemeinschaft gross, dann entspricht ihr auch ein weitgehend übereinstimmendes Antikörpergemisch im Immunserum, dann ist also auch die Praezipitinreaktion stark, je geringer aber die Partigengemeinschaft, desto schwächer auch die Reaktion. Das alles gilt jedoch nur unter der Voraussetzung, dass die Konzentration der einzelnen Partigene annähernd gleich gross ist. Ist ein Partigen in geringer, ein anderes in grosser Konzentration vorhanden, wie das z. B. die Verschiedenheit der Reservestoffspeicherung bedingt, so bildet das eine viel, das andere wenig Antikörper und nun entstehen bei Reaktionen mit so ungleichwertigen Immunseren notwendig Täuschungen: denn sowohl hohe Antigenzahl, als hohe Antigenkonzentration können eine starke Praezipitin-Reaktion geben.

Dazu können noch besondere qualitative Verhältnisse kommen. Osborne, der erfahrenste Eiweisschemiker auf pflanzlichem Gebiet, hat auf Grund sehr genauer Analysen festgestellt, dass oft nahe verwandte Pflanzen verschiedene Eiweissarten besitzen, und dass an verschiedenen Stellen im System dieselben Eiweissarten auftreten können. So sind z. B. in den Samen von Flachs, Hanf, Kürbis, Ricinus, Paranuss Globuline enthalten, die in Bezug auf Krystallform, Löslichkeit, physikalische Eigenschaften, Verhältnis der Abbauprodukte usw. so weit miteinander übereinstimmen, dass sie kaum zu unterscheiden sind. Einige von ihnen sind chemisch so nahe verwandt, dass sie sogar mit der empfindlichsten serologischen Methode, mit der Anaphylaxie-Reaktion, Uebereinstimmung zeigen. (Wells & Osborne, 1911, 112): Die Flachs-Samen Globuline reagieren positiv mit den Globulinen des Ricinus-Samens, wenn allerdings auch nur schwach, die Globuline des Kürbissamens reagieren deutlich mit dem Excelsin der Paranuss.

Solche sporadisch verbreiteten Eiweisskörper, die bei nicht verwandten Formen in grösserer Menge neben anderen Proteinen auftreten, müssen bei diesen auch positive Seroreaktionen geben und damit Familienverwandschaft vortäuschen.

Es können also sowohl quantitative als auch qualitative Besonderheiten in der Zusammensetzung der Antigene bei systematisch nicht verwandten Formen fälschlicherweise „Verwandschaftsreaktionen“ hervorrufen.

Die verschiedene Löslichkeit der Pflanzeneiweisse bringt schliesslich noch eine andere, bisher nicht genügend beachtete Schwierigkeit mit sich. In den meisten Pflanzensamen sind Proteine vorhanden, die in Wasser löslich sind und dieser Eigenschaft wegen als Albumine bezeichnet werden. Sie bilden aber fast stets nur einen geringen Prozentsatz des Gesamteiweisses. Bei weitem die Mehrzahl der Pflanzenproteide sind Globuline, d. h. Eiweissarten, die sich nicht in Wasser lösen, wohl aber in Salzlösungen. Im allgemeinen genügen schwache Konzentrationen, z. B. physiologische NaCl-Lösung (0.85%), es gibt aber auch Globuline, die nur in höheren als 2—3% igen Salzlösungen und weiter solche, die nur in warmen (50—60° C) NaCl-Lösungen extrahiert werden können. Eine andere Gruppe von Proteinen, so weit bis jetzt bekannt besonders diejenigen der Getreidearten, lösen sich nur in Säuren oder Basen oder in Alkohol. Schliesslich gibt es pflanzliche Proteine, die den tierischen Gerüsteiweissen ähneln und überhaupt in allen Lösungsmitteln unlöslich sind.

Entsprechend der Vorschrift von Mez wurden für die serodiagnostischen Untersuchungen die Pflanzensamen in der Regel mit physiologischer NaCl-Lösung behandelt und nur ausnahmsweise andere Lösungsmittel angewendet. Es sind also sicher nicht alle vorhandenen Eiweissarten bei dieser Behandlung erfasst worden. So lange wir nicht wissen ob nur eine bestimmte Gruppe, z. B. die in verdünnten Salzlösungen extrahierbaren Eiweissarten, für die Verwandtschaftsreaktion massgebend sind, kann die Serodiagnose höchstens Anspruch auf Exaktheit erheben, wenn alle in den zu vergleichenden Pflanzen vorkommenden Eiweissarten bei den Reaktionen (bei der Immunisierung und bei dem Nachweis der gebildeten Immunstoffe) beteiligt waren.

Als Mez seine Verwandtschaftsuntersuchungen begann, war über das Wesen der Immunreaktionen, besonders über die Rolle der Eiweisskörper noch sehr wenig bekannt. Es gab damals zwei Möglichkeiten die Untersuchungen anzugreifen. Es konnte, ohne Rücksicht auf das Wesen der Immunreaktion, rein empirisch das System serodiagnostisch geprüft werden. Dieser Weg war ohne Weiteres beschreitbar. Oder es konnte der Versuch in Angriff genommen werden, die Serodiagnose zu einer exakt physiologischen Methode auszubauen. Das Ende eines solchen Planes war nicht abzusehen. Mez hat den ersten Weg eingeschlagen, der an sich zweifellos berechtigt war. Es war ein Experiment in grossem Stil, das ebenso gut gelingen wie misslingen konnte. Geglückt wäre es, selbst wenn das Wesen der Reaktion unbekannt blieb, wenn gegen seine Resultate keine Einwände zu erheben, wenn sie eindeutig gewesen wären. Die Widersprüche, die teils schon, bei der

Mezischen Schule selbst, in schwerwiegenderer Menge aber bei den Nachprüfungen von anderer Seite zu Tage getreten sind, die sich vielleicht nur klären lassen, wenn die beiden gegenüberstehenden Lager ihre Erfahrungen auf direktem Wege miteinander austauschen, zeigen, dass es nötig sein wird, die serodiagnostische Methode der Verwandtschaftsuntersuchungen bis in alle Einzelheiten als exakt physiologische Methode auszuarbeiten. Sie würde dann eine biochemische Eiweissanalyse darstellen, im Grunde also ein Spezialfall der phytochemisch-systematischen Methode sein. Diese ist, wie schon vielfach dargelegt worden ist¹⁾, wohl geeignet innerhalb mehr oder weniger enger Grenzen wichtige Anhaltspunkte für die systematische Stellung einzelner Formen zu geben. Das hängt damit zusammen, dass „die Art“ wie Ivanow²⁾ sich ausdrückt, „ihre physiologisch-chemischen Merkmale mit den Arten teilt, die mit ihr in genetischer Verbindung stehen“. Abgesehen davon, dass auch hier vielfach Ausnahmen beobachtet werden, können aber solche Stoffe, die einem bestimmten Verwandtschaftskreis eigentümlich sind, auch an ganz anderen Stellen im System sporadisch auftreten. Sie sind dort von weiter verbreiteten Grundstoffen durch chemischen Umbau, Methylierung, Benzoylierung usw. wieder infolge irgendwelcher spontaner Aenderung der genetischen Eigenschaften der Sippe gebildet worden. Die Verbreitung des Berberins, Trigonellins, Coffeins, Indicans, Inulins je in verschiedenen Pflanzenfamilien³⁾ sind einige wenige unter vielen Beispielen für solches Verhalten. Sporadische Verbreitung gleicher Eiweisskörper haben wir schon erwähnt. Da sie unabhängig von phylogenetischen Zusammenhängen auftreten, müssen sie ebenfalls, entsprechend den genannten einfachen Stoffen, aus weiter verbreiteten Eiweissmolekülen spontan durch chemische Aenderung bestimmter Gruppen oder Radikale dieser Proteinmoleküle entstanden sein, müssen ähnlich verwickelte versprengte Abänderungen darstellen, wie sie in der morphologischen Evolution vorliegen und können ebensowenig wie die „physiologisch-chemischen Merkmale“ ohne weiteres Verwandtschaft anzeigen.

Es wird sich unserer Überzeugung nach selbst bei physiologisch einwandfreier Ausarbeitung der serologischen Methode zeigen, dass die Serodiagnostik zwar als Hilfsmittel für die Aufdeckung phylogenetischer Beziehung dienen, dass sie aber nicht eine allgemeine und nicht eine eindeutige experimentell-phylogenetische Methode sein kann.

1) Rosenthaler, Beitr. bot. Zntsb. 1907, 21, 31 Jaretzki, 2 c.

2) Ber. d. d. bot. Ges. 1926, 44, 37.

3) Vergl. Czapek, F, Biochemie der Pflanzen, 2. Aufl. Bd. III.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Verhandlungen des naturhistorischen Vereines der preussischen Rheinlande](#)

Jahr/Year: 1929

Band/Volume: [85](#)

Autor(en)/Author(s): Hannig E.

Artikel/Article: [Ueber experimentelle Systematik der Blütenpflanzen. B002-B016](#)