

# DIE KNÖLLCHEN DER ADVENTIVEN WASSERWURZELN VON NEPTUNIA OLERACEA UND IHRE BAKTERIENSYMBIOSE.

Von

REINHOLD SCHAEDE.

Mit 20 Textabbildungen (23 Einzelbildern).

(Eingegangen am 1. März 1940.)

In dem Viktoria-Becken des Botanischen Gartens in Breslau wird unter anderen wärmeliebenden Wasserpflanzen auch die Leguminose *Neptunia oleracea* LOUR. gezogen. Anfang August 1939 beobachtete ich an einer frei im Wasser gewachsenen Adventivwurzel dieser Pflanze einen Ballen von Knöllchen, der fast die Größe einer Haselnuß hatte. Genauere Untersuchung zeigte, daß an zahlreichen adventiven Wasserwurzeln sich Knöllchen gebildet hatten. Der erwähnte Ballen wurde am 8. 8. 39 zum größten Teile abgeschnitten, er war bereits am 28. 8. wieder durch Bildung neuer Knöllchen auf seinen früheren Umfang herangewachsen. Am 12. 9. besaß die Pflanze außer einer ansehnlichen Zahl größerer und kleinerer Ballen sowie einzelner Knöllchen drei Ballen, die ungefähr so groß wie eine Haselnuß waren und sich nebeneinander an je einer Adventivwurzel von drei benachbarten Zweigen entwickelt hatten. Viele der Ballen und Einzelknöllchen saßen dicht an den Ursprungsstellen der Adventivwurzeln aus der schwimmenden Achse, so daß manche an dieser selbst entstanden zu sein schienen und erst die genaue Untersuchung den wahren Sachverhalt aufdeckte, doch hatten sich andere auch fern von der Basis der Adventivwurzeln gebildet. Alle Knöllchen waren unter Wasser, und zwar vollständig frei, die zuletzt erwähnten wohl bis zu 1 dm tief.

Anfang Oktober 1939 wurde das Becken samt seinem Hause geräumt, weil es im späten Herbst und im Winter nicht geheizt werden kann. Bei dieser Gelegenheit konnten die Erdwurzeln der *Neptunia* im Boden ihres Topfes untersucht werden. Hier wurden nur wenige kleine Ballen gefunden, auch waren die einzelnen Knöllchen kleiner als die eben besprochenen. Von der Gesamtmenge der Knöllchen an der ganzen Pflanze bildeten die an den Erdwurzeln nur einen kleinen Teil.

In der Literatur habe ich die Knöllchen von *Neptunia* nur einmal erwähnt gefunden, und zwar in der Dissertation von MORCK (1891, S. 36), der sie kurz als „runde, mit schmaler Basis ansitzende Gebilde“ beschreibt, die „meist dicht zusammen in Traubenform an den stärkeren Nebenwurzeln“ sitzen. Darüber, ob er die Knöllchen im Schlamm oder im Wasser angetroffen habe, sagt MORCK nichts. Die von mir beobachteten Knöllchen waren nur in ihrer Jugend rund, im ausgewachsenen

Zustände dagegen hatten sie die Gestalt eines kurzen, dicken Tannenzapfens und waren bis 3 mm dick und 6 mm lang; auch Gebilde, die einer Hand mit kurzen, sehr dicken Fingern vergleichbar waren, kamen vor.

Da nun das Auftreten der Knöllchen unter Wasser aus einem bald zu erörternden Grunde meine Aufmerksamkeit hervorgerufen hatte, habe ich bei sechs der größten botanischen Gärten Deutschlands darüber angefragt. In vier Gärten war *Neptunia* in Kultur, und zwar überall *N. oleracea*, in drei davon waren Knöllchen an den Wurzeln der Pflanzen im Schlamm oder Boden zu finden, an den Adventivwurzeln frei im Wasser aber nirgends. Wenn das im Gegensatz dazu gerade in Breslau so reichlich der Fall war, ist es wohl auf einen glücklichen Zufall zurückzuführen. Sehr wahrscheinlich wird die Pflanze am natürlichen Standort ebenfalls die Wasserwurzelknöllchen ausbilden, und deren Fehlen in den Kulturen dürfte seine Ursache darin haben, daß die richtige Species von *Bacterium radicola* in dem Wasser der Becken nicht in hinreichender Menge vorhanden ist.

Bald nach der Auffindung der Wasserwurzelknöllchen machte mich Herr Dr. MOSEBACH, dem ich die Beobachtung mitgeteilt hatte und dem ich auch an dieser Stelle für seine Unterstützung bestens danken möchte, auf eine Veröffentlichung von SUESSENGUTH und BEYERLE (1936) aufmerksam, auf die er zufällig gestoßen war. Diese Arbeit handelt von den Bakterienknöllchen am Sproß von *Aeschynomene paniculata*, und es wird darin ausdrücklich erwähnt (S. 237), daß bei der Gattung *Aeschynomene* Knöllchen „sowohl in der Erdwurzel- wie in der Sproßregion vorkommen, aber niemals an adventiven Wasserwurzeln“. Ferner ist dort zu lesen (S. 236), HAGERUP habe die Frage aufgeworfen, ob die Wasser- und Sumpfpflanzen unter den Papilionaceen auf Bakterienknöllchen verzichten müssen, weil die Bakterien unter Wasser aus Mangel an Luft nicht zu assimilieren vermögen, und die Gattung *Aeschynomene* habe darum Knöllchen am Sproß ausgebildet. Daß dies nicht zutreffen kann, geht bereits aus der Arbeit von SUESSENGUTH und BEYERLE (S. 234) selbst hervor, denn sie schreiben über die Knöllchen von *Aeschynomene paniculata*: „Die Mehrzahl muß am natürlichen Standort unter Wasser stehen.“ Den vollen Gegenbeweis bringt aber der vorliegende Fall von *Neptunia oleracea*, wo die bei weitem überwiegende Mehrzahl der Knöllchen an den Adventivwurzeln unter Wasser saß, auch waren diese größer als die der Erdwurzeln.

Das schöne Material forderte eine nähere Untersuchung geradezu heraus. Knöllchen verschiedenen Alters wurden teils nach JUEL fixiert und mit Fuchsin-Jodgrün gefärbt (Methode s. SCHAEDE 1932, S. 417), teils nach BENDA, wofür die geeignete Färbung später (S. 4) angegeben werden wird. Dieses Mittel wirkt zufriedenstellend nur in jungen, kleinen Knöllchen, während in größeren Fixierungsfehler auftreten, die

zweifelloos auf zu langsames Eindringen des Mittels zurückgehen. Die Knöllchen wurden in Paraffin eingebettet und Schnittserien von  $5\ \mu$  Dicke angefertigt<sup>1</sup>.

Der anatomische und histologische Befund der Leguminosknöllchen sowie das allgemeine Verhalten der Bakterien und der Wirtszellen zueinander sind schon so oft beschrieben worden, daß sie als allgemein bekannt vorausgesetzt werden können. In der vorliegenden Arbeit sollen nur diejenigen Gebiete aus der Symbiose ausführlich behandelt werden, die eine nähere Betrachtung verdienen und die noch nicht hinreichend geklärt sind.

Der bei den Leguminosen übliche Weg der Bakterien durch die Wurzelhaare in das Gewebe ist bei *Neptunia* ausgeschlossen, weil ihre Wasserwurzeln keine Haare ausbilden. Die Infektion kann also nur durch die Epidermis erfolgen. Da nun bekannt ist, daß *Bacterium radicolica* Zellmembranen zu durchdringen vermag — die Weiterverbreitung in den Knöllchen geht ja mit Ausnahme einiger *Lupinus*-Arten auf diese Weise vor sich —, dürften sich hier kaum Schwierigkeiten ergeben. Vielleicht finden die Bakterien auch durch Wunden Eingang. Leider habe ich die ersten Stadien der Infektion nicht zu Gesicht bekommen, denn selbst in den jüngsten Knöllchen, die ich finden konnte, und die etwa  $\frac{1}{2}$  mm maßen, waren die sekundären Veränderungen infolge von Peridermbildung schon so stark, daß nichts Sicheres mehr abzulesen war. Die Bilder ähnelten weitgehend denen, die PRAZMOWSKI (1890) und McCoy (1929) von frisch infizierten Wurzeln gegeben haben.

Bekanntlich kommt es nach dem Einwandern der Bakterien in das Wurzelgewebe zur Bildung eines Meristems, durch dessen Zellteilungen die Knöllchen entstehen (Abb. 1 und 2). Dabei sind offenbar von den Endophyten ausgehende Wirkstoffe im Spiele. Die Bakterien dringen in die Zellen vermittelst der oft beschriebenen Infektionsschläuche ein, verlassen diese aber zunächst nicht (Abb. 3). Warum ich mich der von PRAZMOWSKI (1890) geprägten Bezeichnung „Infektionsschläuche“ bediene und nicht des häufiger gebrauchten Wortes „Infektionsfäden“, wird später (S. 10) erklärt werden. Die Zellen werden durch das Eindringen der Schläuche in ihrer Teilungsfähigkeit in keiner Weise gehemmt.

Bekanntlich kommt es nach dem Einwandern der Bakterien in das Wurzelgewebe zur Bildung eines Meristems, durch dessen Zellteilungen die Knöllchen entstehen (Abb. 1 und 2). Dabei sind offenbar von den Endophyten ausgehende Wirkstoffe im Spiele. Die Bakterien dringen in die Zellen vermittelst der oft beschriebenen Infektionsschläuche ein, verlassen diese aber zunächst nicht (Abb. 3). Warum ich mich der von PRAZMOWSKI (1890) geprägten Bezeichnung „Infektionsschläuche“ bediene und nicht des häufiger gebrauchten Wortes „Infektionsfäden“, wird später (S. 10) erklärt werden. Die Zellen werden durch das Eindringen der Schläuche in ihrer Teilungsfähigkeit in keiner Weise gehemmt.

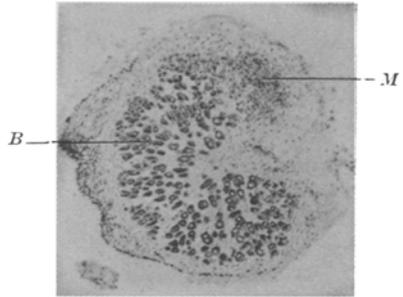


Abb. 1. Schnitt durch ein junges, etwa 1 mm dickes Knöllchen. M Meristem, B Gewebe mit den bakteriengefüllten Zellen. Vergr. 32.

<sup>1</sup> Die Photographien sind mit der Mikro-Aufsatzkamera „Makam“ von E. LEITZ, Wetzlar, hergestellt worden, einige wurden um die Hälfte vergrößert. Als Objektiv für die Beobachtung wie die Photographie bei starker Vergrößerung diente ein Apochromat 2 mm, n. A. 1,32 von W. und H. SEIBERT, Wetzlar.

Es ist nun die Frage, wieweit die Infektionsschläuche in die Schichten des Meristems vordringen, ob nicht gerade sie die Zellen zu Teilungen



Abb. 2. Längsschnitt durch ein altes Knöllchen. *I* Überrest des Meristems; *II* Zone der Zellen mit Bakteroiden; *III* Zone des Bakteroidenabbaues. Vergr. 32.

anreizen und damit das Meristem entstehen lassen. DANGEARD (1926, S. 152) schreibt, daß in der Zone der Zellteilungen keine Schläuche oder Bakterien in den Zellen zu finden seien. Die Sache ist indessen damit noch nicht entschieden, denn es besteht da folgende technische Schwierigkeit. Die Meristemzellen sind sehr reich an Cytoplasma und die äußersten Enden der Infektionsschläuche sehr dünn; wenn nun eine Färbung angewandt wird, die Cytoplasma und Schläuche ähnlich färbt, sind beide nicht mehr mit Sicherheit voneinander zu unterscheiden. So verhält es sich z. B. auch mit der Fuchsin-Jodgrünfärbung bei JUEL-Material. Mit dem BENDA-Material wurden mehrere Färbeversuche nach üblichen Methoden vorgenommen, ohne ein befriedigendes Ergebnis zu liefern. Da in solchen Fällen allein das Ausprobieren zum Ziele führt, wurden Schnitte auf gut Glück für

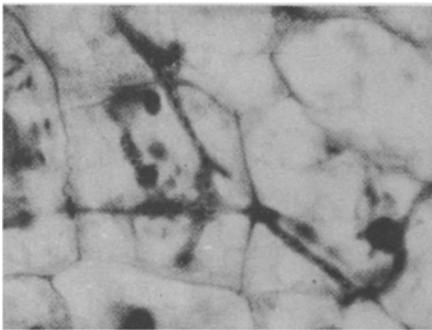


Abb. 3. Infektionsschläuche in jungen Zellen. Vergr. 1350.

3—4 Stunden in Fuchsin-Jodgrün gebracht, worauf sie durch Abspülen mit starkem Alkohol entwässert und über Xylol in Xylol-Kolophonium eingebettet wurden. Der Erfolg war überraschend gut, denn die Bakterien waren intensiv blaurot gefärbt, die Schläuche blau, das Cytoplasma hellgrau mit leichtem rosa Schimmer, das Karyotin blaurot, die Nucleolen gelbrot und die Zellmembranen je nach ihrem Alter blau bis blau-grau, die Chondriosomen dagegen blieben ungefärbt. Somit hoben sich Bakterien und Schläuche mit voller Klarheit voneinander und von allen

*I* }  
*II* }  
*III* }

Zellbestandteilen ab, so daß irgendein Irrtum ausgeschlossen war. Diese Methode hat mir bei meiner Arbeit sehr wertvolle Dienste geleistet, ich wäre ohne sie nur wenig weiter gekommen als meine Vorgänger.

Die so behandelten Präparate zeigten, daß bei *Neptunia* die sehr dünnen Enden der Infektionsschläuche weit nach vorn in die Zellen des Meristems hineindringen, nur in dessen äußersten Schichten — etwa vier — wurden sie nicht gefunden. Eine Photographie war leider unmöglich, weil die Schläuche sehr viele Krümmungen machen und die Immersionssysteme eine zu geringe Tiefenschärfe besitzen, um ein befriedigendes Bild von ihnen zu liefern. Demnach wird es in erster Linie das Eindringen der Schläuche sein, das die Zellteilungen auslöst, und die Wirkstoffe werden zu weiter vorn liegenden Zellen geleitet werden und zu sonstigen nichtinfizierten Zellen, denn nicht in jede dringt im vorliegenden Falle ein Schlauch ein.

Die Richtigkeit dieser Ansicht ergibt sich aus der Tatsache, daß dort, wo kein Wachsen der Schläuche besteht, auch keine Zellteilungen auftreten. Daher wachsen die Knöllchen trotz ihres Meristems nicht dauernd weiter wie die Wurzelspitzen. In den Knöllchen der Leguminosen erfolgt bekanntlich die Bildung der Bakteroiden, und es setzen Abbauerscheinungen ein, sobald Wirtspflanze und Endophyten eine gewisse Zeit lang miteinander gelebt haben (vgl. Abb. 2). Wenn nun diese beiden Vorgänge schneller fortschreiten als das Vordringen der Schläuche, muß das Wachstum der Knöllchen zwangsläufig aufhören. Bei *Neptunia* sind ferner alte und junge Knöllchen in einem Ballen dicht nebeneinander zu finden. Wiederholte Infektion an der gleichen Stelle kommt nicht in Betracht, zumal mit der Bildung von Periderm ein sehr bedeutendes Hindernis für das Eindringen von Bakterien gegeben ist. Das Entstehen immer neuer Knöllchen am gleichen Ort und damit ganzer Ballen von einer Infektionsstelle aus geht — von unzweifelhaften Verzweigungen abgesehen — in der Weise vor sich, daß die Endophyten an geeigneten Stellen ihre Aktivität durch Vortreiben neuer Schläuche wieder aufnehmen, damit von neuem Zellen zur Teilung anreizen und dadurch die Wirtspflanze zur Bildung eines neuen Meristems veranlassen.

Die äußersten Enden der Infektionsschläuche sind, wie gesagt, sehr dünn, nur wenig dicker als die von ihnen umschlossenen Bakterien (etwa  $0,4 \mu$ ), die ungleich lang sind (etwa  $1 \mu$ ) und von denen die kürzesten fast Kugeln gleichen. Eine der wichtigsten und interessantesten Erscheinungen der Symbiose ist das Übergehen der Bakterien aus den Schläuchen in das Cytoplasma der Wirtszellen. PRAZMOWSKI (1890, S. 217) schreibt, daß die Schläuche zu Erweiterungen mit dünner Membran anschwellen, die sich verflüssigen, und daß sich darauf die Bakterien mit dem Plasma vermengen; freilich sei das nicht direkt kontrollierbar.

Nach DANGEARD (1926, S. 165) bilden sich Anschwellungen der Fadenenden, darauf scheidet der Kern zweifellos eine Substanz aus, die den Schleim auflöst und die darin enthaltenen Bakterien befreit. Auch MILOVIDOV (1928, S. 59) spricht von „Infektionsvesikeln“. Man sieht, es ist nicht viel Bestimmtes über diesen wichtigen Punkt bekannt, das meiste beruht auf Annahme. Die Abbildungen, die DANGEARD gibt, sind so schematisch, daß sie kaum zu einer besseren Einsicht beitragen. Allem Anschein nach hat noch niemand den Vorgang der Infektion des Cytoplasmas genau gesehen, und es bestehen hier in der Tat einige Schwierigkeiten. MCCOY (1929, S. 403) sagt, die Befreiung der Bakterien aus den Infektionsfäden sei schwer zu beobachten, weil sie in Form und Färbung nicht von den Mitochondrien zu unterscheiden seien; bei DANGEARD (1926, S. 11 f.) lesen wir, daß in dieser Hinsicht arge Mißverständnisse vorgekommen sind, die von diesem Forscher in dankenswerter Weise erst beseitigt werden mußten. Hier hat sich nun die oben (S. 4) beschriebene Fuchsin-Jodgrünfärbung an BENDA-Material aus den genannten Gründen außerordentlich bewährt, indem sie vollkommen klare Bilder lieferte.

Zunächst ist zu sagen, daß es bei *Neptunia* allermeist nicht das apikale Ende eines Schlauches ist, aus dem die Bakterien herauskommen. Wäre das der Fall, dann könnte ja der Schlauch nicht weiterwachsen und die Bakterien nach vorn in neue Zellen tragen. Blasige Anschwellungen konnten ferner an den verschiedensten Stellen beobachtet werden, ohne daß sie sich geöffnet hätten, wie denn die Schläuche von recht unregelmäßiger Dicke sind und allerlei Auswüchse sowie Gestaltsunregelmäßigkeiten aufweisen (Abb. 3). Die Bakterien werden vielmehr gewöhnlich aus kurzen Seitenzweigen entlassen, seltener aus den Hauptschläuchen, nachdem ihre Enden schon in andere Zellen weiter gewachsen sind. Der Übertritt der Bakterien in das Cytoplasma geht in folgender Weise vor sich. Es konnte beobachtet werden, daß fast gerade Ketten von Stäbchen aus Schläuchen heraus in das Cytoplasma eingedrungen waren (Abb. 4); an anderen Stellen zeigten Schläuche schwache füllhornähnliche Erweiterungen, aus denen die Bakterien sich infolge von häufiger Teilung fächerartig (im optischen Querschnitt) in das Plasma verteilt hatten (Abb. 5 und 6). Man wird hier an Chlamydbakterien wie *Crenothrix* erinnert, deren Gallertscheide sich bekanntlich am Fadenende etwas erweitert, um einzelne Bakterien in das Wasser zu entleeren. Die in das Cytoplasma übergetretenen Stäbchen vermehren sich sofort sehr schnell, doch davon später mehr. Leider kann nicht gesagt werden, aus welchem Grunde die Infektionsschläuche sich öffnen, und die Sache wird noch dadurch erschwert, daß es bei *Neptunia* Zellen gibt, durch die wohl Schläuche hindurchgewachsen sind und sich auch verzweigt haben, die aber niemals Bakterien entlassen. Darauf werden wir noch zurückkommen (S. 13). Es könnte ja sein, daß nicht die Zellen die Schläuche

zur Öffnung bringen, wie DANGEARD (1926, S. 165) meint, sondern daß die Bakterien sich dabei aktiv beteiligen.

Die Infektion des Cytoplasmas hat bei *Neptunia* für die Zellen die Folge, daß sie alsbald ihre Teilungsfähigkeit verlieren; nur wenn erst einzelne Bakterien im Plasma liegen, kann noch eine Zellteilung eintreten. Hierin besteht eine Parallele zu *Pisum sativum*, von dem DANGEARD (1926, S. 41, 44) ganz ähnliche Angaben macht. Anders verhält sich dagegen *Phaseolus vulgaris*, wo nach McCoy (1929, S. 404) noch Teilungen gefunden werden, bis die Zellen reichlich mit Bakterien gefüllt

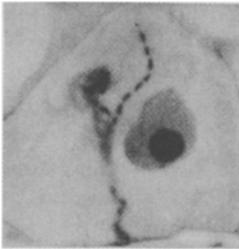


Abb. 4 a.

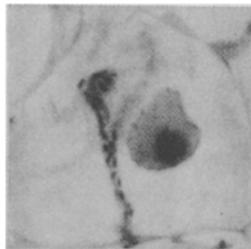


Abb. 4 b.



Abb. 5 a.

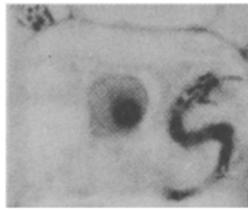


Abb. 5 b.

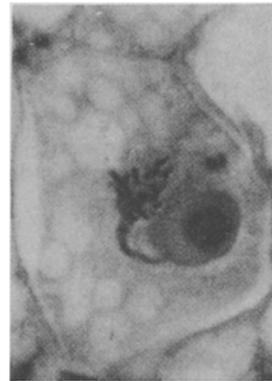


Abb. 6.

Abb. 4—6. Einwanderung der Bakterien aus den Infektionsschläuchen in das Cytoplasma. 4 a und b, 5 a und b gleiches Bild bei verschiedener Einstellung. Vergr. 1350.

sind, und bei *Lupinus*-Arten erfolgt sogar die Verbreitung des Endophyten allein durch Zellteilung (MILOVIDOV 1926, S. 339; SCHAEDE 1932, S. 417). Wenn man die Leguminosen hinsichtlich der Weiterverbreitung der Endophyten im Gewebe und der Teilungsfähigkeit der Zellen mit infiziertem Cytoplasma im Überblick betrachtet, ergeben sich folgende drei Typen: 1. Die Verbreitung erfolgt durch Schläuche, die Zellteilungen werden unmittelbar nach dem Übergang der Bakterien in das Cytoplasma eingestellt (z. B. *Neptunia*, *Pisum*); 2. die Verbreitung erfolgt ebenfalls durch Schläuche, die Zellteilungen hören aber erst auf nach reichlicher Vermehrung der Bakterien im Cytoplasma (z. B. *Phaseolus*); 3. die Schläuche fehlen, die Bakterien gehören zum Zellinventar und werden durch Zellteilungen regelmäßig weitergegeben (z. B. *Lupinus*). Man kann in diesen Verhältnissen eine wachsende Toleranz des Protoplasmas der

Wirtspflanzen gegenüber den Endophyten erblicken. Natürlich werden sich nicht alle Leguminosen streng einem der drei Typen zuordnen lassen, wie denn Übergänge bei allen Lebensgemeinschaften und Lebensvorgängen die Regel sind.

Eine weitere Folge der Cytoplasmainfektion ist das stärkere Wachstum der Zellen gegenüber ihren Nachbarn, die entweder von den Endophyten überhaupt nicht angegriffen worden sind oder nur einen ungeöffneten Schlauch beherbergen; auch ihr Kern vergrößert sich stark, was allerdings bei allen Symbiosen eine so gewöhnliche Erscheinung ist, daß darüber kein Wort mehr zu verlieren ist. Die Kerne von *Neptunia oleracea* besitzen übrigens eine sehr große Zahl von Chromocentren, ebenso ist die Chromosomenzahl hoch.

Sobald die Bakterien in das Cytoplasma eingewandert sind, teilen sie sich nicht nur viel schneller als zuvor, sondern sie werden auch beträchtlich größer als die im Schlauch; sie müssen demnach in dem neuen Medium zunächst erheblich bessere Lebensbedingungen finden. Dieses Verhalten verdient unsere Aufmerksamkeit, denn vom Cytoplasma umschlossen sind ja auch die Schläuche, und doch teilen sich in ihnen die Bakterien viel langsamer. Stoffaustausch zwischen diesen und dem Plasma muß aber stattfinden, denn anderenfalls könnten die Bakterien nicht die nötigen Nährstoffe erhalten, um sich zu vermehren und die Schläuche zu verlängern, auch würden an die Zellen keine Wirkstoffe abgegeben werden, die Teilungen veranlassen. Dennoch sind die Schläuche für bestimmte Stoffe offenbar ein unüberwindliches Hindernis, wie wir später (S. 11, 18) sehen werden, und ausschließlich bei unmittelbarer Berührung von Bakterien und Cytoplasma ergeben sich für beide ganz bestimmte Folgen, über die bei gegebener Gelegenheit näher zu berichten sein wird (S. 14, 19).

Die erste größere Ansammlung von Bakterien im Cytoplasma bildet sich oft um den Kern herum (Abb. 7), kann aber auch abseits von ihm in einem Winkel der Zelle zu finden sein. Es liegt eine Art von „Anziehungskraft“ seitens des Zellkernes vor, die sich häufig auch gegenüber dem Infektionsschlauch äußert, indem dieser auf seinen krummen Wegen die Richtung zum Kern bevorzugt. Darauf ist seit BEIJERINCK (1894, S. 732) wiederholt hingewiesen worden, so von DANGEARD (1926, S. 165) und MILOVIDOV (1928, S. 59); indessen darf nicht verschwiegen werden, daß bei *Neptunia* der Infektionsschlauch garnicht selten abseits vom Kerne vorbeigehen kann, ohne von diesem in seinem Verlaufe irgendwie beeinflußt zu werden.

Die schnelle Vermehrung der Bakterien hat zur Folge, daß die Zelle sich vollständig mit Bakterien füllt, wobei meist eine große Vakuole erhalten bleibt (Abb. 7—9), während vom Cytoplasma mit Ausnahme des Tonoplasten kaum noch etwas zu erkennen ist; es hüllt die Bakterien wohl mit sehr dünner Schicht ein. Hierin besteht offenbar bei allen

Leguminosen weitgehende Übereinstimmung. DANGEARD (1926, S. 152) macht darauf aufmerksam, daß die Bakterien nicht imstande sind, in den Kern einzudringen, ebensowenig vermag das ja der Infektionsschlauch. Wenn man sich die Sache näher überlegt, so ist das doch merkwürdig, denn was hindert sie eigentlich? Die Schläuche können den Kern zwingen, seine Kugelgestalt aufzugeben und sich an der Stelle, wo sie in seiner unmittelbaren Nähe vorbeilaufen, einzubuchten. Sehr starke Einschnürungen gehen oft wohl darauf zurück, daß der Kern bei seinem Wachstum den Schlauch nicht beiseite zu drängen vermag und sich deshalb um ihn herumschmiegen muß, übrigens auch ein Hinweis auf die flüssige Beschaffenheit des Kernes.

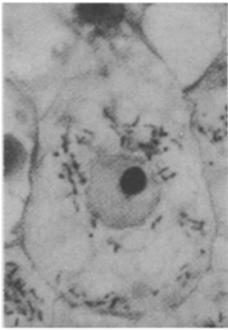


Abb. 7.

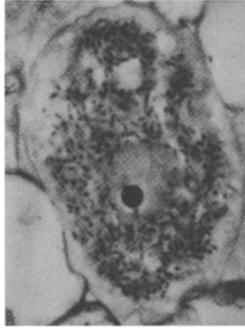


Abb. 8.

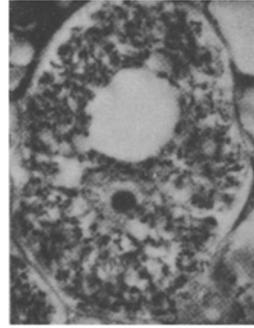


Abb. 9.

Abb. 7—9. Verbreitung der Bakterien im Cytoplasma. Abb. 7. Wenige Bakterien im Cytoplasma; Abb. 8. Bakterien reichlich vermehrt; Abb. 9. Zelle mit Bakterien gefüllt bis auf eine große Vakuole. Vergr. 900.

In den Zellen, die in die Streckungsphase übergegangen sind und ihr Volumen um ein Mehrfaches vergrößert haben, kann man die Infektionsschläuche sehr gut untersuchen, und es ist nun von ihnen noch einiges zu sagen. Wenn die Zellen wachsen, müssen auch die Schläuche sich verlängern, sonst würden sie zerrissen werden, was jedoch niemals geschieht. Im Gegenteil, sie werden beträchtlich dicker als ihre sehr feinen Enden und enthalten oft mehrere Reihen von Stäbchen, besonders in Anschwellungen von verschiedener Gestalt haben sich größere Mengen von Bakterien angesammelt. Daraus folgt, daß die Bakterien in den Schläuchen sich vermehren und ihre Hülle erweitern. Der Verlauf der Schläuche in den Zellen der *Neptunia* ist ganz unregelmäßig, sie führen die mannigfaltigsten Krümmungen aus, und selten findet man ein einigermaßen gerades Stück (Abb. 3). Sie sind ferner stets von Cytoplasma umgeben, das in den älteren vakuolenreichen Zellen eine dünne Hülle um sie bildet.

In den Präparaten der nach JUEL und besonders der nach BENDA fixierten Knöllchen lassen sich mit Hilfe der angegebenen Färbung die

einzelnen Bakterien in den Schläuchen ausgezeichnet beobachten. MILOVIDOV (1928, S. 59) sagt zwar, vor seinen Untersuchungen an *Carmichaelia australis*<sup>1</sup> seien „eher Vermutungen als Gewisses über das Vorkommen von Bazillen und Kokken in den Infektionsfäden, Zoogloen und Infektionsvesikeln“ geäußert worden; allein bereits bei PRAZMOWSKI (1888, S. 249) kann man über „winzige, stäbchenförmige Körperchen“ in den Schläuchen lesen, ferner daß diese in ihrem „ganzen Verlaufe mit äußerst kleinen, stäbchenförmigen Körperchen erfüllt“ seien, und daß die Stäbchen im Schlauch meist parallel zur Längsachse gelagert seien, und an anderer Stelle (1890, S. 211) spricht derselbe Forscher z. B. von einem glänzenden mit Bakterien erfüllten Schlauch, den er auch abbildet, wonach kein Zweifel bestehen kann, daß bereits er die Bakterien in den Schläuchen wirklich gesehen hat. Bei *Neptunia oleracea* sind die Stäbchen darin von ungleicher Größe, die kleinsten von ihnen fast kugelig, alle von einem hellen Hofe umgeben, der allerdings Fixierungsartefakt sein kann. Die Schläuche besitzen einen dünnen Mantel, der sich kräftiger färbt und auf Querschnittsbildern einwandfrei zu erkennen ist. Dieser Eigenschaft wegen wird in der vorliegenden Arbeit nach dem Vorgang von PRAZMOWSKI (1890, S. 200) von Infektionsschläuchen gesprochen und nicht von Infektionsfäden. Der Mantel der älteren Schläuche ist dicker als der der jungen, und seine Wandstärke gleicht bei den ersteren der der Zellmembranen. In seinem Inneren befindet sich eine schwächer färbare Substanz, zweifellos Schleim, ein Sekret der Bakterien, in dem sie eingebettet liegen. Der Schlauchmantel ist von PRAZMOWSKI (1890, S. 213) und MILOVIDOV (1926, S. 336) an lebendem Material beobachtet worden, bei diesem, das ja ungefärbt ist, muß man freilich Lichtbrechungserscheinungen an den Flanken der cylindrischen Körper berücksichtigen. Daß der Mantel jedoch kein Fixierungsartefakt ist, ergibt sich aus den folgenden Untersuchungen:

BELJERINCK (1894, S. 730; 1912) hat die Blaufärbung der Infektionsschläuche mit Chlorzinkjod gefunden. Bakterienprodukte mit dieser Reaktion sofort für Cellulose anzusprechen, sind wir allerdings nicht berechtigt (vgl. TUNMANN-ROSENTHALER 1931, S. 947, 952); nach BELJERINCK (1912) färbt sich ferner das „Zellulan“ mit Chlorzinkjod und Jod-Schwefelsäure nicht blau. Ich habe den Versuch an Mikrotomschnitten wiederholt und die gleiche Reaktion beobachtet, freilich nur an den dickeren Schläuchen, während hinsichtlich der dünnsten keine Klarheit zu erlangen war, weil der übrige Zellinhalt sich kräftig gelb färbt und den zarten blauen Farbton überdeckt. Es zeigte aber allein der Mantel der Schläuche die Reaktion, die Schleimsubstanz und die Bakterien darin waren dagegen gelb, und damit bekam die Sache eine andere Wendung, denn der Mantel hatte sich als Körper von eigener chemischer

<sup>1</sup> *Bacterium radicolica forma Carmichaeliana* ist nach MILOVIDOV grampositiv. Die Rasse von *Neptunia oleracea* ist gramnegativ.

Natur erwiesen und nicht lediglich als dichtere äußerste Schicht der fädigen Zooglöa.

Zwecks näherer Untersuchung wurde Färbung mit Kongorot in schwach basischer Lösung (3—4 Stunden lang) vorgenommen, und es ergab sich folgendes Bild: Allein der Mantel der Schläuche, auch der der jüngsten, war ziegelrot gefärbt ebenso wie die Zellmembranen, die Bakterien im Schlauch dagegen und die sie einhüllende Schleims substanz waren völlig ungefärbt und darum unsichtbar; die Bakterien im Cytoplasma wiederum und dieses selbst waren kräftig orangefarben, und zwar war es der plasmatische Inhalt der Stäbchen, der den Farbstoff gespeichert hatte, denn die nach seinem Abbau übrigbleibenden Membranreste zeigten hell-orange Farbe. Daraus folgt erstens, daß Schlauchmantel und Zellmembranen sich gegenüber Kongorot ganz gleich verhalten, und zweitens, daß die Bakterien mit diesem Farbstoff wohl färbbar sind; und wenn diejenigen im Schlauch samt der Schleims substanz farblos bleiben, während der Mantel rot ist, ergibt sich, daß das Kolloid Kongorot nur bis hierhin eindringen kann. Diese Durchlässigkeitsverhältnisse der Schleims substanz geben uns einen Hinweis für die Lösung der früher (S. 8) aufgeworfenen Frage, warum die Stäbchen im Schlauch, obwohl dieser vom Cytoplasma umschlossen ist, nicht ebenso günstige Bedingungen für Wachstum und Vermehrung finden wie die in das Cytoplasma selbst eingewanderten.

Bei näherer Überlegung muß man die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß der Schlauchmantel nicht ein Erzeugnis der Bakterien ist, sondern der Zelle, indem sie die eindringende Zooglöa alsbald mit einer Hülle von Cellulose oder einem sehr nahe verwandten Stoff umgibt. Man muß sich noch vergegenwärtigen, daß bei den Chlamydo bakterien und sonstigen Zooglöen auf der Außenseite der Gallerte keine Mantelschicht, besonders noch dazu von eigener chemischer Beschaffenheit auftritt. Um die Verhältnisse nach Möglichkeit zu klären, wurde Färbung mit Hämatoxylin nach EHRlich vorgenommen, das pektinhaltige Membranen färbt, reine Cellulose dagegen nicht. Nach dieser Behandlung waren die Zellmembranen in der Tat schwärzlich<sup>1</sup>, ebenso verhielt sich der Mantel der Schläuche, ihr Inhalt dagegen hatte sich blau gefärbt. Man könnte ferner daran denken, daß man von intercellularen Infektionsschläuchen, die hier und da vorkommen, einen Aufschluß erhalten könnte; aber diese sind leider ungeeignet, weil Zellmembranen und Mäntel — falls solche hier überhaupt vorhanden sind — so dicht aneinander schließen, daß man sie nicht unterscheiden kann. Da nun an den Durchtrittsstellen der Schläuche durch die Zellwände beide unmittelbar ineinander übergehen und sie — die jüngsten Schläuche ausgenommen — gleich dick sind, die gleiche Reaktion mit Chlorzinkjod geben

<sup>1</sup> Nur das nach JUEL fixierte Material ist hierzu geeignet; in dem nach BENDA fixierten färben sich alle Membranen bräunlich und heben sich wenig deutlich hervor.

sowie mit allen angewandten Färbemethoden die gleiche Färbung zeigen, gewinnt die oben ausgesprochene Vermutung eine gewisse Wahrscheinlichkeit<sup>1</sup>. Ein Beweis liegt freilich noch nicht vor, und ich sehe zur Zeit keinen Weg für eine sichere Entscheidung.

Würde die Zelle den Mantel liefern, dann würde sich zweierlei leichter erklären lassen. Erstens könnte die Öffnung der Schläuche in der Weise erfolgen, daß ihre Celluloseschicht, die an den zuletzt ummantelten Endigungen am schwächsten ist, gelöst oder infolge von Vermehrung der Bakterien, mit der sie nicht Schritt hält, gesprengt wird, wonach der Schlauchinhalt in das Cytoplasma übertreten kann. Zweitens ließe sich die Tatsache, daß manche Schläuche sich nie öffnen, so verstehen, daß diese von der Zelle mit einem kräftigen Mantel umgeben werden, der entsprechend den Teilungen der Bakterien erweitert und verstärkt wird, wodurch diese immer darin eingeschlossen bleiben. Auf den möglichen Einwand, die Bakterien seien ja doch befähigt, Zellmembranen mit Hilfe von Enzymen zu durchbrechen, könnten also wohl auch den Mantel auflösen, ist zu entgegnen, daß sie ausschließlich die jüngsten Wände durchbohren, die bekanntlich vorwiegend aus Pektin bestehen. Das beweisen mit Chlorzinkjod behandelte Präparate der Knöllchen von *Neptunia*, denn die Wände der ausgewachsenen und der nicht mehr teilungsfähigen Zellen geben kräftige Cellulosereaktion, die Mittellamelle ist als heller Streifen deutlich sichtbar; dagegen zeigen die Membranen des Meristems und der unmittelbar angrenzenden Schichten, also des Gewebes, in dem die Endophyten sich verbreiten, nur einen schwachen bläulichen Schimmer, enthalten somit wenig Cellulose.

Betrachtet man das Gewebe eines ausgewachsenen Knöllchens von *Neptunia oleracea*, so nehmen einen sehr bedeutenden Anteil davon die sehr großen, mit Bakterien erfüllten Zellen ein (Abb. 1, 2), durch die nicht selten außerdem noch Schläuche laufen (Abb. 10—12). Das kommt bei anderen Leguminosen gleichfalls vor, wird z. B. von DANGEARD (1926, Tafel I, Abb. 9) für *Pisum sativum* abgebildet und von MCCOY (1929, S. 403) für *Phaseolus vulgaris* erwähnt mit dem Bemerkung, daß sich die Schläuche in alten Zellen nicht weiter entwickeln, was auch für *Neptunia* im allgemeinen zutrifft; über abweichendes Verhalten wird später berichtet (S. 16). Zwischen den eben besprochenen Zellen liegen kleinere, die von den Endophyten überhaupt nicht angegriffen worden sind, also weder einen Schlauch noch Stäbchen im Cytoplasma enthalten (Abb. 1, 2). Sie treten offenbar auch bei anderen Leguminosen auf, denn DANGEARD (1926, S. 165) spricht von „cellules parasitées“ und „cellules intermédiaires“, nur sagt er nicht, bei welchen Pflanzen sich das

<sup>1</sup> Es sei darauf aufmerksam gemacht, daß bei Mykorrhizen Ausbildung von Zellulosescheiden oder „Buchsen“ um die Pilzhyphen vorkommt [BURGEFF, H.: Saprophytismus und Symbiose, S. 168, 170, 181. Jena 1932. — FREISLEBEN, R.: Ber. dtsch. bot. Ges. 51, 355 (1933); Jb. Bot. 80, 441 (1934)].

findet. Außerdem gibt es wenige Zellen, durch die zwar Schläuche hindurchgewachsen sind, die aber im Cytoplasma keine Bakterien zeigen. Diese Zellen gleichen im übrigen vollständig den in keiner Weise infizierten, insbesondere besitzen sie gleich große Kerne, sie verhalten sich also so, als ob die Schläuche gar nicht da wären, wiewohl diese sich verzweigen und ansehnliche Dicke erreichen können (Abb. 13, 14). Daraus folgt, daß im vorliegenden Falle die Bakterien in den Schläuchen zwar

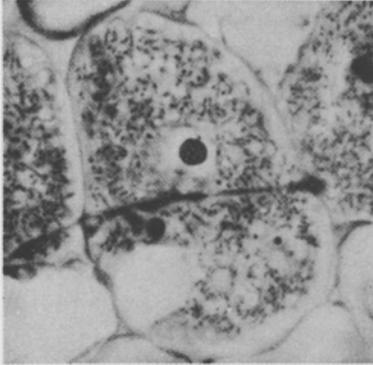


Abb. 10.

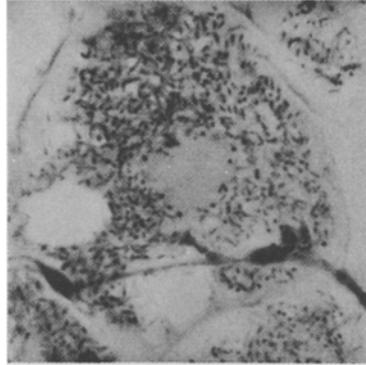


Abb. 11.

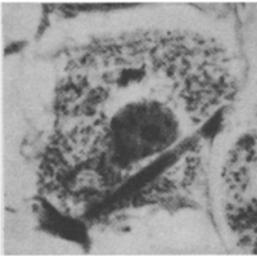


Abb. 12.

Abb. 10—12. Mit Bakterien gefüllte Zellen, darin zugleich ein ungeöffneter Infektionsschlauch. Vergr. 900.

ernährt werden und sich in gewissen Grenzen vermehren, daß sie dagegen auf die Zelle nicht denjenigen Einfluß ausüben können, der vorliegt, sobald sie in das Cytoplasma übergewandert sind, und der Zelle wie Kern zu starker Volumenzunahme veranlaßt. Vielleicht ist auch hier die in einem früheren Absatz erwähnte Durchlässigkeit der Schleims substanz im Spiele.

Es ist zu erwähnen, daß die Schläuche gelegentlich in Interzellularen gefunden werden, und zwar nicht in vorgebildeten, sondern in Gängen, die sie selbst durch Auflösung der Mittellamelle gebildet haben. In Anbetracht der Fähigkeit der Endophyten, Zellwände zu durchdringen, ist es nicht verwunderlich, wenn an manchen Stellen die verhältnismäßig leicht lösliche Pektinsubstanz der Mittellamelle besonders stark angegriffen wird und die Schläuche ihr folgen. Schon PRAZMOWSKI (1890)

bringt eine Abbildung, die zeigt, daß bei der Erbse die Schläuche sich beim Durchtritt von einer Zelle zur anderen in der Mittellamelle stark erweitern; ähnliches konnte auch bei *Neptunia* beobachtet werden. Ferner bringt MILOVIDOV (1926, S. 337) Angaben über intercellulare Zoogloen.

Wenn auch die Umgestaltung der Bakterien in die Bakteroiden eine bekannte Erscheinung ist, lohnt es sich doch, in Kürze darauf einzugehen, wie der Vorgang sich im vorliegenden Falle abspielt, während dessen die betreffenden Zellen übrigens beträchtlich wachsen (Abb. 2). Zunächst werden die Bakterien größer, vor allem nimmt ihre Länge zu, sie verlieren die gerade Stäbchenform, es treten bereits keulige Gebilde

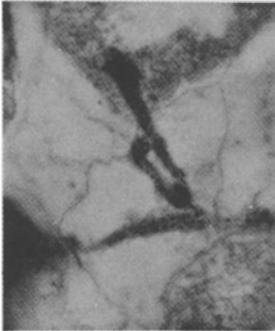


Abb. 13.

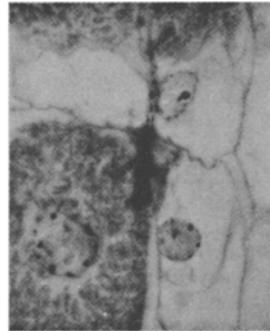


Abb. 14.

Abb. 13 und 14. Bakterienfreie Zellen mit Infektionsschläuchen, die ihre Bakterien nicht entlassen. Vergr. 900.

auf (Abb. 15), und unter weiterer Größenzunahme entstehen gekrümmte Keulen, schlangenähnliche und unregelmäßig längliche Gestalten (Abb. 16). Diese schwellen zur Birnenform an, und schließlich werden Blasen daraus (Abb. 17), die gegenüber der ursprünglichen Größe der Stäbchen stark an Umfang zugenommen haben. In das Cytoplasma einwandernde Stäbchen messen  $0,4 : 1 \mu$ , nach ihrer Verbreitung darin durchschnittlich  $0,5 : 1,5 \mu$ , die Blasen haben einen Durchmesser von  $2,5 \mu$  im Durchschnitt. MORCK (1891), der die Bakteroiden von 65 Leguminosenarten untersucht und beschrieben hat, bildet für *Neptunia oleracea* auch Y-Formen ab; diese habe ich zwischen den erwähnten Gestalten ganz selten gefunden. In den Birnenformen und besonders in den Bläschen sind rundliche, stark lichtbrechende Körper zu sehen. Es handelt sich sehr wahrscheinlich um einen in Menge angesammelten Reservestoff, jedoch nicht Fett, denn Schwärzung mit der Osmiumsäure des Fixierungsmittels nach BENDA erfolgt nicht. Diesen Stoff in gleicher Form hat bereits DANGEARD (1926, S. 168) in Birnen- und Bläschenbakteroiden bei anderen Leguminosen beobachtet, er tritt also offenbar in diesem

weit fortgeschrittenen Zustand der Veränderung häufig auf. Eine interessante Angabe findet sich bei PRAZMOWSKI (1890, S. 206). Er schreibt, bei der Erbse seien die Bläschenbakteroiden verhältnismäßig selten, häufiger bei *Trifolium*- und *Medicago*-Arten, und sie würden namentlich in solchen Knöllchen massenhaft angetroffen, die samt den Wurzeln

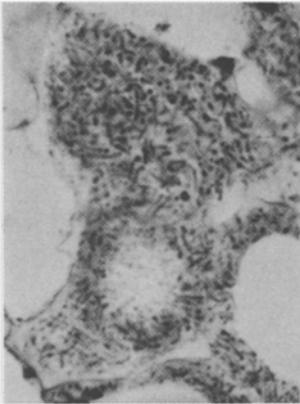


Abb. 15.

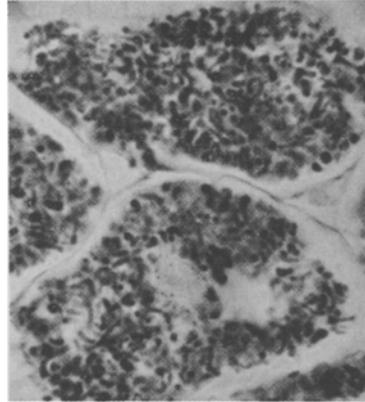


Abb. 16.

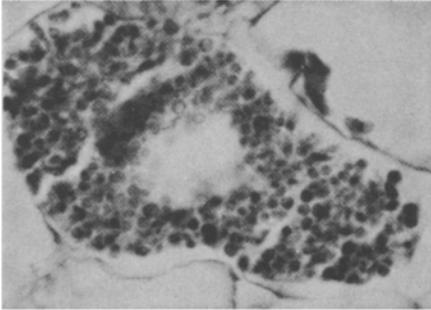


Abb. 17.

Abb. 15—17. Umwandlung der Stäbchen in Bakteroiden. Abb. 15. Beginn der Gestaltsveränderung; Abb. 16. Stark veränderte Stäbchen; Abb. 17. Bläschen. Vergr. 900.

längere Zeit in Wasser untergebracht worden seien. Der Aufenthalt unter Wasser scheint danach die Ausbildung der Bläschenbakteroiden, die sonst nicht allzu häufig sind, zu begünstigen, und das würde ja gerade für die Wasserwurzelknöllchen der *Neptunia* in erster Linie zutreffen. Veränderungen der Zellkerne konnten in den bakteroidenhaltigen Zellen mit Ausnahme der Vergrößerung nicht festgestellt werden, leichte Gestaltsunregelmäßigkeiten gehen auf die Wirkung des Fixierungsmittels zurück, sie können auch in nicht infizierten Zellen beobachtet werden, und wenn MILOVIDOV (1928, S. 59) für die ersteren amöboide Zellkerne beschreibt, so hat er sicherlich Fixierungsartefakte vor sich gehabt.

Befindet sich in einer bakterienführenden Zelle ein Schlauch, so bleiben die darin eingeschlossenen Stäbchen von den beschriebenen Gestaltsveränderungen unberührt, worüber bald ausführlicher zu berichten sein wird (S. 18). Doch kann es vorkommen, daß ein Schlauch sich nachträglich öffnet, und dann liegt zwischen den Bakteroiden eine Ansammlung von unveränderten Stäbchen<sup>1</sup> (Abb. 18), die freilich bald das gleiche Schicksal haben werden wie die früher in das Cytoplasma übergetretenen. Es scheint mir, daß der in Rede stehende Vorgang durch Sprengung des Schlauches infolge von starker Vermehrung der Bakterien zustande kommt, denn man kann auffallend große blasige Erweiterungen der Schläuche antreffen und nicht selten in jenen Häuten

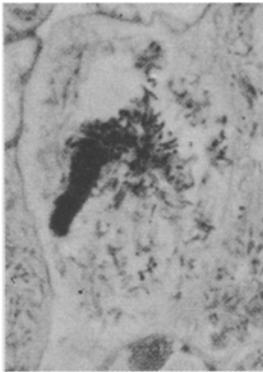


Abb. 18.

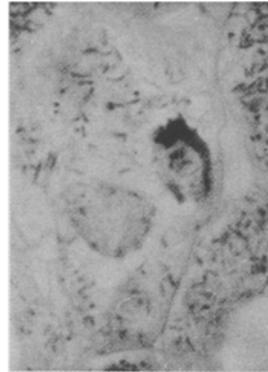


Abb. 19.

Abb. 18 und 19. Späte Öffnung von Infektionsschläuchen. Vergr. 900.

intakter Stäbchen noch die Form der Schlauchanschwellungen wiedererkennen (Abb. 18, 19). Diese nachträgliche Öffnung ist in manchen Knöllchen keine seltene Erscheinung, in einem, dessen Schnitte ich durchsuchte, war sie geradezu die Regel, so daß Schläuche und Bakteroiden gleichzeitig in einer Zelle nur selten angetroffen wurden.

Daß die Bakteroiden schließlich abgebaut werden und das Gewebe der Knöllchen degeneriert, ist bekannt; so wird denn auch aus denen von *Neptunia*, wenn sie ein bestimmtes Alter erreicht haben, auf Druck eine schleimige Masse entleert. Aber genaue Angaben über die Einzelerscheinungen des Abbaues sind recht spärlich. Wie DANGEARD (1926, S. 168 f.) schreibt, schwindet der färbbare Inhalt der deformierten Bakterien, und zwar unter dem Einfluß von Protease, die der Kern ausscheiden soll. SCHAEDE (1932, S. 418 ff.) hat an den Knöllchen von *Lupinus*

<sup>1</sup> Nachträgliche Öffnung von Schläuchen kann sogar noch eintreten, wenn der Abbau der Bakterien schon begonnen hat.

*albus* nachgewiesen, daß die plasmatischen Bestandteile der endophytischen Bakterien abgebaut werden, während ihre Membranen übrig bleiben. Dasselbe gilt im großen und ganzen auch für *Neptunia oleracea*. Die Verdauung macht sich optisch in einem Schwinden der Färbbarkeit des Plasmas bemerkbar (Abb. 2), die Bakteroiden verblässen also, und zwar pflegt dieser Vorgang in dem Bläschenzustand einzusetzen (Abb. 20). Doch konnte hinsichtlich des Beginnes bei *Neptunia* in den einzelnen Knöllchen verschiedenes Verhalten beobachtet werden, indem nämlich bereits die Birnenformen verblässen können, in anderen Fällen die stark deformierten Stäbchen, ja einmal sogar schon die vergrößerten Stäbchen; hier fing demnach der Abbau des Bakterienplasmas bereits an, ehe sich richtige Bakteroiden gebildet hatten.

Nach vollendeter Verdauung der Bakterien schrumpfen ihre Membranen infolge des Turgorverlustes zu unregelmäßigen Gebilden ein, die meistens untereinander verkleben. Im weiteren Verlauf können zwei Wege eingeschlagen werden. Entweder ballen sich die Membranreste zu einem wirren Haufen zusammen, die sie bergende Zelle stirbt ab und wird nach Schwinden ihres

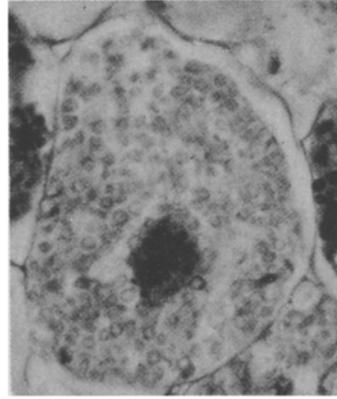


Abb. 20. Die Verdauung der Bläschenbakteroiden ist im Gange. Vergr. 900.

Innendruckes von den turgeszenten Nachbarn zusammengedrückt. Oder es entsteht in der Zelle eine schleimige flockige Substanz, vielleicht durch Verquellen und Verschleimen der Bakterienmembranen, die nicht mehr sichtbar sind. In diesem Falle können die abgestorbenen Wirtszellen ihres Inhaltes nicht zerdrückt werden, sondern ihre Wände werden nach innen durchgebogen. Beide Vorgänge können sich in den einen Knöllchen nebeneinander abspielen, in anderen findet man wiederum streng geschieden entweder den ersten oder den zweiten.

Von dem Cytoplasma der Wirtszellen, in denen Bakterienverdauung stattfindet oder vollendet ist, läßt sich nichts Rechtes mehr erkennen, es muß sich um so geringe Mengen in so dünner Schicht handeln, daß sie sich der Beobachtung entziehen. Dagegen werden die großen Kerne ohne Schwierigkeiten nachgewiesen. Sie sind anscheinend noch unverändert, wenn die plasmatischen Bestandteile der Bakterien so gut wie vollständig abgebaut sind; inwieweit gewisse Abweichungen ihrer Form von der Kugelgestalt der Natur entsprechen oder auf die Fixierungsmittel zurückgehen, kann man nicht sagen. Die Kerne sind auch noch vorhanden, wenn von den Bakterien nur noch die Membranreste übrig

sind oder die schleimige Substanz sich bildet, immer solange die Zellen noch turgeszent sind. In diesen späten Stadien haben die Kerne jedoch sehr eigenartige, vollkommen unregelmäßige Formen angenommen und zeigen hinsichtlich der Färbbarkeit Abweichungen von den normalen, daß man sie mit Recht für stark von den Degenerationserscheinungen in Mitleidenschaft gezogen ansprechen wird. Nach dem Verlust des Turgors der Zellen konnten die Kerne nicht mehr ermittelt werden. Diesem Befund zufolge ist es sicher, daß nicht nur die wertvollen Stoffe der Bakterien, sondern auch Cytoplasma und Kerne der sie beherbergenden Zellen von dem benachbarten Gewebe resorbiert werden.

Auf die Bakterien in den Schläuchen haben die Abbauerscheinungen keinerlei Einfluß, sie verwandeln sich ja auch, wie oben erwähnt worden ist, nicht in Bakteroiden. Man findet also im Endstadium zu seiner Überraschung die Stäbchen im Schlauch vollkommen unverändert, während von denen im Cytoplasma nur noch die beschriebenen Reste vorhanden sind. Das ist bereits PRAZMOWSKI (1890, S. 200, 229) und BEIJERINCK (1894, S. 730) aufgefallen; dieser sagt auch schon, daß es vielleicht die Schleimhülle sei, durch die die Bakterien vor der Beeinflussung vonseiten des Cytoplasmas geschützt werden. Der früher (S. 11) beschriebene Färbeversuch mit Kongorot, in dem sich allein der Schlauchmantel färbte, nicht aber der Schlauchinhalt, hat den Nachweis für die Undurchlässigkeit der Schleimsubstanz gegenüber bestimmten Stoffen erbracht, und zu diesen gehören, wie wir jetzt genau angeben können, sowohl die Stoffe, welche die Umwandlung der Stäbchen in Bakteroiden bewirken, als die Enzyme, welche die Verdauung der Bakterien besorgen.

BEIJERINCK (1888, S. 727) wie PRAZMOWSKI (1890, S. 200) geben an, daß sich aus alten entleerten Knöllchen *Bacterium radicolica* leicht isolieren lasse, während das in früheren Zuständen weniger einfach sei. Die Präparate alter Knöllchen mit der schleimigen Degeneration der Bakterienreste bringen die Lösung dieser etwas merkwürdigen Sache. In der Schleimsubstanz können nämlich ganz normale Stäbchen angetroffen werden. Ein Einbruch fremder Bakterien von außen her kommt nicht in Betracht, weil das Gewebe der Knöllchen, insbesondere das Periderm, noch nicht zerstört ist. Es kann also nur *Bacterium radicolica* sein, das sich aus den unversehrt gebliebenen Schläuchen befreit und in dem Schleim verbreitet hat, was übrigens schon PRAZMOWSKI (1890, S. 230) als möglich angenommen hatte. Diese so späte Öffnung der Schläuche ist ohne weiteres verständlich unter der Voraussetzung, daß ihr Mantel von der Zelle gebildet wird; denn nach dem Tode der Zelle kann der Mantel nicht mehr entsprechend der Vermehrung der Bakterien instand gehalten und darum gesprengt werden. Unter solchen Umständen ist es ohne weiteres verständlich, wenn aus alten Knöllchen, obwohl deren Bakteroiden vollständig verdaut sind, das Bakterium ohne Schwierigkeit isoliert werden kann.

Es wurde eben gesagt, in dem Schleim seien ganz normale Stäbchen zu finden. Hier ist eine Einschränkung zu machen, weil die Bakterien in einzelnen Fällen auffallend blaß gefärbt waren. Wenn man die Verhältnisse beim Abbau der Bakteroiden berücksichtigt, wo ja eine Abnahme der Färbbarkeit infolge von Schwinden des Plasmas vorliegt, so wird man dasselbe für die in Rede stehenden Stäbchen in Betracht ziehen. Die Ursache hierfür könnte sein, daß gelegentlich noch proteolytische Enzyme in dem Schleim vorhanden sind, von denen die in ihn eingewanderten Bakterien angegriffen werden.

Die Untersuchung der Knöllchen der Erdwurzeln brachte übrigens das gleiche Ergebnis wie die der Wasserwurzelknöllchen.

Zum Schlusse wollen wir in einer Zusammenstellung betrachten, in welcher Weise sich die Endophyten und die Wirtszellen gegenseitig beeinflussen, soweit sich das mit Hilfe des Mikroskopes erfassen läßt. Das Ergebnis wird nicht allein für *Neptunia oleracea* gelten, sondern auch für alle Leguminosen mit ähnlichem Befund. Die in den Infektionsschläuchen eingeschlossenen Bakterien veranlassen die Wirtszellen zu gesteigerter Teilungstätigkeit, sie finden gewisse Mengen von Nahrung, so daß sie sich innerhalb bestimmter Grenzen vermehren können und ein Wachstum der Schläuche ermöglicht wird. Indessen werden sie nicht in Bakteroiden umgewandelt, auch nicht verdaut, obwohl sich diese Vorgänge in der nächsten Umgebung der Schläuche abspielen; die Schleimhülle schützt sie vor der dahin gerichteten Einwirkung seitens der Wirtszellen. Wenn diese einen Schlauch beherbergen, der geschlossen bleibt und darum keine Bakterien in das Cytoplasma entläßt, verhalten sich die Zellen genau so wie nicht infizierte. Dagegen finden wir wesentlich andere Wechselwirkungen, wenn die Bakterien und das Cytoplasma der Wirtszellen nach Öffnung der Schläuche in unmittelbare Berührung miteinander getreten sind, und zwar ausschließlich unter dieser Voraussetzung. Die Wirtszellen wie ihre Kerne werden zu starker Größenzunahme veranlaßt, die Teilungsfähigkeit dagegen unterdrückt. Die Bakterien werden größer und vermehren sich sehr schnell, sie finden demnach anfangs günstigere Lebensbedingungen als in den Schläuchen. Dann aber erfolgt ihre Verwandlung in Bakteroiden, und schließlich werden sie von den Wirtszellen verdaut. Die in das Cytoplasma übergetretenen Bakterien sind bei normalem Ablauf der Symbiose trotz der zunächst guten Entwicklung unfehlbar dem Tode verfallen; man bekommt den Eindruck, als würden sie von der Wirtspflanze gemästet und dann für die eigene Ernährung verbraucht. Aber auch die Wirtszellen mit infiziertem Cytoplasma sterben immer nach Verdauung der Bakterien ab. Alle wertvollen Substanzen werden sicherlich von den Nachbarzellen resorbiert.

### Zusammenfassung.

An frei im Wasser gewachsenen Adventivwurzeln der Leguminose *Neptunia oleracea* LOUR. wurden zahlreiche Bakterienknöllchen gefunden, an den Erdwurzeln der gleichen Pflanze befanden sich dagegen nur wenige. Die Wasserwurzelknöllchen waren bisher noch nicht bekannt.

Die Infektion der Wurzeln erfolgt im vorliegenden Falle nicht durch die Wurzelhaare, denn diese fehlen, sondern durch die Epidermis, vielleicht durch Verletzungen.

Die Infektionsschläuche veranlassen die Wirtszellen zu verstärkter Teilungstätigkeit, sie reichen weit in das Knöllchenmeristem hinein, nur dessen äußerste Zellschichten sind frei von ihnen. Wo die Schläuche nicht im Wachstum begriffen sind, treten auch keine Zellteilungen auf.

Die Einwanderung der Bakterien aus den Schläuchen in das Cytoplasma der Wirtszellen konnte in allen Einzelheiten beobachtet werden. Die Stäbchen kommen in einzelnen Ketten aus den Schläuchen heraus, oder sie verbreiten sich in größerer Zahl ausstrahlend aus füllhornähnlichen Erweiterungen der Schlauchenden.

Unmittelbar nach der Infektion des Cytoplasmas werden die Teilungen der Wirtszellen eingestellt, doch vergrößern sich diese wie auch ihre Kerne. Die Bakterien im Cytoplasma vermehren sich beträchtlich schneller und werden größer als die in den Schläuchen.

Die Schläuche besitzen einen Mantel, darin liegen in einer Schleimsubstanz die Bakterien. Ausschließlich der Mantel färbt sich mit Chlorzinkjod blau, er läßt sich auch mit verschiedenen Farbstoffen nachweisen; mit dem Kolloid Kongorot färbt er allein sich rot, während der ganze Schlauchinhalt ungefärbt bleibt. Daraus lassen sich wichtige Schlüsse auf die Durchlässigkeit der Schleimsubstanz ziehen. Da Schlauchmantel und Zellmembranen die gleiche Reaktion und Färbbarkeit zeigen, ist ersterer möglicherweise ein Erzeugnis der Zelle.

In manchen Zellen entlassen die Schläuche nie Bakterien, diese Zellen verhalten sich geradeso wie nicht infizierte.

Die Umwandlung der Stäbchen in Bakteroiden und besonders deren Abbau wurden eingehend untersucht. Von diesen Erscheinungen bleiben die in Schläuchen eingeschlossenen Stäbchen vollkommen unberührt, ihre Schleimhülle schützt sie. Die Zellen mit infiziertem Cytoplasma sterben nach der Verdauung der Bakteroiden stets ab.

Entlassung von Stäbchen aus Schläuchen nach Verdauung der Bakteroiden kommt vor, so daß sich in deren schleimigen Überresten intakte Bakterien befinden können.

## Literatur.

**Beijerinck, M. W.:** Die Bakterien der Papilionaceenknöllchen. Bot. Ztg 46 (1888); *Verzamelde Geschriften* 2, 1921. — Über die Natur der Fäden der Papilionaceenknöllchen. Zbl. Bakter. 15 (1894); *Verzamelde Geschriften* 3 (1921). — Die durch Bakterien aus Rohrzucker erzeugten Wandstoffe. *Fol. microbiologica* 1 (1912); *Verzamelde Geschriften* 5 (1922). — **McCoy, E. F.:** A Cytological and Histological Study of Root Nodules of the Bean, *Phaseolus vulgaris* L. Zbl. Bakter. II. Abt. 79 (1929). — **Dangeard, M. P.-A.:** Recherches sur les Tubercules radicaux des Légumineuses. *Botaniste* 16 (1926). — **Milovidov, P. F.:** Über einige neue Beobachtungen an Lupinenknöllchen. Zbl. Bakter. II. Abt. 68 (1926). — Ein neuer Leguminosen-Knöllchenmikrob (*Bacterium radicolica* forma *Carmichaeliana*). Zbl. Bakter. II. Abt. 73 (1928). — **Morck, D.:** Über die Formen der Bakteroiden bei den einzelnen Spezies der Leguminosen. Diss. Leipzig 1891. — **Prazmowski, A.:** Über die Wurzelknöllchen der Leguminosen. Bot. Zbl. 36 (1888). — Die Wurzelknöllchen der Erbse. Landw. Versuchsstat. 37 (1890). — **Schaede, R.:** Das Schicksal der Bakterien in den Knöllchen von *Lupinus albus* nebst cytologischen Untersuchungen. Zbl. Bakter. II. Abt. 85 (1932). — **Suessenguth, K. u. R. Beyerle:** Über die Bakterienknöllchen am Sproß von *Aeschynomene paniculata* Willd. *Hedwigia* 75 (1936). — **Tunmann-Rosenthaler:** Pflanzenmikrochemie. Berlin: Gebrüder Bornträger 1931.

---