

(Aus dem bakteriologischen Laboratorium des botanischen Instituts der k. ung. Hochschule für Berg- und Forstingenieure in Sopron. Vorstand: Prof. FEHÉR.)

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BAKTERIELLE WURZELSYMBIOSE EINIGER LEGUMINOSENHÖLZER ¹⁾.

Von

D. FEHÉR und R. BOKOR.

Mit 4 Textabbildungen.

Der Zweck der vorliegenden Untersuchungen war, die Wurzelsymbiose einiger Leguminosenhölzer, die noch überhaupt nicht oder weniger erforscht sind, zu erforschen und die Verwandtschaft der Wurzelbakterien auf serologischem Wege zu bestimmen.

1. *Amorpha fruticosa*.

Die Wurzeln dieses Baumes zeigen bereits bei der morphologischen Untersuchung die charakteristischen Wurzelknöllchen der Leguminosen. Die Knöllchen sind meistens schwarzbraun gefärbt. Sie haben mehr oder weniger rundliche Gestalt, sind aber gewöhnlich einfach gebaut und weisen in der Regel keine Verzweigung auf. Sie werden gewöhnlich bereits in dem ersten Jahre ihrer Entstehung von einem Periderm bedeckt, das jedoch wie bei den Wurzelknöllchen der Robinie (Abb. 1) oberhalb der Gefäßbündel von Lentizellen-ähnlichen Bildungen unterbrochen wird, um dadurch den Stoffaustausch ermöglichen zu können. Die Knöllchen entstehen aus der primären Rinde der Wurzel und werden von zahlreichen Abzweigungen der Gefäßbündel der Wurzel durchzogen. Ihre Größe beträgt in der Regel 1—4 mm. Sie bleiben selten über 2 Jahre am Leben und sterben dann ab; ihr Inhalt schwindet langsam und wird allmählich von den übrigen Geweben der Wurzel abgestoßen. Dementsprechend findet man sie am meisten an 1—3jährigen Verzweigungen der Wurzel.

Ihre äußere Form und Größe weicht daher ganz wesentlich von den Knöllchen der übrigen Leguminosen, namentlich von denen der *Robinia pseudacacia* ab.

¹⁾ Vorgelegt der III. Abt. der kgl. ung. Akademie der Wissenschaften.

Das innere Gewebe der Knöllchen besteht aus großen parenchymatischen Zellen, die unter dem Periderm von einer dünnen Schicht parenchymatischer Zellen normaler Form und Größe umgeben werden. In dieses Gewebe sind die Gefäßbündelverzweigungen eingebettet. Das großzellige Parenchym bildet das bakterioide Gewebe, dessen Zellen besonders in jungem Zustande von den Bakterien vollkommen ausgefüllt sind und deshalb mit Bakterienfarbstoffen (Fuchsin, Spirsil, Gentianaviolett usw.) stärkere Farbenreaktion zeigen. Wir konnten es besonders schön und deutlich mit dem Spirsil färben. Die für das Eindringen und die Weiterbewegung der Knöllchenbakterien so charakteristische Schläuche findet man in allen Zellen vor (Abb. 2). Es sind sogar außer den bakterioiden Zellen die Bakterien und Schläuche auch in den Zellen der parenchymatischen Rindenschicht nachzuweisen und zu beobachten.

Schon bei einfachen Anstrichpräparaten, die man durch Zerquetschen von lebenden Knöllchen gewinnt, kann man deutlich und vollkommen einwandfrei ermitteln, daß in den Knöllchen außer dem *Bacterium radicicola* noch ein zweites Bakterium anwesend ist. Das letztere ist viel dünner und kleiner als *Bacterium radicicola*, kommt aber in den meisten Knöllchen in großen Mengen vor.

Die beiden Arten konnten dann mit der Anwendung des selektiven Kulturverfahrens ohne besondere Schwierigkeiten nachgewiesen, getrennt und reingezüchtet werden. Die Kulturen des *Bacterium radicicola* zeigen auf Bohnenextraktagar-Nährboden (nach KOCH) die bekannten Merkmale der von *Robinia* reingezüchteten Art. Ihre morphologische Diagnose bereitete daher keine Schwierigkeiten. Die Kulturen des anderen Genus waren bereits auf den Agarplatten nach ihrer äußeren Form von den Kolonien des *Bacterium radicicola* zu unterscheiden.

Um die Biologie des aus den Wurzelknöllchen der *Amorpha* reingezüchteten *Bacterium radicicola* näher kennen zu lernen, haben wir mit ihm die verschiedenen Nährböden erprobt mit folgendem Erfolge:

Am besten gedeiht es auf *Bohnenextraktagar* (Abb. 3).

Die Kolonien sind ganzrandig, wenig erhaben, anfangs milchglasartig durchscheinend und glänzend weiß. Ihre Farbe wird später ganz weiß und am Boden der Eprovette sammelt sich ein weißer Niederschlag. Die Bakterienmasse der Kolonie ist stets homogen und wird in älterem Stadium zähe. Die Form der Bakterien ist: kleine, dicke Stäbchen mit abgerundeten Enden. In älteren Stadien werden sie von einer Schleimhülle umgeben. Größe in jungen Kulturen 0,8—0,9 μ breit und 1,2—2,4 μ lang, in älteren Kulturen 1,8 μ breit und bis 3,6 μ lang. In dem letzteren Stadium nehmen sie ganz elliptische Formen an, und ihr Protoplasma weist eine grobkörnige Struktur auf.

Bodenextraktagar (nach LÖHNIS). Die Kolonien sind den oben beschriebenen ähnlich. Ihr Wachstum ist jedoch langsamer.

Fleischpeptonagar. Wachstum sehr langsam. Die Kolonien werden wellenrandig, gelbfarbig, in der Mitte erhaben und von grobkörniger Struktur. Ihre Oberfläche ist wellig.

Fleischpeptongelatine: kein Wachstum.

Fleischbouillon: kein Wachstum.

Milch: Wachstum sehr langsam. Die Bakterien bleiben nach erfolgter Teilung kettenförmig beisammen und werden von einer gemeinsamen Schleimhülle als Scheide umgeben, die den in den Knöllchen sichtbaren Schläuchen ähnlich sieht.

Kartoffel: Wachstum gut. Kolonie wellenrandig, mattgelb. Wächst als dichter Überzug.

Luftbedürfnis: Anaerob gezüchtet wächst die Kolonie sehr kümmerlich und nur auf Bohnenextraktagar. Sie hat dasselbe Aussehen, wie aerob. Auf Fleischagar und -gelatine kein Wachstum. Infolgedessen glauben wir uns berechtigt, anzunehmen, daß das *Bacterium radicola* — abweichend von der bisherigen Auffassung — fakultativ aerobiont ist. Der Umstand, daß es anaerob nur auf dem Bohnenextraktagar, also nur in Anwesenheit von größeren Mengen von Kohlehydraten wächst, läßt darauf schließen, daß es zu seiner intramolekularen Atmung Kohlehydrate benutzen kann.

Das zweite isolierte Bakterium wurde nach seinem kulturellen und morphologischen Verhalten als *Bacillus mycoides* (FLÜGGÆ) identifiziert und damit der Beweis einer eigenartigen Symbiose der *Amorpha fruticosa* mit zwei Bakteriumarten erbracht.

Um der physiologischen Bedeutung dieser Symbiose näher treten zu können, wurden nun sterile Kulturen von *Amorpha fruticosa* in dem Versuchsgewächshause aufgestellt.

Die vorher sorgfältig sterilisierten Samen wurden in sterilem Keimbett vorbehandelt, und die so erzeugten sterilen Keimlinge wurden dann im Impfkasten in sterile Lombiken getan, welche mit sterilen Nährlösungen nach CRONE beschickt waren, und deren Mündung mit einem Wattebausch ständig gut verschlossen war, und hierauf in sterilen Quarzsand gebracht und gezüchtet. Ein Teil der Versuchspflanzen diente ungeimpft als Kontrolle, der andere Teil wurde getrennt mit *Bacterium radicola* bzw. *Bacillus mycoides*, der letzte Teil mit beiden Arten gleichzeitig geimpft. Der Versuch hat nun gezeigt, daß das optimale Wachstum erst beim Vorhandensein beider Bakterienarten erreicht wird. Den Auszug des Versuchsprotokolls zeigt, in Durchschnittszahlen angegeben, Tabelle 1.

Tabelle I. Sterile Anzucht von *Amorpha fruticosa*. I. Kontrolle. II. geimpft mit *Bacillus mycoides* (Flügge). III. geimpft mit *Bacterium radicola*. IV. geimpft mit beiden Arten.

Nr.	Stammlänge am Ende des Versuches:	Zahl der Seitenzweige:	Entwicklung von Knöllchen	Dauer:	Anmerkung:
I.	7	1	0	Vom	Sehr kräftige Exemplare.
II.	10	1	0	16. VI. 1925	
III.	18	3	Kleine Anschwellungen, als Anfangsstadium der Knöllchenbildung.	bis 30. X. 1925.	
IV.	20	4		136 Tage.	

Die Verwandtschaft dieses Bakteriums mit dem Wurzelbakterium der Robinie wurde mit Kaninchenblutserum auf dem Wege der Agglutination bestimmt. Die 24stündigen Kulturen des *Amorpha*-Bakteriums wurden 1 Stunde lang bei 55° C abgetötet und in physiologischer Kochsalzlösung mit steigenden Dosen von 1—4 cm³ (mitunter viermal mit 4 cm³) Aufschwemmung intravenal so lange geimpft, bis eine Reaktion beim Tiere eingetreten ist (starkes Fieber, Abmagerung usw.) und ein höherer Agglutinationstiter mit demselben Stamm erreicht wurde. Dies geschah etwa achtmal, und so wurde nach 16 Tagen aus dem Blut des Versuchstieres das Agglutinationsserum nach gründlichem Auszentrifugieren bereitet. Die Agglutinationsversuche wurden mit kleinen Reagensgläsern ausgeführt. Die Agglutinationstiter, bezogen auf die von den anderen untersuchten Holzarten reingezüchteten *Radicicola*-Arten, zeigen die Tabellen 2, 3 und 4. Es sei hier bemerkt, daß der Agglutinationstiter des ungeimpften Kaninchenblutserums bei 1 : 10 liegt.

2. *Gleditschia triacanthos*.

Auf den Wurzeln dieser Holzpflanze werden keine Wurzelknöllchen gebildet. Erst die nähere Untersuchung zeigte uns, daß die 1- und 2-jährigen jungen Wurzeln massenhafte Anschwellungen zeigen, welche, abgesehen von ihrer Dicke, von den übrigen Wurzelteilen sich auch dadurch unterscheiden, daß sie ganz unabhängig von ihrer Lage und von ihrem Alter mit Wurzelhaaren dicht bedeckt sind. Die dicht nebeneinander stehenden und meistens rotbraunen Haare können bereits mit dem freien Auge als dichter Pilzüberzug wahrgenommen werden.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte nun, daß die Wurzelschwellungen aus dem Gewebe der primären Rinde gebildet werden. In den parenchymatischen Zellen dieses Gewebes kann man sodann die

typischen Vordringungsschläuche und die Wurzelbakterien selbst nachweisen.

Diese Anschwellungen bleiben gewöhnlich bis zum 2.—3. Jahre am Leben; mit der immer mächtiger fortschreitenden Entwicklung des aus dem Perikambium entstehenden Periderms werden sie dann langsam nach Schwinden des lebenden Inhaltes der Zellen allmählich abgetrennt. Die Wurzelhaare zeigen gelbbraunen, homogenen Inhalt. Die Reinkulturen, welche aus 1—2-jährigen Anschwellungen geimpft und angezüchtet waren, konnten makro- und mikroskopisch als die Kolonien des *Bacterium radicola* identifiziert werden. Sie sind übereinstimmend mit unseren *Amorpha*-Erfahrungen fakultativ aerob.

3. *Laburnum vulgare*.

Die Wurzelknöllchen sind nach dem Typus der Robinie gebaut. Aus ihnen wurde ebenfalls auf Bohnen- und Bodenextraktagar *Bacterium radicola* reingezüchtet. Seine Morphologie und Biologie ist ganz ähnlich dem von der *Robinia pseudacacia* reingezüchteten *Radicola*-Art. Seinen Agglutinationstiter enthält Tabelle 3.

Tabelle 2. Die Agglutinationstiter des mit *Bacterium radicola* der *Amorpha fruticosa* geimpften Kaninchenblutserums.

Verdünnungen.	Die Agglutination ist erfolgt bei den Bakterien von			
	<i>Robinia</i>	<i>Amorpha</i>	<i>Laburnum</i>	<i>Gleditschia</i>
	reingezüchteten Arten.			
1:10	+	+	+	+
1:100	+	+	+	+
1:200	+	+	+	+
1:500	+	+	+	+
1:1000	+	+	+	0
1:2000	+	+	0	0
1:3300	0	+	0	0
1:4000	0	+	0	0
1:5000	0	+	0	0
1:10000	0	0	0	0

4. *Sophora japonica*.

In den Wurzeln waren Bakterien weder anatomisch, noch bakteriologisch nachzuweisen.

5. *Robinia pseudacacia*.

Nachdem die Wurzelbakterien der Robinie genügend erforscht sind, haben wir nun die Verwandtschaft mit den anderen von uns unter-

suchten Symbionten auf serologischem Wege untersucht. Die Ergebnisse enthält Tabelle 4. Die von der Robinie reingezüchteten Stämme haben sich auch als fakultativ aerob erwiesen.

Tabelle 3. Die Agglutinationstiter des mit *Bacterium radicolica* des *Laburnum vulgare* geimpften Kaninchenblutserums.

Verdünnungen	Die Agglutination ist erfolgt bei den Bakterien von			
	<i>Robinia</i>	<i>Amorpha</i>	<i>Laburnum</i>	<i>Gleditschia</i>
	reingezüchteten Arten			
1:10	+	+	+	+
1:100	+	+	+	+
1:200	+	+	+	+
1:500	+	+	+	+
1:1000	+	+	+	0
1:2000	+	0	+	0
1:3300	+	0	+	0
1:4000	+	0	+	0
1:5000	+	0	+	0
1:10000	0	0	+	0

Tabelle 4. Die Agglutinationstiter des mit *Bacterium radicolica* der *Robinia pseudacacia* geimpften Kaninchenblutserums.

Verdünnungen	Die Agglutination ist erfolgt bei den Bakterien von			
	<i>Robinia</i>	<i>Amorpha</i>	<i>Laburnum</i>	<i>Gleditschia</i>
	reingezüchteten Arten			
1:10	+	+	+	+
1:100	+	+	+	+
1:200	+	+	+	+
1:500	+	+	+	+
1:1000	+	+	+	+
1:2000	+	+	+	0
1:3300	+	0	+	0
1:4000	+	0	+	0
1:5000	+	0	+	0
1:10000	+	0	0	0

Zusammenfassung der Resultate.

1. In den Wurzelknöllchen der *Amorpha fruticosa* wurde die gleichzeitige Symbiose zweier Bakterienarten, des *Bacterium radicolica* und des *Bacillus mycoides* (FLÜGGE), nachgewiesen.

2. Die Knöllchen der *Amorpha* zeigen insoweit einen abweichenden Bau, als sie keine Abzweigungen und im Vergleich zu dem Robinientyp mehr rundliche Form und viel geringere Größe haben.

3. Mit dem sterilen Vegetationsversuch konnte ganz einwandfrei der Nachweis erbracht werden, daß das optimale Wachstum erst im Beisein beider Bakterienarten zustande kommen kann.

Der Umstand, daß das *Bacterium radicolica* auf Bohnenextraktagar, wo ihm Kohlehydrate und Eiweiß reichlich geboten werden, auch unter anaeroben Verhältnissen gedeihen kann, läßt darauf schließen, daß es mangels genügender Luft auch zur *parasitischen Lebensweise befähigt ist*. Bei der Anzucht jener Leguminosenhölzer, deren Wurzelknöllchen *Bacterium radicolica* enthalten, muß man die Luftkapazität des Bodens ganz besonders berücksichtigen.

5. *Bacillus mycoides* ist unbedingt aerob. Infolgedessen wird es in den inneren Teilen des bakterioiden Gewebes von dem *Bacterium radicolica* zurückgedrängt. Auf den Agarplatten dagegen unterdrückt es dank seines raschen Wachstums bald die Kolonien des *Bacterium radicolica*. Die mikroskopische Untersuchung des bakterioiden Gewebes sowie der Mischkulturen bestätigt diese Befunde.

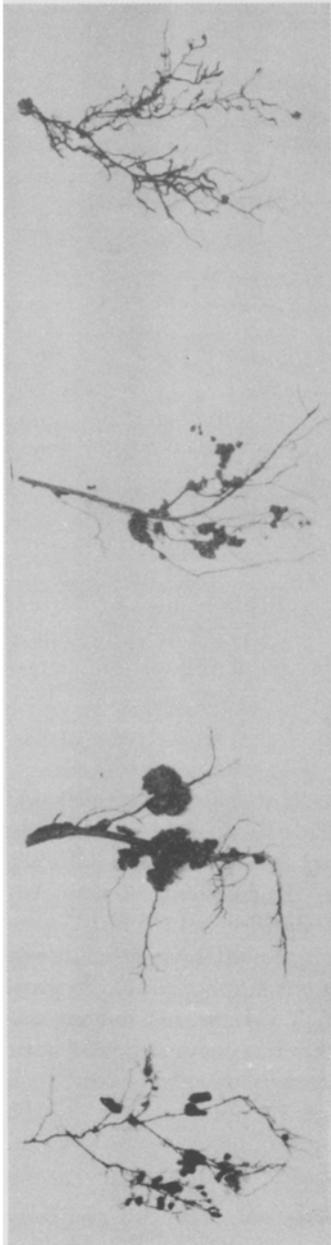
6. *Gleditschia triacanthos* besitzt Wurzelanschwellungen, die bei den älteren 1—3jährigen Wurzeln mit einem dichten, aus Wurzelhaaren gebildeten Überzug bedeckt sind. In den parenchymatischen Zellen dieser aus der primären Rinde der Wurzel entstandenen Anschwellungen konnte man bereits anatomisch das Vorhandensein des *Bacterium radicolica* nachweisen. Diese Diagnose wurde sodann mit dem kulturellen Verfahren auf bakteriologischem Wege vollauf bestätigt.

7. Die Agglutinationstiter der untersuchten Arten zeigen Tabellen 2, 3 und 4. Aus ihnen kann man auf die nahe Verwandtschaft bzw. die Identität des *Bacterium radicolica* der *Robinia pseudacacia* mit den gleichen Bakterien von *Amorpha*, *Laburnum* und *Gleditschia* schließen.

8. Nach GRAM gefärbt zeigen sich alle vier Arten gram-negativ.

Literatur.

1. Tschirch: Ber. d. dtsh. botan. Ges. 1887. — 2. Fehér: Anatomie der *Robinia pseudacacia*. III. Teil. Ung. forstl. Blätter 1922. — 3. Frank: Untersuchungen über die Wurzelsymbiose der Leguminosen 1890. — 4. Koch: Mikrobiologisches Praktikum 1922.



I. Wurzelknöllchen. I. *Robinia pseudacacia*, II. *Leburnum vulgare*, III. *Amorpha fruticosa*, IV. *Gleditsia triacanthos*.

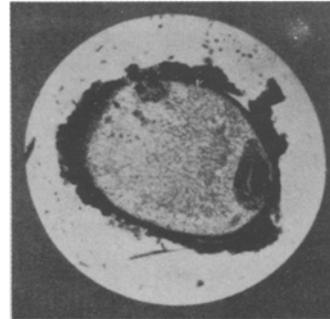


Abb. 2. Querschnitt durch ein Wurzelknöllchen von *Leburnum vulgare*.

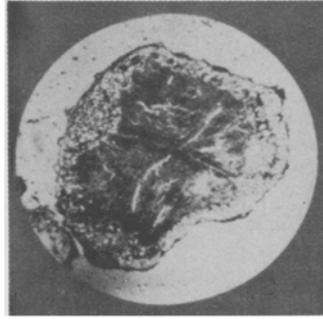


Abb. 3. Querschnitt durch ein Wurzelknöllchen von *Amorpha fruticosa*.

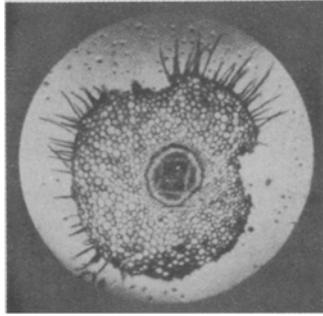


Abb. 4. Querschnitt durch eine Wurzelanschwellung von *Gleditsia triacanthos*.

Abb. 2-4 phot. mit Phoku I. Zeiss Achtr. A X. Vergrößerung etwa 100 X.