

Über einen Immunisierungsversuch mit Wurzelknöllchenbakterien bei Leguminosen

Autor(en): **Gäumann, Ernst / Jaag, Otto / Roth, Stephi**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse**

Band (Jahr): **55 (1945)**

PDF erstellt am: **16.05.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-39188>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Über einen Immunisierungsversuch mit Wurzelknöllchenbakterien bei Leguminosen.

Von Ernst Gäumann, Otto Jaag und Stephi Roth.

(Aus dem Institut für spezielle Botanik der Eidg. Technischen Hochschule
in Zürich.)

Eingegangen am 3. Juli 1945.

Die allgemein biologischen Voraussetzungen der Wurzeltumore (Wurzelknöllchen) der Leguminosen, hervorgerufen durch das *Bacterium radicicola* Beij., sind durch die Untersuchungen von Thornton, Schae de u. a. weitgehend geklärt (Gäumann, 1945); in parasitologischer und immunologischer Hinsicht bestehen dagegen noch manche Widersprüche. Diese werden sich erst beheben lassen, wenn es gelingt, eine Kulturmethode zu entwickeln, um die Versuchspflanzen in *synthetischen Nährlösungen* zur Bildung von Wurzelknöllchen zu veranlassen.

Die vorliegende Mitteilung beschreibt zunächst eine derartige Kulturmethode und hernach einen mit ihr durchgeführten Infektionsversuch.

1. Die Kulturmethode.

Anzucht. Erbsen (William Hurst, früh, niedrig) werden mit Caporit (0,4 %, 15 Minuten) desinfiziert und in steriler Erde (Autoklav, 120°, 20 Minuten) gezogen. Wenn die Pflanzen die Höhe von 8—9 cm erreicht haben, werden die Wurzeln sorgfältig von der Erde befreit und unter fließendem Wasser gereinigt. Die Exemplare mit langen Seitenwurzeln werden ausgesucht und ihre Hauptwurzeln möglichst weit oben weggeschnitten, um die spätere Teilung der Seitenwurzeln zu erleichtern.

Impfmaterial. Die Bakterien werden durch Verdünnungsreihen aus schon bestehenden Wurzelknöllchen isoliert. Züchtung auf Erbsenstrohgelatine (Dekokt von rund 50 g Erbsenstroh in 1000 ccm Leitungswasser, Rohrzucker 5 g, Gelatine 15 g). Impfung mittelst 8 Tage alter Kulturen.

Kulturflüssigkeit. Die Grundlösung ist Knop mit Zusatz von Hoagland. In dem gleich zu beschreibenden Infektionsversuch wurde der Stickstoffgehalt im einen Falle doppelt so hoch wie in der normalen Knoplösung angesetzt, im andern Falle nur $\frac{1}{100}$ so hoch. Die betreffenden Nährlösungen hatten deshalb die folgende Zusammensetzung :

Nährlösung 2n = zweifach den Stickstoffgehalt der normalen Knopflösung.

Ca(NO ₃) ₂	5 g	NH ₄ NO ₃	1.37 g
KCl	1.25 g	FeCl ₃ 1 %	2 ccm
MgSO ₄	1.25 g	Hoaglandlösung	5 ccm
KH ₂ PO ₄	1.25 g	Aq.dest.	5000 ccm

Nährlösung n/100 = ein Hundertstel des Stickstoffgehaltes der normalen Knopflösung. Der Ca-Gehalt wird durch Zugabe von CaCl₂ reguliert, der K- und Cl-Gehalt durch Zugabe von K₂HPO₄.

Ca(NO ₃) ₂	0.05 g	CaCl ₂	3.32 g
KCl	0.52 g	FeCl ₃ 1 %	2 ccm
MgSO ₄	1.25 g	Hoaglandlösung	5 ccm
K ₂ HPO ₄	1.64 g	Aq.dest.	5000 ccm

Dazu einige Tropfen H₂SO₄, bis die Trübung verschwindet (pH 4.5).

Versuchstechnik. Als Kulturgefäße werden Bechergläser (Murano) von 400 ccm Inhalt und möglichst gleicher Höhe verwendet; jedes Becherglas wird mit schwarzem Papier umwickelt, um die Algenbildung zu hemmen; aus dem gleichen Grunde und um die Verdunstung herabzusetzen und um eine Feuchtkammer zu bilden, damit die nicht in die Nährlösung herabreichenden Wurzeln nicht vertrocknen, werden die Gläser mit einem schwarzen Karton zugedeckt. Je zwei Bechergläser werden nebeneinandergestellt, und die Versuchspflanze wird rittlings auf ihren Rand gesetzt (Abb. 1, rechts), so daß die eine Hälfte der Seitenwurzeln in das eine Becherglas ragt, die andere Hälfte in das andere Becherglas.

Fünf Becherpaare bilden eine Versuchsgruppe (Abb. 1, links). Diese wird auf eine genau waagrechte Glasplatte gestellt und steht mittelst umgebogener Glasröhrchen mit den Nachfüllgefäßen (Vorratsgefäßen) in kommunizierender Verbindung, so daß sich sämtliche Bechergläser von selbst nachfüllen und stets dieselbe Flüssigkeitshöhe besitzen (Abb. 1, links). Auch die Vorratsgefäße sind in schwarzes Papier eingeschlagen und schwarz abgedeckt; sie werden täglich nachgefüllt. Da die verbrauchte Nährlösung nicht abfließen kann, wird die Nährlösung jede Woche in sämtlichen Bechergläsern erneuert.

Um den Bakterien den parasitischen Start zu erleichtern, erfolgt die Impfung der Bechergläser vorteilhafter nicht mittelst einer Bakterien-suspension in *Wasser*, sondern durch eine verdünnte *Gelatine*kultur. Zu diesem Zwecke werden die rund 5 ccm Erbsenstrohgelatinekultur mit-samt den Bakterien in 45 ccm lauem, sterilem Wasser dispergiert; in jedes Becherglas wird 1 ccm dieser Suspension gegeben, worauf die Knöllchen bei entsprechender Disposition der Wirtspflanzen reichlich an-gehen.

Mit Hilfe dieser Kulturmethode können an den Leguminosenwurzeln *unter kontrollierten äußern Bedingungen* reichlich Knöllchen erzeugt werden; es lassen sich überdies die beiden Wurzelhälften ein und des-selben Individuums unterschiedlich ernähren, so daß die Frage des

gegenseitigen Ausgleiches der aufgenommenen Nährstoffe und der Abwehrreaktionen in den beiden Wurzelhälften und in den oberirdischen Teilen der Pflanze dem Experiment zugänglich wird.

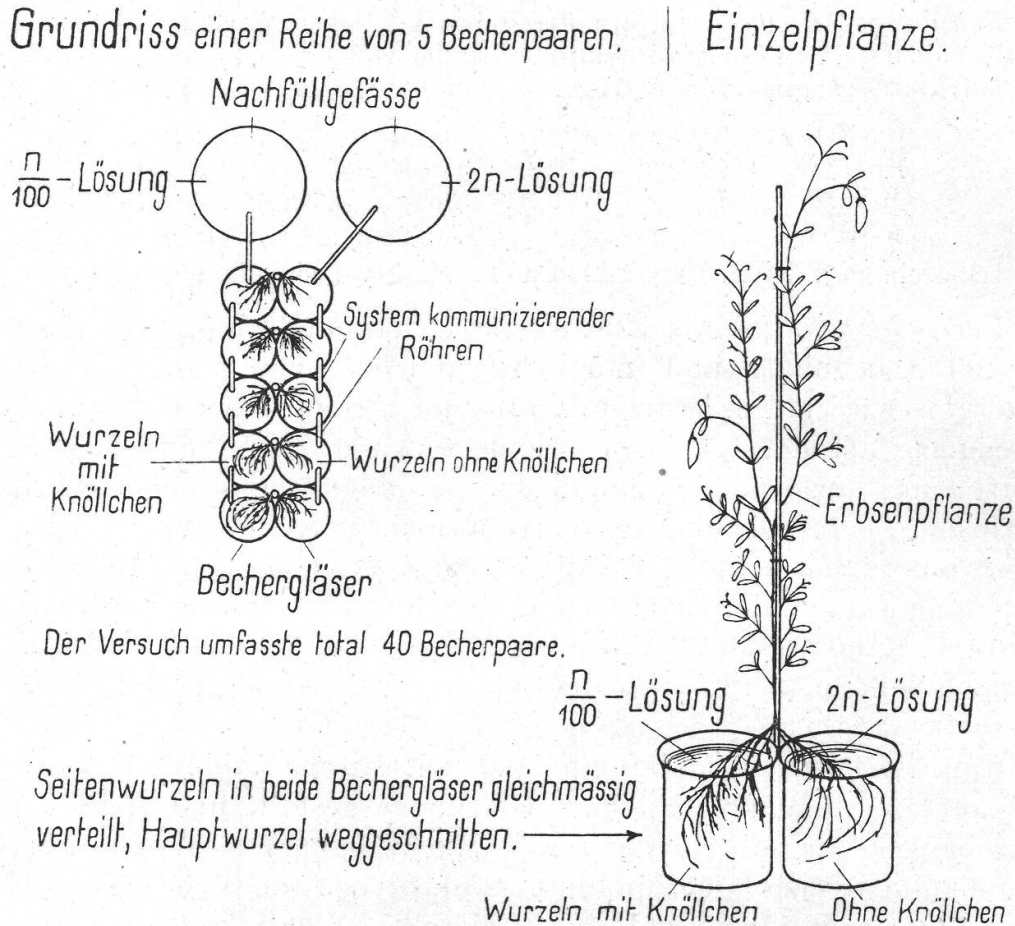


Abbildung 1.

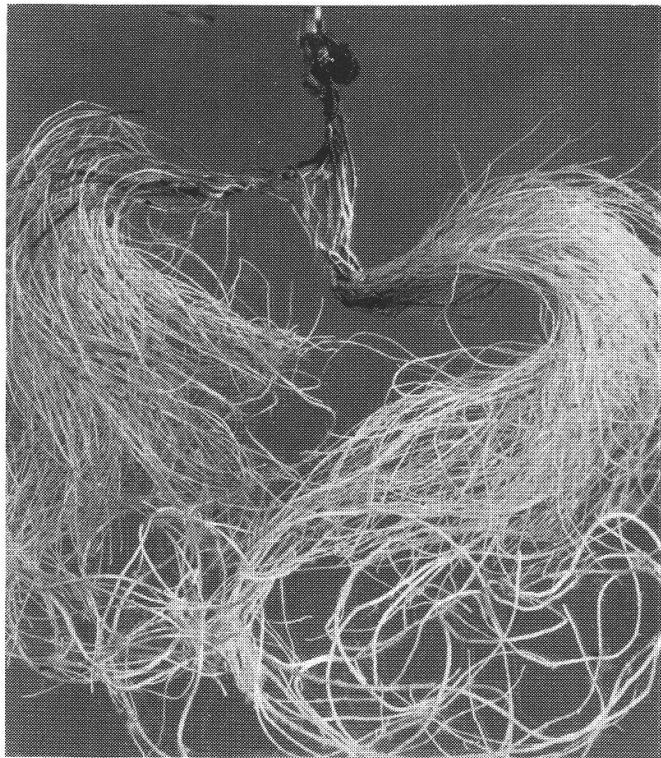
Schematische Darstellung der Versuchsanordnung. Erklärung im Text.

2. Besteht zwischen den beiden Wurzelhälften eine immunologische Beeinflussung?

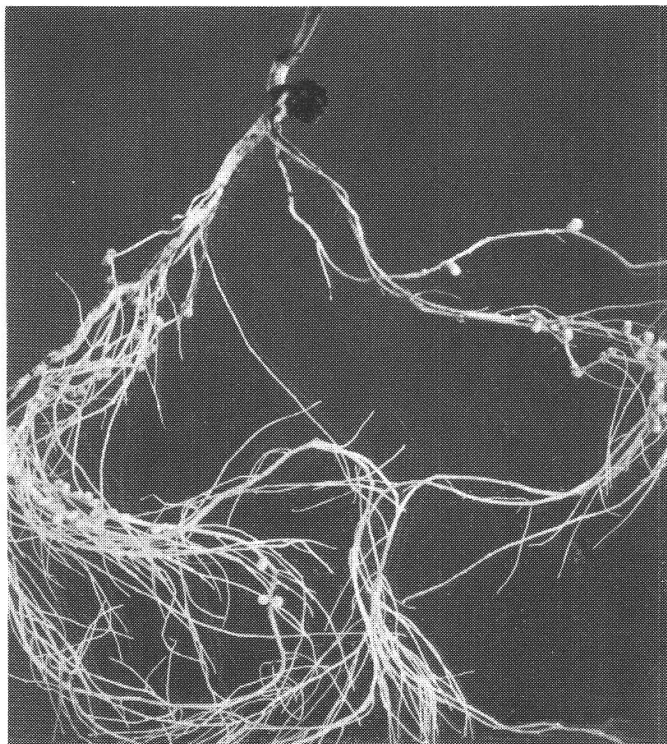
Abgesehen von der Prämunisierung durch bestimmte Viren und möglicherweise (bei gewissen Birnsorten) durch die Mistel halten sich in der pflanzlichen Infektionslehre die positiven und die negativen Angaben über eine induzierte humorale Prämunität ungefähr die Waage (G ä u m a n n, 1945).

Smith, Brown und Townsend (1911) infizierten *Chrysanthemum frutescens* L. mit einem Stamm von *Bacterium tumefaciens* E. F. S., dem Erreger des bakteriellen Pflanzenkrebses, zogen von den erkrankten Stöcken Stecklinge, infizierten diese wieder, zogen wieder Stecklinge usw. und erwirkten dadurch eine zunehmende Immunisierung

Tafel 9



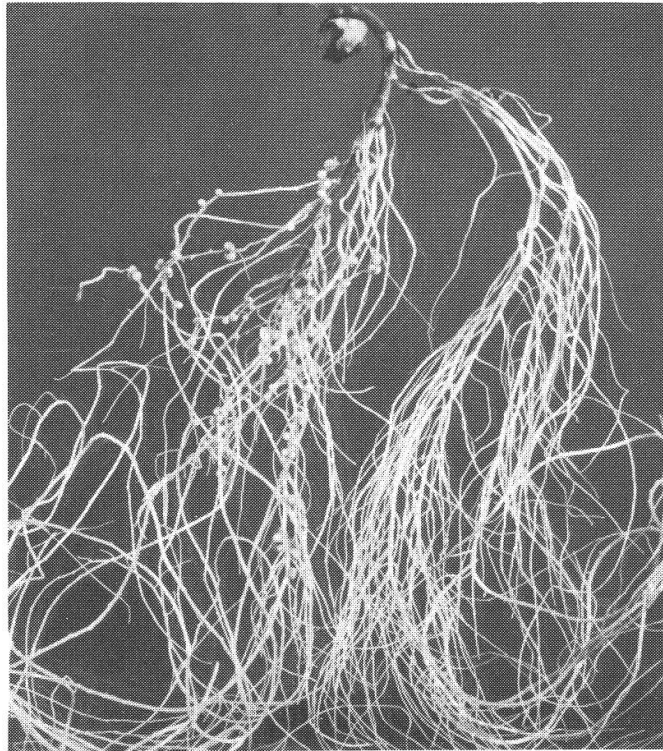
Stickstoffgabe 2n



Stickstoffgabe n/100.

Der Einfluß der Stickstoffversorgung auf die Wurzelknöllchen-
bildung bei Erbsen.

Tafel 10



Stickstoffgabe der linken Wurzelhälfte $n/100$, der rechten Wurzelhälfte $2n$.

Der Einfluß der Stickstoffversorgung auf die Wurzelknöllchenbildung bei Erbsen.

der Klone, die sich z. B. schon in der dritten Stecklingsgeneration in einem sehr langsamen Wachstum und einem geringen Ausmaß der Tumore äußerte, während dieselbe Bakterienkultur zu gleicher Zeit auf frischen (nicht vorerkrankten) Chrysanthemen innert kurzer Zeit die großen, charakteristischen Krebse hervorrief. In ähnlichem Sinne beobachteten *Arnaud* (1925), daß auf Pelargonien in eifügen Zentimetern Abstand von einem schon bestehenden Tumor keine Superinfektion gelingt und (1928), daß frische Stöcke allgemein eine etwas größere Anfälligkeit zeigen als vorerkrankte, *Duyfjes* (1935), daß schon von den jüngsten Tumoren auf Pelargonien und auf *Bryophyllum crenatum* Baker eine die Neuinfektionen (Superinfektionen) hemmende Wirkung ausgeht, welche nicht die Folge von rein vegetativen Wachstumshemmungen (z. B. durch Nährstoffkonkurrenz) sein kann, und *Magrou* (1935), daß bei Superinfektionen neue Pelargonientumore weniger leicht angehen, wobei die Pflanzen zuweilen sogar Hypersensibilitätserscheinungen zeigen.

Anderseits sind jedoch die Versuche von *Brown* (1923), bei Chrysanthemen und Rosen durch abwechselnde Krebsinfektion und nachherige vegetative Propagierung eine dauernde aktive Immunität der betreffenden Klone aufzubauen, mißlungen, wenngleich in zwei Fällen eine vorübergehende Immunisierung erreicht wurde; und *Riker* (1926) vermochte vollends zwischen den Reaktionstypen gesunder und vorerkrankter Klone keinen Unterschied zu erkennen und in den Tumoren auch keine Agglutinine, Praecipitine und Lysine nachzuweisen. Auch *Manil* (1936) erhielt auf Tabak bei Superinfektion mit *Bacterium tumefaciens* (und mit *Bacterium tabacum* Wolf et Foster), wenn die nächstuntern Blätter mit demselben Bakterium vorinfiziert waren, keinen geringeren Befall, also keinen Krankheitsschutz. Dennoch wird man die positiven Beobachtungen nicht einfach negieren dürfen; offenbar ist eine generelle oder lokale Umstimmung des Wirtes, die ihn gegen eine neue Krebsinfektion widerstandsfähiger macht, nur unter bestimmten technischen Voraussetzungen (Sorte, Alter der Triebe, Ernährungszustand usw.) möglich.

Ebenso widerspruchsvoll sind die Beobachtungen bei den uns hier interessierenden Wurzeltumoren der Leguminosen. Wenn Exemplare des Wiesenklees (*Trifolium pratense* L.) und der Erbsen (*Pisum sativum* L.) an den ältern Wurzeln bereits die Knöllchen eines bestimmten Stammes des *Bacterium radicicola* Beij. tragen und hernach neue Wurzeln bilden, so widerstehen diese der Superinfektion durch einen zweiten Stamm weit besser als vollkommen gesunde Pflanzen (*Dunham* und *Baldwin*, 1931). Die Stickstoff-Fixierung und der Ertrag einer spontan mit einer wenig leistungsfähigen Bakterienrasse vorinfizierten Leguminosenpflanzung lassen sich deshalb durch eine nachträgliche (Super-) Infektion mit

einem leistungsfähigeren Bakterienstamm nur wenig heben; umgekehrt führt die Verunreinigung einer guten Pflanzung durch einen geringwertigen Stamm nicht gleich zu einer Ertragsverminderung. In dem von L ö h n i s (1930) untersuchten Beispiel (wieder *Trifolium pratense* L.) ist dagegen die Befallsabnahme bei Wurzelknöllchen tragenden Pflanzen nur dem Stickstoff zuzuschreiben, der durch die Bakterien dem Wirt zur Verfügung gestellt wird und eben, wie künstlich zugeführter Stickstoff, die durch die partielle Unterernährung der Pflanzen bedingte Anfälligkeit aufhebt. Wenn die Wurzeln durch einen Bakterienstamm vorinfiziert wurden, der wenig Stickstoff bindet, so bewirkt dieser keine Immunität gegen Stämme, die viel Stickstoff binden.

Dem Modellversuch, den wir mit Hilfe der soeben beschriebenen Kulturmethode durchführten, lagen zwei Versuchsfragen zugrunde :

1. Ist es zutreffend, daß die Disposition der Leguminosen für den Befall durch das *Bacterium radicola* durch eine Stickstoffunterernährung geschaffen wird, wogegen reichlich mit Stickstoff versorgte Individuen frei von Tumoren bleiben ? Und
2. Vermögen sich die beiden Wurzelhälften ernährungsphysiologisch oder immunologisch gegenseitig zu beeinflussen ?

Der Versuch wurde am 1.4.45 durch Auslegen der Erbsen ins Keimbeet eingeleitet. Am 15.4. Übertragung in die Bechergläser; Impfung am 26.4. Insgesamt wurden 80 Bechergläser verwendet. Bei 5 Paaren erhielten beide Bechergläser, also beide Wurzelhälften, die doppelte Stickstoffmenge der normalen Knopflösung (Reihe 2n).

Bei 5 Paaren erhielten beide Bechergläser, also beide Wurzelhälften, $\frac{1}{100}$ der Stickstoffmenge der normalen Knopflösung (Reihe n/100).

Bei 30 Paaren erhielt das eine Becherglas, also die eine Wurzelhälfte, 2n-Lösung, das andere Becherglas, also die andere Wurzelhälfte, n/100-Lösung (Abb. 1).

Abbruch des Versuches am 5.6.45. Die Knöllchen jeder Wurzelhälfte wurden ausgezählt, weggeschnitten, 4 Stunden bei 103° getrocknet und gewogen.

Die Versuchsergebnisse waren außerordentlich schön. In der *ersten Serie* (2n), in der beide Wurzelhälften die doppelte Stickstoffmenge der normalen Knopflösung erhielten, trat *kein einziges Wurzelknöllchen* auf, obschon die Pflanzen ein üppiges Laubwerk entwickelten und reichlich blühten. In Tafel 9, Abbildung 2n, ist der Status bei einem beliebig herausgegriffenen Exemplar photographisch festgehalten worden.

In der *zweiten Serie* (n/100), in der beide Wurzelhälften $\frac{1}{100}$ der Stickstoffmenge der normalen Knopflösung erhielten, trat an *beiden Wurzelhälften* eine reichliche Knöllchenbildung ein, und zwar trug die

linke Wurzelhälfte durchschnittlich 67 Wurzelknöllchen je Pflanze, die rechte Wurzelhälfte durchschnittlich 24 (Tabelle 1); das Knöllchentrockengewicht betrug bei der linken Wurzelhälfte durchschnittlich 54 mg je Pflanze, bei der rechten Wurzelhälfte rund 28 mg. Wegen der geringen Zahl der Wiederholungen ist der mittlere Fehler sehr groß. Warum jeweils die linke Wurzelhälfte soviel stärker befallen wurde als die rechte, entzieht sich unserer Kenntnis und muß im Verlaufe der weiteren Untersuchungen noch geklärt werden. Tafel 9, Abbildung n/100, veranschaulicht den Infektionserfolg bei einem beliebig herausgegriffenen Exemplar.

Tabelle 1.

Der Einfluß der unterschiedlichen Stickstoffversorgung auf die Tumorbildung von *Bacterium radicum* Beij. auf Erbsenwurzeln (Versuchsanordnung ähnlich Abb. 1).

Versuchsreihe	Durchschnittliche Zahl der Knöllchen (Tumore)		Durchschnittliches Gewicht der Knöllchen (Tumore)	
	Linke Hälfte	Rechte Hälfte	Linke Hälfte mg	Rechte Hälfte mg
Beide Wurzelhälften mit 2n Stickstoff ernährt .	0	0	0	0
Beide Wurzelhälften mit n/100 Stickstoff ernährt	67.0 ± 24.0	23.5 ± 10.5	53.7 ± 17.6	27.7 ± 12.4
Linke Wurzelhälfte mit n/100 Stickstoff, rechte Wurzelhälfte mit 2n Stickstoff ernährt . .	50.5 ± 8.4	0	40.3 ± 7.6	0

In der dritten Serie (links n/100, rechts 2n), bei der die linke Wurzelhälfte $\frac{1}{100}$ der Stickstoffmenge der normalen Knopplösung erhielt, die rechte Wurzelhälfte die doppelte Stickstoffmenge der normalen Knopplösung, trug jeweils die linke Wurzelhälfte bei sämtlichen 30 Versuchspflanzen reichliche Wurzelknöllchen (durchschnittliche Anzahl je Pflanze 50,5, durchschnittliches Trockengewicht je Pflanze 40,3 mg), die rechte Wurzelhälfte dagegen kein einziges. Tafel 10 veranschaulicht diesen Sachverhalt bei einem willkürlich herausgegriffenen Exemplar.

Aus diesen Ergebnissen möchten wir die folgenden Schlußfolgerungen ziehen :

1. Die Disposition der Erbsenwurzeln für den Befall durch das *Bacterium radicum* wird tatsächlich durch die partielle Stickstoffunterernährung gesteuert. Unsere weiteren Untersuchungen werden diesen Zusammenhang zahlenmäßig zu klären und die Mitwirkung

der übrigen Elemente (P, K, Bor usw.) zu verfolgen suchen. Dabei wird auch der *Mechanismus der Abwehr*, warum die reichlich mit Stickstoff ernährten Pflanzen nicht befallen werden bzw. keine Tumore bilden, näher zu prüfen sein.

2. Von der reichlich mit Stickstoff ernährten Wurzelhälfte (in unserem Falle der rechten) findet *ernährungsphysiologisch* zur stickstoffunterernährten Wurzelhälfte hinüber (in unserem Falle der linken) kein wesentlicher Stickstoffausgleich statt, sondern die beiden Wurzelhälften agieren unabhängig voneinander, gleich selbständigen Individuen.
3. Von der stickstoffunterernährten Wurzelhälfte (in unserem Falle der linken) findet zur reichlich mit Stickstoff ernährten Wurzelhälfte hinüber (in unserem Falle der rechten) *immunologisch* keine Reaktionsverschiebung statt, sondern die beiden Hälften agieren wiederum unabhängig voneinander, gleich selbständigen Individuen. Es erfolgt also keine Ganzheitsreaktion des befallenen Individuums. Wie sich die Verhältnisse in den oberirdischen Teilen der Pflanze gestalten, die ja unter geeigneten Bedingungen ebenfalls durch das *Bacterium radicolica* infiziert werden können, wird durch unsere weiteren Untersuchungen zu klären sein. Desgleichen wird es vielleicht mit Hilfe unserer Methode gelingen, die immunologische Umstimmung der Gewebe *auf kurze Entfernungen hin* zu verfolgen, z. B. bei verschiedenen Verzweigungen derselben Seitenwurzel.

Résumé.

On décrit une méthode de culture en solution nutritive. Elle permet de suivre l'infection des racines de légumineuses par *Bacterium radicolica* et la formation des tumeurs.

Une expérience, qui peut servir de modèle, montre que si une nutrition riche en azote ne permet pas la formation de tumeurs, celle-ci a lieu dans un milieu pauvre en azote. Si l'on partage les racines adventives en deux groupes, une moitié recevant beaucoup d'azote et l'autre peu, on ne voit de tumeurs que chez cette dernière. Au point de vue de la physiologie nutritive, il n'y a donc pas compensation de la teneur en azote d'une des moitiés à l'autre, ni au point de vue immunologique transfert de la réaction.

Zitierte Literatur.

- Arnaudi, C., 1925. (Atti soc. Ital. sc. nat. Milano, **64**, 230—238).
— 1928. (Riv. Patol. veg., **18**, 161—168).
Brown, N. A., 1923. (Phytopath., **13**, 87—99).
Dunham, D. H. and Baldwin I. L., 1931. (Soil sc., **32**, 235—248).
Duyffjes, H. G. P., 1935. Inaug. Diss. Utrecht, 100 S.
Gäumann, E., 1945. Pflanzliche Infektionslehre. (Verlag Birkhäuser, Basel, im Druck).
Löhnis, M. P., 1930. (Cbl. Bact., II. Abt., **80**, 342—368).
Magrou, J., 1935. (C. r. Ac. sc. Paris, **201**, 986—988).
Manil, P., 1936. (Mém. Acad. R. Belgique, cl. scienc., **15**, Heft 2, 3—50).
Riker, A. J., 1926. (Journ. agr. Res., **32**, 83—96).
Smith, E. F., Brown, N. A. and Townsend, C. O., 1911. (Dept. Agric. Bur. of plant ind. Bull., **213**, 5—200).
-