

# Chemische Untersuchungen auf dem Gebiete der Phytopathologie.

Von

**Dr. Julius Stoklasa**, diplom. Agr.,

Docent an der k. k. böhm. technischen Hochschule in Prag.

(Der Redaction zugegangen am 10. Juni 1895.)

Wiewohl die Forschungen auf dem Gebiete der Pflanzenpathologie zu bedeutender Höhe gediehen sind, so vermissen wir doch vollständig noch das Studium des Chemismus der vitalen Prozesse in den pathologischen Erscheinungen des Pflanzenreiches. An mehreren Beispielen werden wir erkennen, dass durch die Einwirkung von Parasiten interessante Veränderungen in der lebenden Materie vor sich gehen, was eine Reduction in der Bildung der lebenden Moleküle im Pflanzenorganismus zur Folge hat. Meine Untersuchungen beschränke ich auf das Studium des Chemismus der Zuckerrübe, und zwar unter Einwirkung der Rübennematode (*Heterodera Schachtii*), des Pilzes *Rhizoctonia violacea* und *Cercospora beticola*.

## I.

Die verheerende Wirkung der Rübennematoden (*Heterodera Schachtii*) ist ein heute allgemein bekanntes Factum. Nicht nur ein geringerer Ertrag überhaupt, sondern auch eine verminderte Production an Saccharose in der Rübe — sind heute Erscheinungen, welche überall dort zu Tage treten, wo nur immer dieser gefährliche Parasit wüthet. Trotz umfangreicher biologischer Studien haben wir heute noch vom chemischen Standpunkte aus keine Kenntniss der pathologischen Prozesse, welche sich im Organismus der Zuckerrübe abspielen, deren Wurzeln von dem Weibchen der *Heterodera* befallen wurden.

Im Jahre 1894 fand ich in der Nähe von Swojsic auf Grundstücken des Herrn Kolařik aus Poboř ungewöhnlich stark verbreitete Nematoden an den Rübenwurzeln. Die Rübe

war klein, verkümmert und die Würzelchen enthielten eine ungeheure Menge von gut entwickelten Weibchen der Heterodera.

Die Versuchsproben wurden den Rüben am 20. September entnommen.

Von Nematoden stark heimgesuchte Exemplare, die kleinsten sämtlicher Grundstücke.

Durchschnittsgewicht einer solchen Rübe:

Blätter . . . . .	58 gr.
Wurzel . . . . .	184 »
Zuckergehalt . . . . .	8,4 %.

Durchschnittsgewicht einer gesunden, unversehrten Rübe:

Blätter . . . . .	210 gr.
Wurzel . . . . .	530 »
Zuckergehalt . . . . .	14,9 %.

Die Wurzeln von mit Nematoden behafteten Rüben enthalten (wie bereits nachgewiesen) immer weniger Saccharose als solche von normalen, gesunden Rüben. Der Grund hierfür liegt einzig und allein in der Störung der vitalen Prozesse in der Zuckerrübe. Die mit Weibchen der Heterodera bedeckten Wurzelästchen sind nicht im Stande, die ihnen zugewiesenen Functionen in der Assimilation der anorganischen Nährsubstanzen auszuüben. Es sterben nicht nur die Wurzelhaare in der ganzen Umgebung der Wurzelästchen ab, sondern die Heterodera saugt auch den Zelleninhalt der einzelnen Gewebe auf und versetzt sie so in einen Erstarrungszustand.

In erster Reihe erscheint abgeschwächt die diosmotische Thätigkeit und die Assimilation der anorganischen Nährsubstanzen.

An Orten, wo die physikalische Beschaffenheit des Bodens an und für sich nicht geeignet ist, eine stetige Feuchte zu erhalten, oder bei anhaltender Dürre und unregelmässigen Niederschlägen (wie im Jahre 1893) ist der Einfluss der Nematoden doppelt verheerend.

Die Wurzel zeigt nicht die nöthige Selbständigkeit der Energie in der eklektiven Thätigkeit, und die Wirksamkeit der Zellen, der Wurzelhaare in den endosmotischen Bewegungen wird durch die im Wasser aufgelösten Salze stark unter das

zum Verhältnisse des Lebenschemismus nothwendige Maass herabgedrückt. Das Wachsthum stockt, die Bildung von neuer lebender Materie zeigt ein blosses Vegetiren und die Chlorophyllthätigkeit in der Assimilation und Dissimilation ist eine gestörte.

Im Jahre 1893 nahm ich das Versuchsmaterial aus der Umgebung von Poboř.

Die von Nematoden heimgesuchten Zuckerrüben boten bei der damals herrschenden Dürre ein unerfreuliches Bild der Blatt- und Wurzelentwicklung.

Zur chemischen Analyse verwendete ich sowohl gesunde, normale, als auch kranke, verkümmerte Rüben:

	Gesund.	Krank.
Gewicht der Blätter . . .	363 gr.	104 gr.
» » Wurzel. . .	703 »	276 »

### Chemische Analyse der Blätter in der Trockensubstanz.

	Aus gesunder Rübe:	Aus kranker Rübe:
Stickstoff in Form von Eiweissstoffen . . . . .	1,05 %	0,53 %
» » » » Asparagin (Glutamin) . . . . .	0,29 »	0,64 »
» » » » verschiedenen Amid-Substanzen . . . . .	0,97 »	0,91 »
» im Niederschlag durch Phosphorwolframsäure <sup>1)</sup>	0,43 »	0,36 »
Lecithin <sup>2)</sup> . . . . .	1,12 »	0,52 »
Cellulose . . . . .	25,83 »	36,99 »
Saccharose . . . . .	4,07 »	1,73 »
Hexose (als Glukose berechnet) . . . . .	3,19 »	2,01 »
Oxalsäure in H <sub>2</sub> O löslich <sup>3)</sup> . . . . .	2,04 »	6,03 »
» » » unlöslich . . . . .	3,92 »	0,89 »
Reinasche . . . . .	22,14 »	10,07 »

<sup>1)</sup> Die Untersuchungen werden nach den Methoden von Ernst Schulze ausgeführt.

<sup>2)</sup> Wir verfahren bei Ausführung der quantitativen Bestimmung des Lecithins nach der modificirten Methode E. Schulze und S. Frankfurt (Landw. Vers.-Stat., XLIII, S. 207). Mindestens 10 gr. fein zerriebene Substanz wurde in eine Papierhülse gebracht und in einem Soxhlet'schen Apparat mit Aether extrahirt, sodann im Erlenmeyer'schen Kolben mit absolutem Alkohol wieder 5 bis 6 Mal beim Sieden ausgezogen. Nach der 5. oder 6. Extraction bleiben unbestimmbare Spuren von Lecithin in der Pflanzensubstanz. Daher sind die Einwände von Béla von Bittó vollständig unbegründet. (Siehe die Zeitschrift für phys. Chemie, 1894.)

<sup>3)</sup> Die Bestimmung der Oxalsäure geschah derart, dass die zer kleinerten Rüben oder die Blattsubstanz 4 bis 6 Mal mit heissem Wasser

### Chemische Zusammensetzung der Asche von Zuckerrübenblättern.

	Aus gesunden Rüben:	Aus kranken Rüben:
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> . . . . .	8,05 %	8,17 %
SiO <sub>2</sub> . . . . .	17,31 »	16,03 »
SO <sub>3</sub> . . . . .	9,14 »	10,60 »
K <sub>2</sub> O . . . . .	17,71 »	13,04 »
Na <sub>2</sub> O . . . . .	10,15 »	15,05 »
MgO . . . . .	9,27 »	10,98 »
CaO . . . . .	23,16 »	19,92 »
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> . . . . .	4,03 »	4,37 »

Wir sehen deutlich, dass in der procentualen Zusammensetzung der Asche kein besonderer Unterschied besteht, dass aber die Differenzen in dem auf reine Asche in der Trockensubstanz der Blätter umgerechneten Quantum hervortreten.

In den Blättern von gesunder, normaler Zuckerrübe fand man an reiner Asche 22,14%, während die Blätter von kranken Zuckerrüben 10,07% aufwiesen; somit eine Differenz von 12%!

Es enthielten somit die Blätter von gesunder Rübe: CaO = 5,07%.

» » » » » » kranker » » = 2,00 »

Wegen Mangels an CaO in den Blättern wurde die Oxalsäure, welche in einem so enormen Quantum in löslichem Zustande — beinahe 7% — auftrat, nicht in den unlöslichen Zustand überführt.

Die Form der löslichen Oxalsäure ist, wie wir später sehen werden, sicherlich ein gewichtiger Grund für den gestörten physiologischen Process im Mesophyll.

Schreiten wir nun zu der Wurzelanalyse:

#### Chemische Analyse der Wurzel in der Trockensubstanz.

	Unversehrt:	Mit Nematoden:
Stickstoff in Form von Eiweissstoffen . . . . .	0,68 %	0,42 %
» » » » Asparagin (Glutamin) . . . . .	0,29 »	0,44 »
» » » » verschiedenen Amidsubstanzen . . . . .	0,38 »	0,12 »
» im Niederschlage von Phosphorwolframsäure . . . . .	0,19 »	0,35 »
Saccharose . . . . .	71,84 »	53,67 »
Lecithin . . . . .	0,43 »	0,32 »
Oxalsäure in H <sub>2</sub> O löslich . . . . .	0,07 »	0,11 »
» » » unlöslich . . . . .	0,04 »	0,09 »
Reinasche . . . . .	5,04 »	3,02 »

extrahirt wurde. Die vereinigten Filtrate wurden mit NH<sub>3</sub> und CaCl<sub>2</sub> versetzt und der gefällte oxalsaure Kalk durch wiederholte Fällung aus

### Zusammensetzung der Reinasche der Wurzeln.

	Unversehrt :	Mit Nematoden :
$P_2O_5$ . . . . .	15,04 %	14,86 %
$SiO_2$ . . . . .	2,03 »	2,16 »
$SO_3$ . . . . .	12,00 »	13,02 »
$K_2O$ . . . . .	40,91 »	30,13 »
$Na_2O$ . . . . .	13,33 »	22,74 »
$MgO$ . . . . .	7,95 »	7,26 »
$CaO$ . . . . .	7,96 »	6,03 »
$Fe_2O_3$ . . . . .	1,14 »	1,51 »

In der Asche der Wurzel bemerken wir eine interessante Erscheinung — Kaliumoxyd ist in der kranken Rübe durch Natriumoxyd vertreten. Angesichts des Aschenquantums in gesunden und kranken Rübenwurzeln erscheint mir die Thatsache bestätigt, dass die Wurzel nicht die nöthige Energie besass zur Assimilation anorganischer Nährsubstanzen — insbesondere von Kaliumoxyd ( $K_2O$ ), welches im Boden hauptsächlich in Form von Silicaten vorhanden war<sup>1)</sup>.

Die organische Analyse der Wurzel brachte die Zusammensetzung der Blätter in das Stadium leicht begreiflicher Reactionen.

Die Bildung von Zucker aus der Stärke ist in kranken Rüben eine sehr niedrige im Vergleiche zu den normalen. Der Grund hiefür ist thatsächlich nur in der verheerenden Wirkung der löslichen Oxalsäure resp. Oxalate im Mesophyll zu suchen. Die Synthese der Kohlenhydrate und die Bildung von Saccharose geschieht im Mesophyll-Gewebe, und zwar entfallen nach den Untersuchungen des Referenten<sup>2)</sup> auf ein

essigsaurer Lösung unter Zugabe von Borsäure rein erhalten. Behufs Bestimmung der in Wasser unlöslichen Verbindungen der Oxalsäure wurde in gleicher Weise verfahren, jedoch mit einer verdünnten Lösung von Salzsäure extrahirt. Nähere Daten sind enthalten in meinem Vortrage: « Beiträge zur Kenntniss der chemischen Vorgänge in der Pflanze » (Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte in Wien, 1894.)

<sup>1)</sup> Es muss bemerkt werden, dass das Feld öfters mit Chilisalpeter gedüngt worden ist, worin die löslichere Form der Natriumverbindungen und die Substitution von  $Na_2O$  für  $K_2O$  in der Asche der Blätter und der Wurzel ihre Erklärung findet.

<sup>2)</sup> Analoge Versuche vollführte auch Girard schon im Jahre 1885 (siehe Comptes rendus 1886).

Gewicht von 400 gr. Blättern, somit 128 gr. reiner Blattsubstanz in 30 Tagen aus der Einwirkung der Radiation der Sonne 31 gr. Saccharose, welche durch die Blattrippen in die Wurzel herabgeleitet wird.

Ein analoges Quantum von Saccharose entfällt auf den Dissimilationsprocess. Es entwickeln sich in 90 Tagen 93 gr. Saccharose oder bei einem Knollengewichte von 700 gr. 13,3% Saccharose in der Wurzel der Zuckerrübe.

Fassen wir nun eine kranke Rübe in's Auge! Welch' eine lange Kette von Processen verlief in der lebenden Materie während der Assimilation und Dissimilation?

Die Blätter enthielten in der Trockensubstanz :

	Saccharose.	Hexose (als Glukose berechnet).
Bei gesunden Rüben . . .	4,07 %	3,19 %
» kranken » . . .	1,73 »	2,01 »

In den Hauptwurzeln fand man in der Trockensubstanz :

Bei gesunden Rüben . . .	71,84 %	Saccharose.
» kranken » . . .	53,67 »	»

Allein nicht nur ein Niedergang in der Saccharose-Bildung, sondern auch in der Gesamtproduction der organischen Substanz ist bemerkbar. Die Organe der Chlorophyll-Thätigkeit bleiben unentwickelt, obwohl man doch bei kränklichen Rüben nur 104 gr. Blätter und davon 23 gr. reiner Blattsubstanz gefunden hat.

Die Selbstthätigkeit des lebenden Protoplasmas war somit in den Aeusserungen von physikalischer und chemischer Energie vollständig ermattet. Der verderbliche Einfluss der löslichen Oxalate wird nicht nur im Zellkern, sondern auch in den Chlorophyllkörnern zu Tage treten. Schon eine 1 procentige Lösung von Kalium-Oxalat tödtet die grünen Zellen im Laufe von 30 Minuten vollständig. Das Cytoplasma unterliegt, wie es scheint, den Oxalaten direct nicht, wird jedoch durch das Absterben des Zellkerns und der Chlorophyllkörner (ädirt<sup>1)</sup>). Mikroskopische Beobachtungen zeigten auch, dass die Palisad-

<sup>1)</sup> H. Molisch, Botan. Zeitg. 1889. A. F. W. Schimper, Flora, 1890. C. Loew, Flora 1892.

zellen das Mesophyll bei Blättern von kränklichen Rüben eine geringere Menge von Chlorophyllkörnern aufweisen, als bei Blättern von normalen Rüben.

Ebenso war eine auch unvollkommene Entwicklung der Leukoplasten in den Blättern von kränklichen Rüben zu erkennen.

Die Oxalsäure ist eine besonders für die Zuckerrübe charakteristische organische Säure.

Schon von der ersten Entwicklung an, sowie das zarte Pflänzchen mittelst seiner ersten Blätter zu assimilieren beginnt, bildet sich — besonders bei Vorhandensein von Nitraten — ein bedeutendes Quantum von Oxalsäure.

So enthält die junge Pflanze bei einem Gewichte (pro Stück) von 0,183 gr. in der Trockensubstanz 2,4% löslicher und 0,2% unlöslicher Oxalsäure (aus Sandculturen bei Abgang von Kalk), bei Vorhandensein von Nitraten steigt dieses Quantum auf 3,6%. Der reine Samen ohne Samenschale enthält sozusagen gar keinen Kalk — ebensowenig auch die zarte junge Pflanze. Das Vorhandensein derselben ist daher sehr nothwendig, damit die verderbliche Wirkung des circulirenden Kaliumoxalats bei Zeiten eingedämmt werde.

Die Oxalsäure erscheint als Nebenproduct bei der Entstehung von Nuclein, Plastin, Lecithin (somit hauptsächlich bei der Assimilation von Phosphorsäure), ferner von Eiweissstoffen und Amiden (Einwirkung der Glukose auf Salpetersäure).

Wie es scheint, wird sich daher die Oxalsäure an Kalium-, Natrium- und Magnesiumoxyd binden und erst durch die Wirkung der aufgelösten Verbindungen von Calciumoxyd lagert sich in dem Gewebe niedergeschlagen Calciumoxalat ab.

Ob die löslichen Oxalate auf die Enzyme, welche Verzuckerung von Stärke befördern, verderblich wirken, ist nicht erwiesen, es ist dies wahrscheinlich jedoch der Fall. Ueberhaupt kann die Metamorphose der Kohlenhydrate ohne genügendes Vorhandensein von Kalk nicht in dem Tempo vor sich gehen, wie es die vitalen Prozesse in der Pflanze erheischen würden.

Die bedeutende Menge von löslicher Oxalsäure in den Blättern, und zwar 6% in kränklichen gegenüber 2% in gesunden Rüben, bestärkt uns ziemlich in den ausgesprochenen Hypothesen.

Hier begreifen wir auch den wohlthätigen Einfluss des Kalkes im Boden auf die Entwicklung einer von Nematoden heimgesuchten Rübe. Der Kalk vernichtet nicht nur die Nematoden, sondern er ist auch von wesentlichem Vortheil bei der Paralyisirung der schädlichen Wirkung der löslichen Oxalate. Thatsache ist, dass Zuckerrüben in Böden, welche reich an Kalk neben anderen Nährsubstanzen (namentlich  $K_2O$ ,  $P_2O_5$  und N) sind, nie so stark von Nematoden zu leiden haben, wie jene in kalkarmen Böden. Insbesondere aber tritt der Saccharosegehalt in den Vordergrund, welcher mit geringen Ausnahmen immer nur zwischen gesunden und kränklichen Wurzeln constatirt wird.

Wenn wir ferner erwägen, dass die Synthese der Kohlenhydrate und Eiweissstoffe bei Vorhandensein von Kalium- und Magnesiumoxyd, die Bildung von Nuclein, Plastin und Lecithin unter Einwirkung von Phosphorsäure erfolgt, so gelangen wir zu der Erkenntniss, dass ein Mangel dieser Nährstoffe in den Blättern eine Störung in der Assimilation der grünen Mesophyll-Zellen offenbaren müsste. Stickstoffhaltige Substanzen und andere documentiren sehr deutlich abnormale Vitalprocesse in der kranken Pflanze. Der Eiweissstoff in den Blättern nimmt ab, es sammelt sich Asparagin (oder Glutamin) an; daher ein analoger Process, wie er eintritt, wenn die Pflanze verdunkelt ist, ohne jede Assimilations-Thätigkeit. Dieser Process geht freilich in bescheidenem Maasse vor sich, nichtsdestoweniger documentirt er eine Zersetzung der Eiweissstoffe und eine Anreicherung von Amidin in den Blättern.

Hieraus ersehen wir, dass der Lebensprocess in der Bildung der lebenden Moleküle stockt — es tritt eine gewisse partielle Oxydation des circulirenden Eiweissstoffes des Pflanzenprotoplasmas ein.