Gedruckt mit Unterstützung aus dem Jerome und Margaret Stonborough-Fonds

Zur Frage der Symbiose von Anabaena mit Azolla

II. Mitteilung

Von

Alfred Limberger

Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität in Wien

Nr. 222 der zweiten Folge

(Vorgelegt in der Sitzung am 15. Jänner 1925)

Im Winter 1920/21 war es gelungen, eine größere Menge von *Azolla* durch Kultur auf wenig feuchter Erde im Kalthause bei verhältnismäßig schlechter Beleuchtung von *Anabaena* zu befreien und weiter zu kultivieren.[1]

Der freischwimmende Wasserfarn *Azolla* enthält, wie bereits Straßburger[2] nachwies, in Blatthöhlen perlschnurartige Fäden der Nostocacee *Anabaena*. Sie schlingen sich um in die in die Hohlräume heineinragenden sogenannten Keulenhaare, aus einer Stiel- und einer etwas keulig verdickten Endzelle bestehende Trichome des Farnes. Das Zusammenleben wurde stets für ein sehr inniges gehalten, da die Blaualge in keiner der vier, in verschiedenen Erdteilen vorkommenden *Azolla*-Arten fehlt.

Es wurden damals einige Fragen aufgeworfen, die zum Teil nur durch längere Kulturdauer von anabaenafreier *Azolla* eine Beantwortung finden konnten.

Zunächst war zu ermitteln, ob die anabaenafreien Pflanzen auch über mehrere Vegetationsperioden zu wachsen imstande seien, jedenfalls eine wichtige Frage zur Beurteilung des Grades der Abhängigkeit des Farnes von der Blaualge.

Es gelang nun tatsächlich, die freien Azollen bis zur Gegenwart lebend zu erhalten. Nach einem Rückgang im Winter erfolgte in der günstigen Jahreszeit jedesmal wieder starke Vermehrung und gutes Wachstum, so daß die anabaenafreien von daneben kultivierten »normalen« Exemplaren im Aussehen kaum zu unterscheiden waren.

Daraus kann wohl geschlossen werden, daß *Azolla* von der Alge unter den gewöhnlichen Kulturbedingungen nicht unbedingt abhängig ist.

Außer den zuerst behandelten Azollen wurden in den folgenden Wintern auch andere Proben, unter anderen auch Azollen, die mir durch die liebenswürdige Vermittlung von Herrn Prof. Sands

---

[1] Siehe A. Limberger, Zur Frage der Symbiose von *Anabaena* mit *Azolla*. (Vorläufige Mitteilung.) Akad. Anz. Nr. 17, Math.-Naturw. Kl., Sitzg. v. 7. Juli 1921 und ders.: Neue Ergebnisse der Symbiose-Forschung. Sitzber. d. zoolog.-bot. Ges., Wien, Sekt. f. Bot., 28. Oktober 1921.

[2] Straßburger, Über *Azolla*, Jena, 1873.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

aus New-York gesendet wurden, algenfrei erhalten. Stets wurde wie das erstemal gegen Ende des Winters ein Schrumpfen einzelner Zellen in den *Anabaena*-Fäden bemerkt, das sich gleichzeitig mit einem mißfarbigen Blaugrün- und schließlichen Farbloswerden bald auf alle Blaualgenfäden ausgedehnt hatte, worauf nach kurzer Zeit von diesen in keiner Blatthöhle der betreffenden *Azolla*-Probe mehr etwas zu finden war.

Es ist in unseren Glashäusern oft nicht leicht, Azollen gesund und ohne zu starke Verluste über den Winter zu bringen. Gewöhnlich entfernt man im Spätherbste das Wasser aus dem Behälter, so daß die Farne nicht schwimmen, sondern auf dem aus Erde oder Schlamm bestehenden Grunde aufsitzen. Durch Kultur der Azollen in geschlossenen Petrischalen, schwimmend auf lichtbraunem Dekokt von zwei Dritteln Moorerde und einem Drittel Gartenerde, gelang es aber, die Pflänzchen in sehr gutem Zustande bis zum Frühjahre zu erhalten. Die so gehaltenen Azollen behielten auch die Anabaenen.

Versuche, die freien Azollen wieder mit den Anabaenen zu vereinigen, gelangen bis jetzt nicht. Merkwürdigerweise traten aber in den Schalen, die anabaenafreie Azollen enthielten, wiederholt reichlich Oscillarien auf. Sie umwuchsen die Farne so dicht und innig, daß diese nur sehr schwer und mühsam von ihnen wieder gereinigt werden konnten. Ein Eindringen der Oscillarien (sie wurden als *Oscillaria sancta* bestimmt) in die Blatthöhlen war allerdings nirgends zu beobachten.

Parallelkulturen mit »normalen« Azollen zeigten niemals diese Erscheinung. Der Gedanke, zu ihrer Erklärung eine chemotaktische Anlockung der Blaualgen durch die Azollen anzunehmen, liegt ziemlich nahe.

Eine weitere Frage, deren Beantwortung erst nach längerer Zeit möglich sein konnte, war, ob etwa so wie bei Miehe's[1] bakterienfreier *Ardisia* auch bei den Azollen als Folge der Trennung der Lebensgemeinschaft vielleicht stärker auffallende Abweichungen vom normalen Bau und der gewöhnlichen Wuchsform des Farnes auftreten würden. Im Falle einer sehr engen Eingliederung der Blaualge in den Organismus des Farnes und einer weitgehenden physiologischen Wechselbeziehung der beiden Pflanzen war ja derartiges als Folge eines gestörten Gleichgewichtszustandes nicht unwahrscheinlich.

Es schienen auch schon nach wenigen Monaten anabaenafreier Kultur einige solcher Abnormitäten sich zu entwickeln. Abgesehen von einer starken Anhäufung von Stärke in den freien Azollen, auch bei den anderen in den folgenden Jahren erzielten freien Farnen im Frühjahre beobachtet, traten Vergrünungen der Keulenhaare, namentlich der Stielzellen, und merkwürdige Krüppelformen dieser Trichome auf. Es waren Keulenhaare zu sehen mit

---

[1] Miehe A., Weitere Untersuchungen über die Bakteriensymbiose bei *Ardisia crispa*, II. Die Pflanzen ohne Bakterien. Pringsh. Jahrb. 1917, p. 29.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

zwei hintereinander oder drei und auch vier nebeneinander liegenden Endzellen, ferner mit stark verkürzter blasiger, fast kugeliger Stiel- und Endzelle. Letztere fehlte manchmal auch überhaupt. Doch gingen die erwähnten Abweichungen nach längerer Kulturdauer eher wieder zurück, gewissermaßen nur Störungen der ersten Zeit nach der Trennung der Lebensgemeinschaft.

Die Endzelle der Keulenhaare enthielt bei den anabaenafreien Azollen sehr häufig eine stark lichtbrechende Masse, die in älteren Trichomen ziemlich fest, oft sogar von Rissen und Sprüngen durchsetzt erscheint. Millon'sches Reagens färbte schwarzrot. Jodjodkalium bewirkte oft einen Zerfall des homogenen Inhaltes in größere scharf gegeneinander abgegrenzte Kügelchen. Kalilauge verursachte ein sofortiges Verschwinden des Inhaltes, der aus einer eiweißartigen Grundsubstanz bestehen dürfte.

Es macht den Eindruck, daß bei den algenfreien Farnen in den Keulenhaaren ein Stoff in größerer Menge angehäuft, sozusagen gestaut wird, der sonst an die Blaualgen abgegeben wird, die ja normalerweise die Trichome der Blatthöhlen enge umschlingen.

Die starke Permeabilität der Membranen der Endzellen war bei den freien Azollen im Vergleich mit den normalen Azollen auch nach längerer Zeit unverändert erhalten geblieben. Durch zahlreiche Messungen wurde festgestellt, daß die Keulenhaare in bereits länger als ein Jahr anabaenafrei kultivierten Azollen gegenüber den in blaualgenhaltigen Farnen eine nicht unbeträchtliche Verlängerung aufweisen. Bei den ersteren wurden z. B. als Durchschnittslängen bei 30 Messungen 146 μ, bei den normalen ebenso bloß 92 μ gefunden, was einen Längenunterschied von fast 59% bedeutet. Dabei verteilt sich die Verlängerung ziemlich gleichmäßig auf Stiel und Endzelle.

Die Verschiedenheiten im Baue zwischen normaler und freier Azolla sind also, wie aus dem Vorangehenden erhellt, wenn auch teilweise vorhanden, sicher nicht besonders bedeutend und wesentlich zu nennen und namentlich äußerlich ist, wie ja bereits erwähnt, im Gegensatz zu Miehe's *Ardisia*, kaum ein Unterschied zu bemerken.

Wie in allen anderen Fällen des auffallenden Zusammenlebens zweier verschiedener Organismen ohne nachweisbare gegenseitige oder einseitige Schädigung derselben stand auch im Falle *Azolla-Anabaena* seit seiner Entdeckung die Frage nach dem Sinne dieses Zusammenlebens zur Untersuchung.

Die Lebensgemeinschaft wurde von Anfang an als eine sehr innige Symbiose gedeutet, wobei die Blaualge durch Assimilation des atmosphärischen Stickstoffes und wenigstens teilweise Aufnahme der so gebildeten N-haltigen Produkte durch die Keulenhaare des Farnes diesem von großem Nutzen sei, während die Blaualge durch Gewährung einer günstigen Behausung in den Blatthöhlen und auch vielleicht durch Überlassung von Kohlehydraten von Seite des Farnes den Gegenwert erhielte.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Die Hypothese der Assimilation des Luftstickstoffes durch *Azolla*, beziehungsweise durch *Anabaena*, wurde von Adolf Oes[1] vertreten und experimentell zu begründen versucht.

Er kultivierte normale *Azolla* auf N-freien Nährlösungen und fand tatsächlich, daß sich der Farn dabei bei günstigem Wachstum ziemlich reichlich vermehrte. Den Eiweißreichtum der Keulenhaare zog er ebenfalls als Stütze für seine Annahme heran. Sie sollten eben die Übernahmsstellen für die von der Blaualge gebildeten Eiweißverbindungen sein.

Eigene Untersuchungen zeigten allerdings, daß schon längere Zeit völlig anabaenafreie Azollen mit denselben Reagentien, wie sie Oes anwendete, in den Keulenhaaren dieselben Reaktionen in der gleichen Stärke wie blaualgenhaltige gaben. Das schien gegen die oben angeführte Ansicht von Oes zu sprechen.

Daher wurde die Möglichkeit, mit anabaenafreien Azollen zu arbeiten und so das Gegenexperiment zu machen, als erwünschte Frucht der gelungenen Kultur von algenfreien Farnen, zur weiteren Klärung der Frage herangezogen. Es wurden so wie bei den Untersuchungen von Oes der Individuenzahl oder dem Frischgewicht nach gemessene Mengen von *Azolla* in Parallelkulturen in größeren Erlenmayerkolben aufgestellt. Und zwar:

1. normale *Azolla* } *a)* auf Knop'scher Nährlösung
2. algenfreie *Azolla* } *b)* auf N-freier Nährlösung nach Oes.[2]

Solche Versuche wurden in den Jahren 1921 bis 1924 wiederholt aufgestellt. Im folgenden sei das Protokoll eines Experimentes mitgeteilt:

Versuchsdauer: 4. Mai 1922 bis 29. Juli 1922.

Azolla ohne *Anabaena* N-freie Nährlösung	Fast keine Vermehrung, abgestorben
Azolla ohne *Anabaena* Knop'sche Nährlösung	Mäßige Vermehrung, stark veralgt
Azolla mit *Anabaena* N-freie Nährlösung	Gute Vermehrung, keine Algen
Azolla mit *Anabaena* Knop'sche Nährlösung	Gute Vermehrung, wenig veralgt

[1] Adolf Oes, Über die Assimilation des freien Stickstoffs durch *Azolla*. Zeitschrift f. Bot., 1913, p. 145.

[2] $\left.\begin{array}{l} 0{\cdot}25\,g\ MgSO_4 \\ 0{\cdot}62\,g\ CaCl_2 \\ 0{\cdot}25\,g\ KH_2PO_4 \\ 0{\cdot}12\,g\ KCl. \end{array}\right\}$ + 2 Tropfen offiz. Fe_2Cl_6-Lösung

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Bei einem Versuche, der von Oktober 1923 bis Jänner 1924, also in einer für das Wachstum der Azolla sehr ungünstigen Zeit lief, war das Verhältnis der Frischgewichte der Pflänzchen am Beginne und am Ende des Versuches:

Azolla ohne *Anabaena*, N-freie Nährlösung	1·6
Azolla mit *Anabaena*, N-freie Nährlösung	3·4
Azolla ohne *Anabaena*, Knop'sche Nährlösung	2·9
Azolla mit *Anabaena*, Knop'sche Nährlösung	1·6

Das letztere Kölbchen war leider stark veralgt und das Überwuchern der Algen jedenfalls an der schlechten Vermehrung der Farne schuld. Übereinstimmend in den beiden angeführten und ebenso in den übrigen Versuchen ließ sich das gute Wachstum anabaenahaltiger Azollen in N-freier Nährlösung im Gegensatz zu der kaum nennenswerten Vermehrung anabaenafreier Azollen in der gleichen Nährlösung feststellen.

Es scheint also tatsächlich der Besitz der Blaualge bei geringem oder fehlendem Stickstoffgehalt des Nährsubstrates eine Lebensnotwendigkeit für den Farn zu sein, um eben mit ihrer Hilfe zu dem nötigen Stickstoff zu gelangen. Dagegen ist beim Vorhandensein genügender Mengen gebundenen Stickstoffes ein Nährmedium, wie die jahrelange Kultur völlig blaualgenfreier Azollen auf solchen deutlich zeigt, die Lebensgemeinschaft mindestens für den Farn nicht unbedingt erforderlich.

Vielleicht wäre eine solche Lebensgemeinschaft zur näheren Kennzeichnung der physiologischen Wechselbeziehung der beiden Organismen eine »bedingte« Symbiose, wenigstens vom Standpunkte des Farnes aus, zu nennen.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften mathematisch-naturwissenschaftliche Klasse

Jahr/Year: 1925

Band/Volume: 134

Autor(en)/Author(s): Limberger Alfred

Artikel/Article: Zur Frage der Symbiose von Anabaena mit Azolla 1-5