

## Zur Chemie der höheren Pilze.

IX. Mitteilung: Über die durch *Exobasidium Vaccinii* Woron. auf *Rhododendron ferrugineum* L. erzeugten Gallen

von

Dr. Julius Zellner.

(Vorgelegt in der Sitzung am 24. Oktober 1912.)

Die vorliegende Arbeit enthält die Resultate, welche die vor längerer Zeit<sup>1</sup> begonnene chemische Untersuchung der durch *Exobasidium Vaccinii*<sup>2</sup> hervorgerufenen Pilzgallen geliefert hat. Die allgemeinen Gesichtspunkte, von welchen aus diese Arbeit unternommen wurde, habe ich bereits früher<sup>3</sup> dargelegt.

Die durch den genannten Pilz erzeugten Gallen bilden stecknadelkopf- bis wallnußgroße, grünliche oder gelbliche, oft rötlich angelaufene, apfelartig aussehende Gebilde, welche mit relativ kleiner Basis auf den im übrigen unveränderten Blättern aufsitzen. Das Material war zum größten Teil in den Niederen Tauern (Seeweg- und Ursprungtal), zum Teil in den Hohen Tauern (Naßfeld) im Sommer 1910 gesammelt worden. Die Gallen wurden sorgfältig von den anhaftenden Blattresten befreit, zerschnitten und an der Luft getrocknet; sie sind ungemein wasserreich. Die Menge des lufttrockenen Materials (mit 11·2% Wassergehalt) betrug 740 g; von normalen Alpenrosenblättern, welche von denselben Sträuchern wie die Gallen

<sup>1</sup> Monatshefte für Chemie, 1910, p. 465.

<sup>2</sup> Vgl. Woronin, Verhandl. der naturforschenden Gesellschaft zu Freiburg, 4. Bd., 4. Heft. *Exobasidium Rhododendri* Fckl. ist keine eigene Art.

<sup>3</sup> Beihefte zum botan. Zentralbl., Bd. 28, Abt. I, p. 473 (1912).

stammten, standen mir 500 g (lufttrocken, mit 8·4% Wassergehalt) zur Verfügung. Da an der Gallenbildung beide Organismen beteiligt sind, mußten neben den Gallen auch die Alpenrosenblätter untersucht werden. Über die Zusammensetzung der letzteren liegt eine ältere Arbeit von Rochleder und Schwarz<sup>1</sup> vor.

Diese Autoren fanden im alkoholischen Auszug Wachs, Harz, Fett (nicht näher untersucht), Chlorophyll, ferner eine Gerbsäure, Rhodotannsäure genannt, von der Formel  $C_{50}H_{54}O_{31}$ , welche beim Erhitzen mit Säuren einen rotgelben Niederschlag, das Rhodoxanthin  $C_{28}H_{34}O_{15}$ , liefert. Weiter erhielten sie ein mit Wasserdämpfen flüchtiges Öl und flüchtige Fettsäuren, endlich Zitronensäure und geringe Mengen von Ericolin. Meine Untersuchung bestätigt und erweitert die Resultate Rochleder's.

Der Petrolätherauszug der Galle bildet ein grün gefärbtes, dickflüssiges Öl ohne Geruch mit einer krystallinischen Ausscheidung. Die Säurezahl des Öles beträgt 93·4, die Verseifungszahl 165·1, das Unverseifbare 12·5%. Der unverseifbare Anteil ist rotgelb, ziemlich fest und liefert, in heißem Alkohol gelöst, beim Erkalten eine krystallisierende Substanz, welche weiterhin aus Essigester umkrystallisiert wird. Aus verdünnter Lösung erhält man bei langsamem Eindunsten schöne Nadeln. Der Körper sintert bei 118° und schmilzt bei 129 bis 130°. 0·1649 g, in 10  $cm^3$  Chloroform gelöst, drehen im 1  $dm$  Rohr bei 18° C. die Ebene des polarisierten Lichtes um 1·4° Ventzke nach links, daher  $[\alpha] = -29·4°$ . Außer diesem Körper ist noch ein zweiter Alkohol vorhanden, der sich aus der Seifenlösung des Rohfettes nicht extrahieren läßt. Er scheidet sich vielmehr, aus der wässrigen Seifenlösung nach längerem Stehen flockig ab, wird durch Filtrieren und Umkrystallisieren aus viel heißem Alkohol gereinigt. Der Stoff ist in Alkohol und Äther schwer löslich, auch in Chloroform viel schwerer löslich wie der erstgenannte Körper. Er färbt sich über 200° dunkler und schmilzt erst über 280° unter Zersetzung. Seine Menge ist gering. Er gibt die Liebermann'sche Reaktion so wie der ersterwähnte Stoff, unterscheidet sich aber

<sup>1</sup> Sitzungsberichte der Kaiserl. Akademie der Wissenschaften in Wien, 9. Bd., p. 298 (1852).

von ihm durch die Reaktion mit Chloroform und Schwefelsäure. Der niedriger schmelzende Körper zeigt folgendes Verhalten: in Chloroform gelöst und mit konzentrierter Schwefelsäure geschüttelt, färbt er beide Lösungsmittel rotbraun, nach 24stündigem Stehen ist die Schwefelsäure unverändert rotbraun, die Chloroformschicht rötlichviolett gefärbt. Bei dem höher schmelzenden Körper ist die Schwefelsäure zunächst hell gelbbraun, das Chloroform tief rotviolett gefärbt, nach 24 Stunden hat die Schwefelsäure eine tief gelbbraune, das Chloroform eine grünlichgelbe Färbung angenommen. In beiden Fällen handelt es sich um Körper der Phytosteringruppe.

Die Fettsäuren sind bei gewöhnlicher Temperatur ziemlich fest.

Der Petrolätherauszug der Blätter bildet ein stark riechendes, dickflüssiges Öl, welches durch viel Chlorophyll fast schwarzgrün gefärbt ist. Es enthält Phytosterine, welche sich krystallinisch ausscheiden und mit den oben genannten identisch sein dürften. Unverseifbare Stoffe (Harz und Terpen) sind reichlich vorhanden. Das Öl ergab eine Säurezahl von etwa 60, eine Verseifungszahl von 150, doch sind die Titrations wegen der dunklen Farbe der Lösungen unscharf.

Der Ätherauszug der Galle ist braungrün und amorph. Der wasserlösliche Teil desselben besteht vorwiegend aus Gerbstoff, welcher durch Bleiessig hell gelbbraun gefällt, durch Eisenchlorid schwarzbraun gefärbt und auch teilweise gefällt wird. Der in Wasser nicht lösliche Teil ist ein grünlichbraunes, nicht sprödes Harz, welches die Morawski-Storch'sche Reaktion nicht gibt, in Alkohol, Essigester und Aceton vollständig, in Chloroform unvollständig, in Schwefelkohlenstoff sehr wenig löslich ist.

Der Ätherextrakt der Blätter ist ganz ähnlich beschaffen. Nur zeigt das Harz einige Abweichungen von dem der Gallen. Es ist von Chlorophyll stark grün gefärbt, spröde, gibt die Morawski-Storch'sche Reaktion deutlich und ist in Chloroform vollkommen löslich.

Der Alkoholauszug der Gallen ist ein dicker, bräunlicher Sirup, der nach wochenlangem Stehen teilweise krystallisiert. Der Sirup wird mit Wasser verdünnt, wobei sich eine

nicht unerhebliche Menge eines braungefärbten, amorphen Körpers (wahrscheinlich eines Phlobaphens) abscheidet, und der reichlich vorhandene Gerbstoff mit basischem Bleiacetat gefällt. Das Filtrat wird entbleit, die Essigsäure mit Äther ausgeschüttelt; aus der konzentrierten Flüssigkeit scheiden sich nach einigem Stehen reichlich Krystalle aus; man rührt die Masse mit Holzgeist an, saugt scharf ab und krystallisiert aus demselben Lösungsmittel um. Schließlich erhält man kleine, farblose Krystalle, welche bei  $147^{\circ}$  schmelzen, süß schmecken, in Wasser leicht, in konzentriertem Alkohol sehr wenig löslich sind. Mit Phenylhydrazin gibt das gereinigte Produkt sofort schön gelbe Nadeln eines bei  $205^{\circ}$  schmelzenden Osazons. Die Lösungen der Substanz reduzieren Fehling'sches und Böttger'sches Reagens stark.  $0.2985\text{ g}$  Substanz, in  $10\text{ cm}^3$  Wasser gelöst, drehen nach 24stündigem Stehen die Ebene des polarisierten Lichtes im  $1\text{ dm}$  Rohr um  $4.5^{\circ}$  Ventzke nach rechts, daher  $[\alpha] = +52.2^{\circ}$  (bei  $18^{\circ}\text{ C.}$ ). Der Körper ist also Traubenzucker. Seine Menge ist beträchtlich. Außerdem ergibt sich aus den Mutterlaugen ein gelblicher, stark süß schmeckender Sirup, welcher auch nach langer Zeit nicht krystallisiert und wahrscheinlich Lävulose enthalten dürfte (siehe unten). Der oben erwähnte Bleiniederschlag wird mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Das Filtrat liefert beim Eindampfen einen gelben, amorphen Rückstand, welcher die Eigenschaften von Rochleder's Rhodotannsäure zeigt. Außer diesen beiden, die Hauptmenge des Extraktes bildenden Körpern findet sich noch eine geringe Menge organischer Säuren (Zitronensäure?) vor und eine minimale Quantität von Stoffen, welche durch Kaliumquecksilberjodid gefällt werden.

Der Alkoholauszug der Blätter ist ebenfalls sirupös, krystallisiert aber nicht. Er besteht hauptsächlich aus Gerbstoffen (Rhodotannsäure). Zucker ist nur in geringer Menge vorhanden. Doch ließ sich nach Beseitigung der Gerbstoffe mit Bleiessig aus dem Filtrat das Glukosazon in bekannter Weise gewinnen. Der amorphe, phlobaphenartige Körper ist ebenfalls vorhanden.

Der Wasserauszug der Gallen enthält noch etwas Gerbstoff. Die Hauptmenge desselben sind amorphe Kohle-

hydrate, welche durch Alkohol gallertig gefällt werden; auch Fehling'sche Lösung fällt die ursprüngliche Substanz, während sie nach der Hydrolyse mit Salzsäure stark reduziert wird. Stärke konnte nicht nachgewiesen werden.

Der wässrige Extrakt der Blätter ist gering, er enthält auch noch etwas Gerbstoff und eine kleine Menge amorpher Kohlehydrate. Stärke ist ebenfalls nachweisbar.

Der kalt bereitete Wasserauszug sowohl der Gallen wie der Blätter enthält nur sehr wenig lösliche Eiweißstoffe. Auch konnte in den Gallen weder ein invertierendes noch ein diastatisches Ferment nachgewiesen werden. Allerdings arbeitete ich mit getrocknetem Material.

Die bisherige Untersuchung hatte somit ergeben, daß die Gallen bezüglich ihrer stofflichen Zusammensetzung im wesentlichen mit den Blättern übereinstimmen. Unerwartet war mir nur, daß ich in den Gallen keinen einzigen der charakteristischen Pilzstoffe auffinden konnte. Wenn man jedoch bedenkt, daß der Pilz nur einen geringfügigen Teil des Gallenkörpers bildet, dieser vielmehr hauptsächlich aus den eigentümlich veränderten Zellen des Alpenrosenblattes besteht, und wenn man erwägt, wie unzureichend oft die Methoden sind, um aus komplizierten Körpergemischen einzelne, in sehr kleinen Mengen vorhandene Stoffe zu isolieren, so verliert die oben erwähnte Erscheinung ihr Auffallendes.

Nachdem also die qualitative Untersuchung keinen Anhaltspunkt für den Chemismus der Gallenbildung liefern konnte, versuchte ich soweit als möglich die quantitativen Verschiedenheiten festzustellen.

1. Wasserbestimmung. *a)* Galle. 685 *g* frisches Material gaben 50·5 *g* lufttrockenes Produkt. 4·2185 *g* des letzteren verloren bei 100° im indifferenten Gasstrom noch 0·7865 *g* Wasser; daher im frischen Produkt 94·0% Wasser. *b)* Blätter. 2·488 *g* wie oben getrocknet verloren 1·309 *g* Wasser, daher Wassergehalt 52·6%.

2. Asche. *a)* Galle. 1·7334 *g* trockener Substanz gaben 0·0620 *g* Asche, also 3·57%. *b)* Blätter. 1·7437 *g* getrocknetes Material gaben 0·0535 *g* Asche, d. i. 3·07%.

Es muß bemerkt werden, daß die Asche der Galle weit reicher an wasserlöslichen Salzen ist wie diejenige der Blätter. Leider reichte das Material für eine quantitative Aschenanalyse nicht aus.

3. Petroläther-, Äther-, Alkohol- (95<sup>0</sup>/<sub>10</sub>) und Wasserextrakt.  
*a)* Galle. 11·9605 *g* getrockneter, feingepulverter Substanz lieferten 0·205 *g* (1·71<sup>0</sup>/<sub>10</sub>) Petrolätherextrakt, 0·3205 *g* (2·68<sup>0</sup>/<sub>10</sub>) Ätherauszug, 4·6770 *g* (39·10<sup>0</sup>/<sub>10</sub>) Alkoholextrakt und 1·5930 *g* (13·32<sup>0</sup>/<sub>10</sub>) wasserlösliche Stoffe. *b)* Blätter. 12·0971 *g* trockene, gepulverte Blätter lieferten 1·113 *g* (9·20<sup>0</sup>/<sub>10</sub>) in Petroläther, 1·01 *g* (8·34<sup>0</sup>/<sub>10</sub>) in Äther, 3·9436 *g* (32·60<sup>0</sup>/<sub>10</sub>) in Alkohol, 0·2057 *g* (1·70<sup>0</sup>/<sub>10</sub>) in Wasser lösliche Stoffe.

4. Freie Säure. *a)* 5·4385 *g* getrocknete Galle, mit Wasser ausgekocht, auf 200 *cm*<sup>3</sup> aufgefüllt. 100 *cm*<sup>3</sup> dieser Lösung verbrauchten 2·0 *cm*<sup>3</sup> Lauge (1 *cm*<sup>3</sup> = 0·02883 *g* KOH). *b)* Dieselbe Menge Blätter, in gleicher Weise behandelt; 100 *cm*<sup>3</sup> Lösung verbrauchen 0·8 *cm*<sup>3</sup> derselben Lauge. Titration unscharf wegen der Gerbstoffe.

5. Zucker und Gerbstoff. *a)* 5 *g* getrockneter, pulverisierter Galle, mit Wasser ausgekocht, auf 200 *cm*<sup>3</sup> aufgefüllt; direkte Reduktion in 25 *cm*<sup>3</sup> aus Fehling'scher Lösung 0·3292 *g* Cu; nach Fällung der Gerbstoffe mit basischem Bleiacetat (300 *g* Bleizucker und 100 *g* Bleioxyd pro Liter) betrug die reduzierte Kupfermenge (unter Umrechnung auf gleiche Konzentration wie oben) 0·2988 *g*. Drehung dieser Lösung im 200 *mm*-Rohr +0·97° Ventzke (= 0·3363 Kreisgrade). *b)* 5 *g* getrocknete, pulverisierte Blätter, wie oben behandelt; 25 *cm*<sup>3</sup> der Lösung reduzieren direkt 0·1658 *g* Cu, nach der Bleiessigbehandlung 0·0748 *g*. Drehung dieser Lösung nicht meßbar.

Weder Bleiessig noch Magnesiumoxyd beseitigen die Gerbstoffe völlig, daher sind die aus den Kupfermengen berechneten Zuckerwerte zu hoch, ein Fehler, welcher bei dem Extrakt aus Blättern stärker ins Gewicht fällt. Nimmt man an, daß bei obigen Kupfermengen 1 *g* Dextrose etwa 1·92 *g* und 1 *g* Lävulose 1·84 *g* Kupfer reduzieren, daß ferner für Dextrose  $[\alpha] = +52\cdot5^\circ$ , für Lävulose  $[\alpha] = -92^\circ$  beträgt, so ergeben sich für *a)* die beiden Gleichungen

$$\frac{1}{4} \cdot 1\cdot92x + \frac{1}{4} \cdot 1\cdot84y = 0\cdot2988 \quad \text{und} \quad \frac{2(52\cdot5x - 92y)}{100} = 0\cdot3363, \quad \text{wobei } x$$

und *y* die in 100 *cm*<sup>3</sup> befindlichen Mengen der beiden Zucker bedeuten und sich auf die nach der Bleiessigreinigung gefundenen Werte beziehen. Man findet so  $x = 0\cdot5156$  *g*,  $y = 0\cdot1115$  *g* und daher 20·62<sup>0</sup>/<sub>10</sub> Traubenzucker und 4·46<sup>0</sup>/<sub>10</sub> Fruchtzucker. Bei der Analyse *b)* konnte kein Drehungsvermögen konstatiert werden, es wurde die Kupfermenge auf Traubenzucker berechnet (Allihn'sche Tabelle). Gefunden 6·10<sup>0</sup>/<sub>10</sub>.

Die Differenz im Reduktionsvermögen vor und nach der Bleiessigbehandlung kann auf Rechnung der Gerbstoffe gesetzt werden. Man findet bei *a)* 0·0304 *g*, bei *b)* 0·091 *g* Kupfer. Also ist der Gerbstoffgehalt in den Blättern dreimal so hoch wie in den Gallen. Zur Kontrolle wurden 50 *cm*<sup>3</sup> der ursprünglichen Wasserlösungen mit je 2 *cm*<sup>3</sup> 10<sup>0</sup>/<sub>10</sub>-Eisenchloridlösung versetzt und kolorimetrisch verglichen. Es ergab sich der Gerbstoffgehalt der Blätter 3½ mal so hoch wie derjenige der Gallen.

6. Chlorophyll. Je 2 *g* im Vakuum getrockneter Gallen und Blätter wurden mit 95 prozentigem Alkohol gekocht, die Lösungen auf 100 *cm*<sup>3</sup> auf-

gefüllt und kolorimetrisch verglichen. Chlorophyllgehalt der Blätter 27 mal so groß wie derjenige der Gallen.

7. Ätherisches Öl findet sich nach Haense<sup>1</sup> in den frischen Blättern zu etwa 0·1 0/10, in der Trockensubstanz also etwa 0·2 0/10.

In den Gallen ist kein ätherisches Öl enthalten.

8. Unlösliches Zellgewebe. a) 11·9605 g Trockensubstanz (Galle) ergaben 5·0832 g Unlösliches (42·5 0/10); b) 12·0971 g lieferten 5·8187 g Unlösliches (48·1 0/10).

Die erhaltenen Zahlen sind in der folgenden Tabelle übersichtlich zusammengestellt; sie stellen, wie gesagt, Prozente der Trockensubstanz dar.

	Galle	Blätter
Asche.....	3·57	3·07
Petrolätherauszug.....	1·71	9·20
Ätherisches Öl.....	0	0·2
Ätherauszug (Harz).....	2·68	8·34
Alkoholauszug.....	39·1	32·6
Zucker { Dextrose.....	20·62	6·1
{ Lävulose.....	4·46	
	25·08	—
Gerbstoff.....	—	3 bis 3 1/2 mal soviel wie in der Galle
Wasserauszug.....	13·32	1·70
Freie Säure.....	2 mal soviel wie in den Blättern	—
Chlorophyll.....	—	27 mal so viel wie in der Galle
Unlösliches Zellgewebe.....	42·5	48·1

Ich kann nicht umhin zu bemerken, daß die in der Tabelle enthaltenen Zahlen nicht durchwegs verläßlich sind. Insbesondere möchte ich auf die absoluten Werte der Zuckerbestimmungen im Hinblick auf die Mängel der analytischen Methoden kein großes Gewicht legen, ja ich möchte nicht einmal mit Bestimmtheit behaupten, daß Lävulose wirklich vorhanden ist, was übrigens auf den Gesamtzuckergehalt nur von

<sup>1</sup> Geschäftsbericht, April—September 1906.

geringem Einfluß ist. Ebenso entbehren auch die Bestimmungen des Gerbstoffes und der freien Säure der wünschenswerten Schärfe. Aber zum Vergleich, um den es sich hier in erster Linie handelt, sind sie wohl ausreichend. Es ergibt sich nun, daß der Gehalt der Galle an solchen Stoffen, die in Wasser unlöslich sind, wie Fett, ätherisches Öl, Harz und Chlorophyll, bedeutend herabgesetzt ist. Hingegen erscheinen der Zucker ganz enorm, die freie Säure merklich, die amorphen Kohlehydrate in hohem Grade vermehrt; dazu kommt noch, wie bereits oben erwähnt, aber leider nicht gewichtsmäßig festgestellt wurde, eine bedeutende Anreicherung der Galle an wasserlöslichen Mineralstoffen. Von wasserlöslichen Stoffen sind nur die Gerbsäuren in der Galle stark vermindert. Es findet entschieden eine Speicherung osmotisch wirksamer Stoffe (Zucker, Pflanzensäuren, Mineralsalze) statt. Die Gerbsäuren dürften als amorphe Substanzen kaum eine besondere osmotische Wirkung besitzen, so daß in dieser Beziehung ihre Verminderung wohl keine bedeutende Rolle spielt. Die Aufgabe der reichlich vorhandenen amorphen Kohlehydrate dürfte wohl die sein, das ungemein wasserreiche Gewebe vor zu großer Verdunstung zu schützen. Freilich gelten die obigen Betrachtungen nur für die Trockensubstanz; rechnet man die Werte der Tabelle auf Lebendgewicht um, so findet man, da die Galle 94·0%, die Blätter aber nur 52·6% Wasser enthalten, daß der Zellsaft der ersteren im Vergleich zu dem der Blätter sehr stark verdünnt ist. Ähnliche Verhältnisse treffen wir auch bei saftigen Früchten, wenn wir sie mit den Organen vergleichen, aus welchen sie hervorwachsen. Wiederholt ist von botanischer Seite<sup>1</sup> auf die obstartige Beschaffenheit der *Exobasidium*-Gallen hingewiesen worden. Die chemische Untersuchung zeigt, daß dieser Vergleich in der Tat zutreffend ist. Der Pilz bewirkt in den Blättern Vorgänge, welche denjenigen bei der Bildung fleischiger Früchte in mehrfacher Beziehung analog sein müssen. Diese Vorgänge sind nicht nur chemischer, sondern in hervorragendem Grade auch physikalischer Natur.

<sup>1</sup> Z. B. von Kerner in seinem Pflanzenleben, 1. Aufl. (1891), II, p. 513 und von Zopf, Die Pilze, 1890, p. 235.

Insbesondere müßte das Studium der osmotischen Vorgänge aufklärend wirken. Die Schwierigkeit, das Material im frischen Zustand zu untersuchen, hat mich bisher daran gehindert, dieser Frage sowie auch dem Studium der hier obwaltenden fermentativen Prozesse näherzutreten; vielleicht ist es mir später möglich, die vorliegende Arbeit in diesen Richtungen zu ergänzen. Immerhin glaube ich schon jetzt Gesichtspunkte gefunden zu haben, von welchen aus der Chemismus der Gallenbildung vielleicht erfolgreich betrachtet werden kann.

---