

Untersuchungen über den Protoplasmaströmung auslösenden Reizstoff der Pflanzen.

Von HANS FITTING, Bonn a. Rh.

Durch die Vitamin- und Hormonforschungen der letzten Jahrzehnte ist die Aufmerksamkeit der Physiologen auf die sehr wichtige Tatsache gelenkt worden, daß an den Lebensvorgängen, so auch am Stoffwechsel, geringe Spuren eigenartiger Stoffe besonderer chemischer Zusammensetzung sehr wesentlich, ja maßgebend beteiligt sind. Nach ihren Wirkungen kann man alle diese von den Lebewesen gebildeten Verbindungen wohl als *Reizstoffe* bezeichnen. Auch bei den Pflanzen ist seit der Entdeckung des ersten hormonartig wirkenden Körpers (FITTING, 1, 1909), des hitzebeständigen Pollenhormons der Orchideen, das außer dem Abblühen der Blüte vor allem die Verschwellung der Narbe und des ganzen Griffelsäulchens, ja bei manchen tropischen Arten sogar eine gewisse Verschwellung des (unterständigen) Fruchtknotens bewirkt, eine ständig größer werdende Zahl weiterer Hormone mehr oder weniger sicher bekanntgeworden. Im Gegensatz zu den Tierhormonen ist es aber bis jetzt noch bei keinem einzigen Pflanzenhormon geglückt, seine chemische Zusammensetzung auch nur teilweise zu ergründen, weil die reizstoffhaltigen Teile meist zu klein sind, um (selbst mikro-) chemische präparative Methoden erfolgversprechend anwenden zu können. Verheißungsvolle Ansätze in dieser Richtung sind bisher neuerdings nur bei den Wuchshormonen (Auxinen) KÖGL und SMIT (9, 1931) gelungen, da sie in der glücklichen Lage waren, in großer Menge verfügbaren Menschenharn für ihre Versuche benutzen zu können. Dieser enthält nämlich merkwürdigerweise ziemlich viel bei Pflanzen stark wirksamen Wuchsstoff, den die genannten Forscher für identisch mit dem von der Pflanze gebildeten Wuchsstoff glauben halten zu dürfen.

Wenn sich aus dem obengenannten Grunde auch voraussagen läßt, daß solche Forschungen in der Pflanzenphysiologie und -biochemie zu den sprödesten und schwierigsten Aufgaben gehören werden, die in kürzerer Zeit schwerlich endgültige Erfolge in Aussicht stellen dürften, so ist doch die Frage berechtigt, ob man nicht auch bei Pflanzen diesen wichtigen Problemen allmählich wenigstens etwas beikommen kann. Diese Hoffnung gab mir schon vor etwa 10 Jahren den Anstoß, bei Pflanzen nach solchen Hormonen Ausschau zu halten, bei denen eine experimentelle Bearbeitung in irgendeiner Weise vielleicht doch gelingen könnte. Besonders günstig dafür würden natürlich solche in der Pflanze gebildete Reizstoffe sein, die in sehr kurzer Zeit (einigen Sekunden oder Minuten) auffällige Wirkungen irgendwelcher Art hervor-

zurufen vermögen und die zugleich nicht auf einen sehr kleinen Bezirk des Pflanzenkörpers beschränkt sind, sondern in ihm weiter verbreitet vorkommen. Bei der Suche nach derartigen Stoffen wurde meine Aufmerksamkeit u. a. besonders auf die *Protoplasmaströmung* gelenkt, einen der scheinbar primitivsten elementaren Lebensvorgänge in der Pflanzenzelle. Für diesen Vorgang war seit langem bekannt, daß er, abgesehen von anderen Anlässen, vor allem durch Wundreiz geweckt oder mindestens außerordentlich verstärkt wird. Der Faktor, der bei der Verwundung eigentlich wirksam wird, war aber ganz unbekannt geblieben. Nahm man auch meist an, daß der mit der Verwundung stets verbundene mechanische Eingriff das Wesentliche sei, so war doch auch, und zwar schon vor langer Zeit, im Jahre 1892, die Vermutung geäußert worden, daß irgendwelche Stoffwechselprodukte, die infolge der Verwundung (oder des Absterbens) von Zellen entstehen könnten, die eigentliche Ursache seien.

Es gelang mir (2, 1925) nach Überwindung sehr vieler Schwierigkeiten, eine bisher fehlende einwandfreie Methodik auszubilden, womit eine Lösung dieser Frage glückte. Ich konnte mit ihr nachweisen, daß bei dem für Plasmaströmung seit langem klassisch gewordenen Objekt, der untergetaucht lebenden Wasserpflanze *Vallisneria* und ihren Verwandten, lebhaft Plasmaströmung („Plasmodinese“) in zuvor ruhenden Blattzellen tatsächlich durch Blattextrakte dieser Pflanzen, und zwar bis zu erstaunlich geringen Konzentrationen solcher, ausgelöst wird. Extraktreste aus den Blättern von *Vallisneria* waren nämlich bis zu etwa 1 : 1 und 1 : 2 Millionen Verdünnung noch wirksam; entsprechend gab 1 g Blattfrischgewicht in 12 l Wasser ausgekocht noch einen etwas wirksamen Auszug. Der Reizstoff ist sehr weitgehend hitzebeständig (er hält mehrfaches Eindampfen auf dem Wasserbad aus), dagegen gegenüber Bakterien sehr unbeständig, und er ist nicht flüchtig. Maximal wirksame Blattextrakte lassen sich daher in einfacher Weise dadurch gewinnen, daß frische Blätter in kochendes Wasser geworfen werden. Der Blattextrakt von *Vallisneria* weckt lebhaft Plasmaströmung auch in den Zellen der verwandten Gattung *Elodea* (Wasserpest), und umgekehrt.

Merkwürdigerweise lösen bei *Vallisneria* und *Elodea* Strömung auch äußerst verdünnte wässrige Auszüge aus Filtrierpapieren verschiedenster Herkunft aus (2, 1925), sogar solche aus gehärteten und mit Säuren sehr weitgehend gereinigten Analysenfiltern, so Nr. 589 von Schleicher & Schüll,

Düren, mit der Bezeichnung „Charta filtratoria acido hydrochlorico et fluorico extracta“ und nur spurenweisem Aschengehalt: Eine solche Filterscheibe von bloß 7 cm Durchmesser genügt, bei mehrstündiger Auslaugung mit kaltem Wasser, um $\frac{1}{2}$ —1 l Wasser wirksam zu machen, wenn auch der Reizstoff von den Baumwollfasern des Filtrierpapiers sehr zähe festgehalten wird; bei Behandlung mit kochendem Wasser werden die Filterextrakte daher noch viel wirksamer. Zieht man Filterscheiben obengenannter Art Nr. 589 mit heißem dest. Wasser aus, so erhält man aus einer solchen von 7 cm Durchmesser durchschnittlich 0,2—0,3 mg trockenen stickstoffhaltigen Rückstand, wovon etwa 78 % organische Stoffe sind. Der Schwellenwert dieses Rückstandes liegt bei einer Verdünnung von etwa 1 : 5 bis 1 : 10 Millionen, oft sogar noch viel tiefer. Der wirksame Körper ist wiederum weitgehend hitze-, aber bakterienunbeständig, nicht flüchtig und offenbar eine organische Verbindung.

Nebenher sei ferner erwähnt, daß selbst chemisch nicht ohne weiteres nachweisbare Spuren von Kupfer dem Wasser die Eigenschaft verleihen, bei Vallisneria sehr lebhaft Plasmaströmung wachzurufen; so ist Leitungswasser, das einige Zeit in den messingnen Wasserleitungshähnen gestanden hat, äußerst wirksam (2, 1925). Die Wirkung des Kupfers weicht aber stark von der der Blatt- und Filterauszüge ab: Das Kupfer schädigt nämlich die Blattzellen auf die Dauer, und zwar schon in recht geringen Konzentrationen; dies ist bei den Blatt- und Filterextrakten selbst stärkerer Konzentrationen dagegen gar nicht der Fall. In diesen Extrakten beruhigen sich die strömenden Protoplasten mit der Zeit auch wieder völlig, während sie in kupferhaltigem Wasser viele Tage lang unausgesetzt fieberhaft in Bewegung bleiben. Endlich ist das kupferhaltige Wasser natürlich bakterienbeständig. Aus alledem geht deutlich hervor, daß weder die Filter- noch gar die Blattextrakte ihre Wirkungen etwa darin vorhandenen Kupferspuren verdanken können, was übrigens nur bei den Filterauszügen immerhin denkbar wäre.

Auch nicht sehr sorgfältig gereinigtes dest. Wasser ruft nach meinen Beobachtungen etwas Strömung in den Vallisnerienzellen hervor. Diese Tatsache gab mir daher die Anregung, (zunächst für meine Versuche) einen bisher noch fehlenden, allgemein brauchbaren Apparat zur Herstellung sauberen, physiologisch ganz einwandfreien dest. Wassers zu ersinnen, was in befriedigender Weise gelang (3, 1927), wenn ich auch bei den meisten Versuchen mit Leitungswasser arbeiten konnte.

War durch diese Untersuchungen in den Blatt- (und Filter-) Auszügen somit der Nachweis eines Plasmaströmung auslösenden Reizstoffes geglückt, der gleich Hormonen bis zu sehr hohen Verdünnungen noch wirksam ist, so wurde nunmehr natürlich die Frage nach der chemischen Beschaffenheit dieses Stoffes brennend. Um sie zu

lösen, schien mir zunächst eine eingehende Ermittlung der chemischen Stoffgruppen zweckmäßig, die, ähnlich den Blattextrakten, bis zu sehr hohen Verdünnungen noch Plasmaströmung („Chemodinese“) auslösen: Gibt es viele und noch dazu chemisch sehr verschiedene Stoffe, die dies tun, oder nur ganz wenige? Wenn bei einer sehr eingehenden Untersuchung (3, 1927) auch recht verschiedenartige in Pflanzen vorkommende chemische Verbindungen sich als mehr oder weniger wirksam erwiesen, zeigte systematische Durchforschung der verschiedensten organischen Stoffe doch alsbald, daß eine bei Pflanzen und Tieren allgemein verbreitete Gruppe von Verbindungen, die zum Eiweißstoffwechsel in engster Beziehung stehen, allen anderen geprüften Stoffen in dieser Hinsicht nicht unwesentlich überlegen ist, nämlich eine größere Zahl von α -Aminosäuren, im besonderen das l-Histidin, das l-Asparagin, die d-Glutaminsäure, die l-Asparaginsäure, das Norvalin und das Norleuzin; aber auch das Phenylalanin, das Serin, das Alanin und die Amino-n-buttersäure waren noch recht wirksam. Und zwar lagen die unteren Schwellen der Wirkung für die erstgenannten 6 Aminosäuren in meinen ersten Versuchen bei und unter 1 : 30 bis 1 : 75 Millionen, bei den vier folgenden zwischen 1 : 1 und 1 : 10 Millionen Verdünnung. Viel weniger wirksam (mit Schwellen bis allerhöchstens etwa 1 : 150000 Verdünnung) waren dagegen das Glykokoll, Ornithin, Glutamin, Prolin und Oxyprolin; so gut wie ganz unwirksam endlich sind selbst in verhältnismäßig hohen Konzentrationen Arginin, Lysin, Cystin, Tyrosin, Tryptophan und fast alle dem Eiweiß entstammenden α -Aminosäuren mit verzweigten Kohlenstoffketten, nämlich Aminoisobuttersäure, Valin, Leuzin (und Isoleuzin).

Weiter konnte ich feststellen, daß es sich bei der Auslösung der Plasmaströmung offenbar um eine hochgradige spezifische Empfindlichkeit gerade gegenüber natürlich vorkommenden optisch-aktiven α -Aminosäuren handelt: Weder die zu den verschiedenen Aminosäuren gehörigen Säuren, Amide, Amine oder anderen Radikale können sich, sofern sie überhaupt wirksam sind, bei vielen von ihnen aber gar nicht der Fall ist, auch nur annähernd mit den α -Aminosäuren messen, noch auch die β -, γ -, . . . ω -Aminosäuren (solche sind um so unwirksamer, je weiter entfernt die Amino-gruppe $-\text{NH}_2$ vom α -Kohlenstoffatom sich befindet) oder selbst die unnatürlichen optisch-aktiven Antipoden der natürlich vorkommenden wirksamen Komponenten (4, 1929). Denn von solchen unnatürlichen optisch-aktiven Säuren lagen die unteren Schwellen für das l-Alanin (400—) 1000 mal, für die d-Asparaginsäure (50—) 200 mal und für das d-Histidin (20) 30—50 mal höher als bei den natürlichen Antipoden.

Diese Einsichten eröffneten nun einen gangbar scheinenden Weg zu weiteren Fortschritten in der Analyse der in den Blattextrakten wirksamen Reizstoffe. Alle meine bisher besprochenen For-

schungen auf dem Gebiete der Plasmaströmung, ebenso wie die von mir veranlaßten meines Mitarbeiters SCHWEICKERDT über die Auslösung der Plasmaströmung durch Licht (11, 1928) drängten mich zu der durch viele Tatsachen begründeten Vorstellung, daß es sich bei diesem Vorgang um eine typische Reizerscheinung handelt. Von gleichartigen Reizreaktionen in einem Organ, die durch verschieden geartete Reizanlässe ausgelöst werden können, wissen wir aber, daß dafür in dem Organ untereinander verschiedene Sensibilitäten („Empfindungsarten“) ausgebildet zu sein pflegen, so z. B. in einem sowohl geo- wie phototropisch sich krümmenden Stengel eine für die Schwerkraft und eine davon verschiedene für Licht. Das gleiche hat sich für solche Reizprozesse nachweisen lassen, die durch chemische Stoffe geweckt werden, so besonders für die Chemotaxis: Wo z. B. ein Bakterium oder ein Schwärmer durch chemisch sehr verschiedene Verbindungen chemotaktisch angelockt wird, sind meist auch ganz verschiedene Sensibilitäten für die wirksamen Stoffgruppen vorhanden. Das zeigt sich z. B. darin, daß chemische Verbindungen, für welche die Empfindungsart gleich ist, aufeinander abstumpfend wirken, ebenso wie es bei einem und demselben Reizanlaß (Licht und Licht) stets beobachtet wird, während eine solche wechselseitige Abstumpfung begrifflicherweise fehlt, wenn die Empfindungsarten für zwei chemische Verbindungen ganz verschieden sind. Ist die Plasmaströmung also ein echter Reizvorgang, so darf man wohl voraussagen, daß für sie Gleiches oder mindestens Ähnliches gilt wie z. B. für die Chemotaxis, nämlich daß der in den Blattextrakten wirksame Reizstoff abstumpfend wie gegen sich selbst, so auch vor allem gegen solche chemische Verbindungen wirken werde, die ihm chemisch verwandt sind, und umgekehrt. Sollte also der wirksame Stoff etwa zu den α -Aminosäuren gehören, eine Vermutung, die meine oben mitgeteilten Befunde nahelegten, so müßte er wohl vor allem durch solche Säuren mehr oder weniger abgestumpft werden.

Voraussetzung für eine experimentelle Prüfung dieser wichtigen Frage war es freilich, daß die Plasmaströmung zu denjenigen Reizreaktionen gehört, die man Übergangsreaktionen genannt hat. So heißen Reizreaktionen, die trotz ständigem Fortwirken des Reizanlasses, der sie auslöste, allmählich wieder völlig abklingen. Dieser Nachweis gelang nun zunächst SCHWEICKERDT (11, 1928) bei der Plasmaströmung wenigstens für gewisse Lichtwellen des sichtbaren Spektrums (nämlich das Grün und Blau) und danach mir, nachdem in beharrlicher Arbeit auch dafür eine brauchbare Methode ausgearbeitet worden war, zunächst für einen chemischen Anlaß, das Asparagin (5, 1930): Vallisnerienblätter, in deren Zellen Asparaginslösungen sehr geringer Konzentration recht lebhaft Strömung geweckt hatten, kamen in eben diesen Lösungen, selbst wenn dafür gesorgt wurde, daß ihre Konzentrationen sich während

der Versuche nicht veränderten, allmählich, wenn auch erstaunlich langsam, in etwa 3—4 Tagen, wieder völlig zur Ruhe. Wurde nunmehr die Asparaginslösung durch eine gleich starke solche ersetzt, so trat natürlich in den Zellen keine Veränderung ein; wurden dagegen etwas höhere Asparaginkonzentrationen genommen, so lösten diese wieder Strömung aus, sofern der Schwellenwert überschritten wurde. Und diese Unterschiedsschwellen wurden bereits bei Verdoppelung bis Verdreifachung der Konzentration erreicht; sie sind verglichen mit Unterschiedsschwellen bei anderen pflanzlichen Reizreaktionen (= 5 und größer als 5) ziemlich klein. Das Bestehen einer Unterschiedsschwelle zeigt überzeugend, daß in den Blättern mit der Zeit eine gewisse Abstumpfung für das Asparagin stattgefunden hatte. Nunmehr war die Möglichkeit zur Entscheidung der Frage gegeben, ob und wie weit in entsprechender Weise auch eine wechselseitige Abstumpfung verschiedenartiger chemischer Verbindungen bei der Plasmodinese vorkommt.

Ehe zu solchen Versuchen auch Blattextrakte herangezogen werden konnten, war es aber offenbar zunächst weiter erforderlich, das wechselseitige Abstumpfungsvermögen wohl definierter chemischer Verbindungen, etwa derjenigen verschiedenen Aminosäuren, die besonders stark wirksam sind, mit Hilfe dieser Methode genauer zu erforschen, auch schon um die Größe der Empfindlichkeit und des Unterscheidungsvermögens der Vallisnerienprotoplasten für die verschiedenen natürlichen α -Aminosäuren noch genauer als bisher kennenzulernen. Das Ergebnis entsprechender Untersuchungen (7, 1932) war für das Reizstoffproblem, wie mir scheint, sehr wichtig. Alle geprüften α -Aminosäuren, mögen sie chemisch auch noch so verschieden sein, stumpfen einander, sofern sie überhaupt wirksam sind, mehr oder weniger ab; und zwar geht das Abstumpfungsvermögen im allgemeinen der Stärke ihrer chemodinetischen Wirksamkeit parallel, die man z. B. aus den Größen der absoluten Schwellenwerte und der Unterschiedsschwellen, aus den Intensitäten der ausgelösten Reaktionen und aus der Nachhaltigkeit der ausgelösten Strömung erschließen kann. Um die Stärke des Abstumpfungsvermögens sicher feststellen zu können, erwies es sich aber als unbedingt erforderlich, die Abstumpfungsversuche stets in reziproken Richtungen auszuführen, und zwar deshalb, weil solche Versuche $A \rightarrow B$ anders ausfallen können als $B \rightarrow A$, und ferner, zu hohe Aminosäurekonzentrationen zu vermeiden, weil in Bestätigung früherer Beobachtungen von mir (3, 1927) merkwürdigerweise solche höhere Konzentrationen vieler Aminosäuren (wie schon etwa 0,01—0,001 mol) im Gegensatz zu weit geringeren (wie etwa 0,00001 oder 0,000001 mol) keine Plasmaströmung mehr wecken und entsprechend auch nicht mehr abstumpfend auf die anderen Aminosäuren wirken; man muß demnach bei den Aminosäuren außer einer unteren Reizschwelle

auch eine obere Schwelle ihrer Wirkung unterscheiden.

Meine Versuche zeigten also in aller Klarheit, daß bezüglich der Empfindlichkeit der Zellen und des wechselseitigen Abstumpfungsvermögens der Säuren eine abgestufte Rangordnung unter den wirksamen α -Aminosäuren besteht, und daß die lebenden Zellen entsprechend auch überraschend fein zwischen den einzelnen wirksamen (und unwirksamen) Aminosäuren zu unterscheiden verstehen, wie z. B. selbst zwischen den so nahe miteinander verwandten Alanin und Serin, Phenylalanin und Oxyphenylalanin (= Tyrosin), Asparagin und Glutamin, Norvalin und Norleuzin usw. Und zwar erwies sich an Tiefe der absoluten unteren Reizschwelle (bis 1:250, ja manchmal sogar 1:650 Millionen Verdünnung), an Kleinheit der Unterschiedsschwelle (um 1,25), an Reaktionsintensität (die Verdünnung 1:32 Millionen weckt noch *starke* Strömung) und an Nachhaltigkeit der ausgelösten Wirkung (die Zellen beruhigen sich nur in *sehr* verdünnten Histidinlösungen, und dies erst nach 4—5 Tagen!), sowie endlich an Wirksamkeit gegenüber den übrigen Aminosäuren, worin die Zellen sich zuvor wieder beruhigt haben, das *l*-Histidin allen anderen Säuren weit überlegen. Diesem schließt sich, aber erst in weitem Abstände, das *l*-Asparagin, ihm in sehr kleinem das *raz.*-Norvalin und das *raz.*-Phenylalanin an; z. B. liegt beim Asparagin die untere Schwelle bei etwa 1:30 Millionen Verdünnung, und seine Unterschiedsschwelle ist etwa 2 bis 3,5, im Mittel 3. Allen diesen Säuren ein wenig unterlegen sind alsdann das *raz.*-Serin, die *l*-Asparagin- und die *d*-Glutaminsäure, sowie das *raz.*-Norleuzin, die sämtlich untereinander sehr ähnlich stark sind und entsprechend sich wechselseitig auch nahezu völlig abstumpfen; ihnen wieder folgen in größerem Abstände das noch schwächere *raz.*-Alanin und die *raz.*-Amino-*n*-buttersäure, und in noch größerem endlich das *raz.*-Glykokoll.

Aus allen diesen Beobachtungen habe ich geglaubt schließen zu müssen (7, 1932), daß für sämtliche α -Aminosäuren, also selbst für untereinander so verschiedene wie etwa das Histidin, Phenylalanin und Asparagin, die Sensibilität doch gleich ist (eben weil sie sich gegenseitig mehr oder weniger weitgehend abstumpfen), und daß nur die *Intensitäten* der Erregung, die durch gleiche Konzentrationen der verschiedenen Säuren ausgelöst werden, bei den einzelnen Säuren verschieden sind. Die Folgerung, daß die Sensibilität für alle Aminosäuren identisch ist, würde ohne weiteres einleuchten, wenn die chemodinetische Wirkung dieser Säuren *nur* von der allen sehr wirksamen Aminosäu-

ren gemeinsamen Aminosäuregruppe $\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{—C—COOH} \\ | \\ \text{NH}_2 \end{array}$

abhänge. Dies ist aber offenbar nicht der Fall; vielmehr weisen mancherlei Tatsachen darauf hin, daß die Wirkung vom *ganzen* Molekül, nicht nur

von seinen Radikalen oder einem derselben, ausgeht. So scheint also aus einer Reihe von Gründen, die hier nicht näher erörtert werden können (vgl. dazu 7, 1932), der Schluß sich aufzudrängen, daß chemisch recht verschiedene Moleküle, wie etwa Histidin, Phenylalanin oder Asparagin, doch durch Vermittelung der *gleichen* Sensibilität (Empfindungsart) Plasmaströmung auslösen. Da Analoges auch bei der Chemotaxis für einige chemische Verbindungen ungleich verschiedenerer Zusammensetzung, und zwar selbst mit solchen Bakterien oder Schwärmmern beobachtet worden ist, wo wir gleichwohl gesonderte Empfindungsarten wenigstens für gewisse chemische Stoffgruppen finden, ließ sich natürlich nicht ohne weiteres beurteilen, ob etwa für *sämtliche* plasmodinetisch wirksamen Stoffe verallgemeinert werden muß, was mit großer Wahrscheinlichkeit bezüglich der Plasmaströmung für die *Aminosäuren* ausgesagt werden kann. Infolgedessen habe ich nunmehr auch noch die wechselseitige Abstumpfung solcher Säuren, und zwar im besonderen des *l*-Histidins und des *raz.*-Phenylalanins, mit mehr oder weniger andersartigen Verbindungen untersucht, die ebenfalls, wenn auch nicht so stark wie jene, chemodinetisch wirksam sind (8, 1933). Alle dabei geprüften Verbindungen (Nichtaminosäuren), mochten sie mit diesen beiden Aminosäuren verwandt sein oder nicht, stumpften nun sogar in verhältnismäßig hohen Konzentrationen selbst weitgehend verdünnte Histidin- oder Phenylalaninlösungen nur sehr geringfügig ab; umgekehrt wirkten auch solche Histidin- oder Phenylalaninlösungen auf chemodinetisch wirksame Nichtaminosäuren nur in äußerst geringem Maße oder so gut wie gar nicht abstumpfend. In dieser letzteren Hinsicht unterschieden sich die Ergebnisse dieser Versuche wesentlich von denen der früheren Abstumpfungsversuche Aminosäuren \rightleftharpoons Aminosäuren. Vielleicht darf man daraus also auf Unterschiede in den Empfindungsarten für verschiedene Gruppen von Verbindungen schließen; sehr viel mehr Versuche, als ich durchführen konnte, auch unter Heranziehung noch anderer Aminosäuren, werden aber nötig sein, um hier ganz klar zu sehen.

Nach allen im vorstehenden mitgeteilten Erfahrungen lag es nunmehr gewiß am nächsten, das *l*-Histidin, also den von allen bisher geprüften chemischen Verbindungen bei weitem wirksamsten Körper, als das auch in den Blattextrakten wirksamste chemische Prinzip anzunehmen. Erfreulicherweise unterscheidet sich das Histidin außer durch die Stärke zugleich auch noch durch einige andere Besonderheiten seiner chemodinetischen Wirkung mehr oder weniger von allen anderen α -Aminosäuren, so daß eine Reihe von Anhaltspunkten gewonnen worden war, um diese Vermutung nun auf ihre Richtigkeit näher prüfen zu können. Wertvolle Anzeichen dafür, ob in den Blattauszügen Histidin oder andere, etwa ebenfalls den Eiweißstoffen entstammende, Amino-

säuren als wirksame Verbindungen enthalten sein könnten, müßten ja vor allem wieder Abstumpfungversuche liefern, wobei nun also die wechselseitige Abstumpfung des *Blattextraktes* und der verschiedenen Aminosäuren ermittelt würde. Zur Fortsetzung der Untersuchungen in solchen Richtungen mußte übrigens schon die in dieser Hinsicht wichtige Entdeckung (7, 1932) anregen, daß in den lebenden Vallisnerienblättern hitzebeständige und nichtflüchtige Stoffe vorhanden sind, die im Laufe von Stunden aus ihnen an das sie umspülende Wasser in sehr geringen Mengen abgegeben werden und die sowohl Plasmaströmung auslösen als auch, worauf besonders hingewiesen werden muß, die Empfindlichkeit gegen solche Aminosäuren wie l-Histidin und *raz.*-Phenylalanin herabsetzen, also abstumpfend auf diese wirken. Daß diese Stoffe mit den in den Blattauszügen wirksamen identisch sind, liegt wohl auf der Hand.

Folgender indirekter, und zwar verhältnismäßig wenig mühsamer Weg schien sich also jetzt vor allem darzubieten, um dem Wesen des Reizstoffes in den Blattextrakten etwas näherzukommen. Gehört dieser Stoff in der Tat zu den Aminosäuren, so müßte sich wenigstens mit einer oder einigen solchen eine vollständige wechselseitige Abstumpfung nachweisen lassen. Wäre z. B. der Reizstoff etwa das Asparagin oder eine andere chemodinetisch nahezu gleich starke oder gar ausgesprochen schwächere Aminosäure als dieses, so müßte nach den oben besprochenen Ergebnissen meiner Abstumpfungversuche mit Aminosäuren in allen diesen Fällen das Asparagin *völlig* abstumpfen, da es ja eben an Stärke seiner abstumpfenden Wirkung alle anderen Aminosäuren, ausgenommen das Histidin, umschließt. Sollte dagegen das Asparagin nur wenig abstumpfen, der Reizstoff also stärker sein als dieses, so käme von den untersuchten α -Aminosäuren überhaupt bloß noch das ihm chemodinetisch überlegene Histidin in Betracht. Es blieben also jetzt nur noch die Fragen zu lösen, 1. ob sich der Reizstoff und das Histidin völlig oder nahezu ganz gegenseitig abstumpfen, oder 2. ob so gut wie keine wechselseitige Abstumpfung zwischen beiden vorhanden ist. Im letzten Falle würde man den Reizstoff vielleicht unter solchen chemodinetisch wirksamen Verbindungen zu suchen haben, die *nicht* zu den Aminosäuren gehören. Im ersten und zweiten aber käme bei unseren jetzigen Kenntnissen von den Chemodinese auslösenden Verbindungen nur noch das Histidin in Betracht. Sollte sich alsdann ferner auch noch nachweisen lassen, daß der Reizstoff ganz oder auch nur sehr weitgehend die gleichen besonderen chemodinetischen Eigenschaften wie das Histidin besitzt, so würde man in allen diesen Tatsachen doch wohl wichtige Hinweise darauf besitzen, daß dieser Reizstoff Histidin ist oder, da man bei physiologischen Indizienbeweisen nicht vorsichtig genug sein kann, zum mindesten darauf, daß der Reizstoff ein vielleicht dem Histidin

sehr nahe verwandter Körper ist, dessen chemodinetischen Eigenschaften nur die des l-Histidins von allen bekanntgewordenen hochwirksamen chemischen Verbindungen gleich oder besonders nahekommen. Und nunmehr könnte man mit chemischen Methoden weiter festzustellen versuchen, nicht nur ob wirklich Histidin in den Blattauszügen vorhanden ist, sondern auch, ob es quantitativ in hinreichenden Mengen darin vorkommt, um die Stärke der chemodinetischen Wirksamkeit der Blattextrakte zu erklären; denn gerade für das Histidin unter den Aminosäuren verfügt man über Methoden, um, wenigstens unter gewissen Bedingungen, selbst sehr geringe Mengen davon qualitativ, ja sogar quantitativ ausreichend erfassen zu können.

Untersuchungen, die in allen diesen Richtungen durchgeführt wurden (8, 1933), haben nun folgende Tatsachen ergeben. Die Schwelle der mit bester Methode hergestellten Blattextraktpulver liegt bei 0,00005% Konzentration so tief, daß von allen bisher bekanntgewordenen chemodinetisch wirksamen Verbindungen überhaupt nur hochwirksame Aminosäuren als Reizstoff in Betracht kommen können. Denn bei den wirksamsten Nichtaminosäuren haben die Schwellenkonzentrationen einen Gehalt von mindestens 0,0005—0,0001%. Entsprechend läßt sich auch eine weitgehende wechselseitige Abstumpfung zwischen dem Auszug aus den Vallisnerienblättern und solchen Aminosäuren wie Histidin, Asparagin oder Phenylalanin wirklich nachweisen. Und zwar sind in den Abstumpfungversuchen Histidin \rightarrow Blattextrakt ungefähr gleichwertig solche Histidin- und Blattextraktkonzentrationen, für die dies nach den absoluten unteren Schwellen des Histidins und des Blattauszuges sich von vornherein erwarten ließ. Durch Asparagin und durch Phenylalanin werden die Blattextrakte dagegen offensichtlich viel weniger als durch das Histidin abgestumpft. Die Abstumpfungversuche Asparagin und Phenylalanin $\left\{ \begin{array}{l} \text{Histidin} \\ \text{Blattextrakt} \end{array} \right.$ zeigen infolgedessen, daß dabei chemodinetisch etwa gleichwertig die Histidin- und Blattextraktkonzentrationen sind, die einerseits nach den Schwellen des Histidins und des Blattextraktes und andererseits nach den Abstumpfungversuchen Histidin \rightarrow Blattextrakt auch etwa gleichwertig sind. Aus alledem geht hervor, daß der Blattauszug und das Histidin sich wechselseitig ganz anders abstumpfen, als es früher in den Abstumpfungversuchen Histidin \rightarrow alle anderen Aminosäuren und erst recht in den Versuchen Histidin \rightarrow Nichtaminosäuren von mir gefunden worden war, nämlich viel stärker, d. h. so, wie es eben *nur* in den Abstumpfungversuchen Histidin \rightarrow Histidin der Fall war. Von sämtlichen früher chemodinetisch wirksam gefundenen Verbindungen, im besonderen den hochwirksamen Aminosäuren, könnte also nur das Histidin als Reizstoff in den Blattextrakten in Betracht kommen. Die Plasmaströmung scheint

denn auch in den Blattauszügen annähernd ebenso schwer und zugleich launenhaft abzuklingen, wie es nur beim Histidin der Fall war. Auch die Unterschiedsschwelle liegt beim Blattextrakt mit 1,5 bis 1,75 tiefer als bei allen Aminosäuren mit Ausnahme des Histidins, wofür sie, wie oben schon erwähnt, etwa 1,25 war.

Würde der Reizstoff des Blattextraktes nicht das Histidin sein, so wäre es mehr als merkwürdig, wenn die abstumpfenden Wirkungen des Blattauszuges gegenüber den Aminosäuren und anderen Verbindungen ausgemacht die gleichen oder nahezu die gleichen Eigenarten zeigten, wodurch sich ausschließlich das Histidin von allen anderen geprüften Verbindungen, und zwar selbst den nächststärksten, wie dem Asparagin und dem Phenylalanin, so auffällig unterschied. Außer der Abstumpfung sind aber auch die zahlenmäßigen Übereinstimmungen der *gesamten* sonstigen chemodinetischen Eigenschaften des Blattextraktes gerade und nur mit dem Histidin überraschend weitgehend, wenn auch, soweit ich sehen kann, nicht in allen Stücken *ganz* vollkommen.

Alle meine Versuche machen nun auch eine ziemlich genaue Einschätzung des Histidingehaltes im Blattextrakt möglich. Folgende Zahlen stehen dafür u. a. zur Verfügung. Es entsprachen einander:

	l-Histidin mol	Blattextrakt %
a) nach den unteren Schwellen	etwa 0,0 ⁵ 1 =	0,0 ² 1
b) nach den Abstumpfungsversuchen Histidin → Extrakt	etwa 0,0 ⁵ 1 =	0,0 ³ 6—0,0 ³ 8
c) nach den Abstumpfungsversuchen Extrakt → Histidin . . .	etwa 0,0 ⁵ 1 =	0,0 ² 2
d) nach den Abstumpfungsversuchen Asparagin → Extrakt und Asparagin → Histidin .	etwa 0,0 ⁵ 1 =	0,0 ² 1—0,0 ² 2
e) nach den Abstumpfungsversuchen Galakturonsäure ¹ → Extrakt und Galakturonsäure → Histidin	etwa 0,0 ⁵ 1 =	0,0 ² 2.

Wie man sieht, stimmen die Blattextrakte, die 0,000001 mol l-Histidin in meinen sehr verschiedenartigen Versuchen gleichwertig sind, so gut miteinander überein, wie man es bei physiologischen Versuchen nur immer erwarten kann. Aus methodischen Gründen scheinen mir die sichersten und genauesten die der Versuche d) und e) zu sein. Da 0,0⁵1 mol l-Histidin (Mol.-Gew. 155,1) 0,0⁴1551 % dieser Verbindung enthalten, würden also in 0,001—0,002 % Blattextrakt etwa diese Menge, d. h. 1,551—0,775 %, rund etwa 1 % Histidin, anzunehmen sein.

Weitere Bemühungen waren nun darauf ge-

¹ Diese Verbindung wurde u. a. gewählt, weil sie chemodinetisch etwas wirksam ist (Schwelle bei etwa 0,0⁴5 mol [8, 1933]), mit den Aminosäuren chemisch aber gar nichts zu tun hat.

richtet, das vermutete Histidin in den Blattauszügen womöglich mit chemischen Methoden nachzuweisen (8, 1933). Die diese Verbindung noch in recht geringen Mengen anzeigende (wenn auch dafür nicht spezifische) Diazofarbreaktion fiel leider negativ aus, aber, wie sich zeigen ließ, schon deshalb, weil sie durch irgendwelche Blattextraktstoffe gehemmt wird. Auch die für alle Aminosäuren bezeichnende, wenn ihnen auch nicht ausschließlich zukommende Blaufärbung durch das sog. Ninhydrin wird durch solche Stoffe in den Blattauszügen gehemmt. Dagegen fiel die Merkuriazetreaktion auf diese Säuren in 10 % Blattauszügen positiv aus.

Der sichere *direkte* Beweis dafür, daß in den Blattextrakten wirklich Histidin vorhanden ist, steht also noch aus. Kann dies auch, wie wir sahen, darin seinen zureichenden Grund haben, daß die zum Nachweis dieser Verbindung verfügbaren Methoden unter solchen Bedingungen, wie sie in den Blattauszügen vorliegen, versagen, so muß nach diesen Erfahrungen doch damit gerechnet werden, daß in den Blattextrakten nicht freies Histidin der Reizstoff ist, sondern eine Histidinverbindung, welche die Diazoreaktion nicht mehr gibt. Dies ist mir jedenfalls wahrscheinlicher, als die andere, trotz allen meinen gegenteiligen Befunden an sich noch immer mögliche Annahme, daß es unter den Nichtaminosäuren doch noch eine unbekannte gibt, die an Stärke der chemodinetischen Wirkung und des Abstumpfungsvermögens dem Histidin und nur dieser Aminosäure geradezu überraschend nahekommt.

Kann hier also zur Zeit noch nicht das letzte Wort gesprochen werden, so haben meine Forschungen, über die ich in diesem Aufsatz kurz berichtet habe, doch wohl gezeigt, daß es auf den von mir eingeschlagenen physiologischen Wegen möglich gewesen ist, in sehr schwierige und wichtige biochemische und pflanzen- (im besonderen reiz-) physiologische Probleme ziemlich tief einzudringen. Sie haben uns in einigen Aminosäuren, d. h. überall im Stoffwechsel bei Pflanzen und Tieren vorkommenden Bausteinen und Spaltprodukten der Eiweißstoffe, vor allem im Histidin, außerordentlich wirksame Reizstoffe kennen gelehrt. Und es ist durch sie zum mindesten sehr wahrscheinlich gemacht worden, daß das wirksame Prinzip in den Blattauszügen von *Vallisneria* eine solche Aminosäure, nämlich das Histidin, oder eine Histidinverbindung ist. Ob diese Aminosäure auch in den Filtrierpapieren der wirksame Reizstoff ist, läßt sich dagegen mangels entsprechender Untersuchungen noch nicht übersehen.

Bisher galten die Aminosäuren als physiologisch besonders indifferente Verbindungen, wenn auch Abbauprodukte von ihnen, wie z. B. das Histamin und einige andere den Aminosäuren nahestehende Amine, oder ihnen noch näher verwandte Verbindungen wie das Thyroxin sich im Tierkörper als äußerst wirksame Hormone erwiesen haben. In diesem Zusammenhang dürfte es inter-

essieren, daß das Histamin chemodinetisch im Gegensatz zum Histidin nur wenig wirksam ist (die Schwelle liegt bei etwa $0,0^{25}$ — $0,0^{25}$ mol [8, 1933]). Daß sich die Wirkungen der Aminosäuren, welche Plasmaströmung in überraschend geringen Konzentrationen auszulösen vermögen, auch auf andere physiologische Vorgänge im Pflanzenkörper, zum mindesten bei gewissen Gewächsen, erstrecken werden, war mir nach meinen Erfahrungen von vornherein um so wahrscheinlicher, weil mehr oder weniger enge Beziehungen zwischen der Plasmaströmung und anderen physiologischen Vorgängen in den Pflanzen bestehen dürften. Diese Vermutung hat denn auch bald Bestätigungen erhalten. Zunächst habe ich selbst gefunden (6, 1930), daß die bekannte nastische Blattbewegung bei der Sinnpflanze (*Mimosa pudica*) an solchen Blättern, die man mit den abgeschnittenen Stielenden in Lösungen chemischer Verbindungen tauchen läßt, durch geringe Konzentrationen einiger α -Aminosäuren, nämlich Glykokoll, Amino-n-buttersäure, l-Asparaginsäure, vor allem aber Alanin (Schwelle $0,003$ mol), Serin (Schwelle $0,006$ mol) und d-Glutaminsäure (Schwelle $0,004$ mol), dagegen z. B. nicht durch Histidin, ausgelöst wird, während fast sämtliche anderen geprüften chemischen Verbindungen in geringen Konzentrationen unwirksam sind. Noch wichtiger ist aber im Hinblick auf meine Forschungen über die Auslösung von Protoplasmaströmung bei Wasserpflanzen der Nachweis SCHWABES (10, 1932), daß die Atmung einiger Wasserpflanzen, darunter auch der mit *Vallisneria* nahe verwandten Wasserpest (*Elodea*), durch einige Aminosäuren stimuliert wird, und zwar soll es sich dabei um eine spezifische Wirkung solcher Säuren handeln. Bei *Elodea* steigerten die Atmung besonders stark Alanin, Phenylalanin und Tyrosin, das Histidin dagegen verhältnismäßig sehr wenig. Bei anderen Pflanzengattungen ist die Reihenfolge eine andere; z. B. wirkten auf das Laichkraut (*Potamogeton*) am stärksten das Tyrosin und die d-Glutaminsäure. Untere Schwellen für die atmungssteigernden Wirkungen konnten leider nicht bestimmt werden; jedoch ließ sich zeigen, daß schon recht geringe

Konzentrationen (z. B. $0,0002$ — $0,001$ mol) die Atmung wesentlich erhöhen. Ganz besonders wichtig ist die Beobachtung, daß die Wirkungen mit steigenden Konzentrationen wieder abnehmen, so daß also außer unteren Schwellen auch obere solche vorkommen, die bei den einzelnen Aminosäuren verschiedene Lagen haben, z. B. für Tyrosin bei etwa $0,001$ mol, für das Glykokoll dagegen bei $0,02$ und $0,05$ mol. „Einen besonders interessanten Verlauf zeigt die Atmung von *Elodea* in den Asparaginsäurelösungen. . . Außer einer oberen Wirkungsschwelle bei ungefähr $\frac{3}{1000}$ mol bis $\frac{6}{1000}$ mol hat man ein Minimum der atmungssteigernden Größe zwischen $\frac{1}{100}$ mol und $\frac{3}{200}$ mol, bei $\frac{1}{50}$ mol wächst die atmungssteigernde Größe wieder.“ Ganz Entsprechendes hatte ich früher bezüglich der Wirkung mehrerer Aminosäuren auf die Protoplasmaströmung gefunden (3, 1927; vgl. auch 7, 1932)! Man geht wohl nicht fehl mit der Annahme, daß mit der Auslösung der Plasmaströmung eine Atmungssteigerung verbunden ist. Daß die letztere nicht bei so hohen Verdünnungen der Aminosäuren nachgewiesen werden kann wie die erstere, mag in der geringen Genauigkeit der Meßmethoden für die Atmung begründet sein.

Auch bei Tieren haben übrigens neuere Untersuchungen gezeigt, daß die α -Aminosäuren nicht so indifferent zu sein brauchen, wie man früher annahm; allerdings erstreckt sich ihre Wirksamkeit hier nirgends bis zu so weitgehenden Verdünnungen wie bei *Vallisneria*. Eine kurze Zusammenfassung darüber habe ich in meiner oben erwähnten Mimosenarbeit (6, 1930; S. 763 ff.) gegeben, worauf hier verwiesen sei.

Zitierte Literatur.

1. H. FITTING, Z. Bot. 1 (1909), 1 ff. — 2. H. FITTING, Jb. Bot. 64, 281 ff. (1925). — 3. H. FITTING, Jb. Bot. 70, 1 ff. (1927). — 4. H. FITTING, Jb. Bot. 70, 1 ff. (1929). — 5. H. FITTING, Z. Bot. 23, 328 ff. (1930). — 6. H. FITTING, Jb. Bot. 72, 700 ff. (1930). — 7. H. FITTING, Jb. Bot. 77, 1 ff. (1932). — 8. H. FITTING, Jb. Bot. 78, 319 ff. (1933). — 9. F. KÖGL u. J. H. SMIT, Proc. kon. Akad. Wetensch. Amsterdam 34, 1411 ff. (1931). — 10. G. SCHWABE, Z. Protoplasma 16, 397 ff. (1932). — 11. H. SCHWEICKERDT, Jb. Bot. 68, 79 ff. (1928).

Kurze Originalmitteilungen.

Unter Mitwirkung von MAX HARTMANN, MAX v. LAUE, CARL NEUBERG, ARTHUR ROSENHEIM und MAX VOLMER.

Für die kurzen Originalmitteilungen ist ausschließlich der Verfasser verantwortlich.

Der Herausgeber bittet, 1. im Manuskript der kurzen Originalmitteilungen oder in einem Begleitschreiben die Notwendigkeit einer baldigen Veröffentlichung an dieser Stelle zu begründen, 2. die Mitteilungen auf einen Umfang von höchstens einer Druckspalte zu beschränken.

Wasserstoff-Isotopen-Effekt in den OH-Banden.

Unter Benutzung einer Wasserprobe von der Dichte $1,035$, die wir von Herrn Prof. G. N. LEWIS erhalten haben¹, ist es uns gelungen, gute Photographien der Emissionsbanden zu erhalten, die dem isotonen Molekül $O^{16}H^2$ angehören. Die beigefügte Figur zeigt das Gebiet in der Nähe der Kante der (0,0)-Bande sowie in der Nähe der (0',1'')-Bande. Die Aufnahme A wurde durch eine 6stündige Belichtung mit Hilfe einer Entladung in gewöhnlichem Wasser mit einem Hilger E 185 Quarzspektrographen aufgenommen; die Aufnahme B ist das Ergebnis einer 2stündigen Belichtung mit

dem von Prof. LEWIS erhaltenen Wasser. Analoge Photographien haben wir auch von den Banden (1',0'') und (2',0'').

Ein Vergleich zwischen der beobachteten Isotopenverschiebung der Hauptkanten der Banden (2',0''), (1',0'') und (0',1'') und den Ergebnissen einer vorläufigen Berechnung ist in Tab. 1 zusammengefaßt. Die Berechnungen wurden für die Linien R_1 (3), R_1 (5) und R_1 (14) der drei Banden ausgeführt. Bei der Berechnung wurden die von JOHNSTON, DAWSON und WALKER¹ angegebenen Molekülkonstanten benutzt.

¹ J. amer. chem. Soc. 55, 1297 (1933).

¹ Physic. Rev. 43, 473 (1933).