

Aus dem Botanischen Institut der Universität München.

## ÜBER DEN STICKSTOFFVERLUST BEI ALTERNDEN PFLANZEN\*.

Von

HANNS FRANK.

Mit 10 Textabbildungen.

(Eingegangen am 12. Juni 1954.)

### I. Einleitung.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit Fragen des Stickstoffhaushaltes der Pflanze in Abhängigkeit vom absoluten Alter, d. h. vom Alter des betreffenden Individuums. Jedoch soll nicht die Assimilation behandelt werden, sondern nur der Lebensabschnitt, der bereits im Zeichen eines augenfälligen Zusammenbruches der inneren chemischen Organisation steht. Diese Erscheinung tritt besonders bei hapaxanthischen Einjährigen, aber auch Mehrjährigen (*Agave*) hervor; bei diesen fällt der Zusammenbruch mit dem Blühen zeitlich zusammen, so etwa bei den Getreidearten, die in dieser Hinsicht am besten untersucht sind. Nach außen hin tut sich dies in erster Linie durch ein fortschreitendes Absterben der vegetativen Teile kund. Gleichzeitig findet aber eine völlige Stilllegung der Stickstoffaufnahme durch die Wurzel statt (vgl. WILFARTH, RÖMER und WIMMER 1905). MOTHES und ENGELBRECHT (1952, S. 2) berichten sogar, daß bei *Agave* z. B. dem Absterben der Blätter, die zu Beginn der generativen Phase alle Zeichen des Eiweißmangels aufweisen, durch die Entfernung der Blüten oder der bereits vergilbenden Blätter kein Einhalt geboten werden kann. Generell gilt das aber für die Hapaxanthischen nicht, wie auch MOTHES und ENGELBRECHT betonen; so konnte bei *Arabidopsis thaliana* von uns selbst beobachtet werden, daß normal wachsende Pflanzen nach der Reife der Samen in einem Alter von 110 Tagen abstarben, solche hingegen, deren Blütensprosse laufend entfernt wurden, erst nach etwa 230 Tagen eingingen.

Nach dem bisher Gesagten wäre zu erwarten, daß der Stickstoffgehalt in der Pflanze nach Einstellung der Aufnahme N-haltiger Ionen aus dem Boden bis zum Tode konstant bliebe. Das ist aber nicht der Fall. Übereinstimmend fanden eine ganze Reihe von Autoren, daß mit dem Blühen eine rapide Abnahme des Gesamtstickstoffes einsetzte. Diese Abnahme oder Zehrung, wie sie im weiteren genannt werden soll,

\* Teil einer Dissertation der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München.

findet ihr Äquivalent *nicht* in dem Verlust an Pollen oder an Früchten, die bei Feldversuchen, um die es sich hier meist handelte, nie quantitativ geerntet werden konnten. So schrieben WILFARTH und Mitarbeiter bereits 1905 nach ihren Versuchen mit Gerste: „Es bleibt also keine andere Annahme übrig, als daß sich der N infolge noch nicht geklärter Zersetzungsprozesse aus der Pflanze verflüchtigt oder wieder in den Boden zurückgelangt.“ Gleiche Ergebnisse finden sich an den verschiedensten Stellen der Literatur, so bei BURD (1919), PENSTON (1934), VAN ITALIE (1937), LOEHWING (1938), ALLISON und Mitarbeiter (1948), MOTHES (1931, 1938 und 1952), VIRTANEN (1953), POWELL und STRANGE (1953) u. a., jedoch scheint niemand über die von WILFARTH und Mitarbeiter angedeutete Alternative hinausgekommen zu sein.

Im folgenden soll die Frage der Stickstoffzehrung betrachtet werden. An verschiedenen Objekten wurden eigene Erfahrungen darüber gesammelt, ob ein Verlust an Stickstoff eintritt. Im weiteren sollten dann die beiden aufgezeigten Möglichkeiten für die Art und Weise des Verlustes geprüft werden.

## II. Die Stickstoffzehrung im letzten Teile der Vegetationsperiode.

Die erste Frage war also die quantitative Erfassung der N-Zehrung im letzten Teile der Vegetationsperiode. Hierzu wurden zwei Versuchspflanzen ausgewählt.

1. *Arabidopsis thaliana*, die sich wegen ihrer raschen Entwicklung, ihrer anspruchslosigkeit und ihrer Kleinheit als geeignetes Objekt anbot (vgl. LAIBACH 1943). Das Samenmaterial wurde in freundlicher Weise von Herrn Prof. MOTHES aus Gatersleben geschickt.

2. *Oenothera suaveolens*, Sippe Fünfkirchen, aus Kulturen von Herrn Dr. STUBBE am hiesigen Institut, wurde in zwei Varianten (*xanthodermis*-Variante und Kurztag-Variante = k-Variante) in Töpfen gezogen und analysiert. Bei diesen Versuchen stellte sich die große Überlegenheit erblich einwandfrei definierten Materials gegenüber erbungleichem für derartige physiologische Fragestellungen heraus: die Streuung innerhalb der einzelnen Analysenreihen betrug bei *Arabidopsis* etwa 11% während sie bei dem genetisch einheitlichen Material von *Oenothera* nur etwa 5% ausmachte.

### 1. Versuchsanstellung bei *Arabidopsis thaliana*.

Die Samen von *Arabidopsis* wurden in einer Keimchale unter Glas angezogen und am 12. 12. 52 einzeln in 200 kleine Blumentöpfe von 5 cm Weite pikiert. Diese Töpfe wurden dann auf einem Tisch im Gewächshaus in einer etwa 4 cm tiefen Torfmullschicht aufgestellt. 1 m darüber hing eine Gasentladungsröhre (Typ: OSRAM 202, 40 Watt, 120 cm lang). Diese zusätzliche Lichtquelle wurde täglich durch eine Schaltuhr mit Einbruch der Dämmerung in Betrieb gesetzt und brannte bis 24 Uhr.

Am 28. 1. 53 wurden die ersten Pflanzen geerntet. Alle 5 Tage wurden 10 gleichmäßig entwickelte Exemplare ausgesucht, die Wurzeln zunächst trocken und dann naß vorsichtig von der anhaftenden Erde befreit, hierauf einzeln das Frischgewicht ermittelt und anschließend bei 90° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Solange die Pflanzen klein waren, wurden sie im ganzen verarbeitet, später in Blütenproß und Rosette mit Wurzel getrennt in zwei Arbeitsgängen gewogen und analysiert. Die Ernte wurde immer am Vormittag um 10 Uhr durchgeführt und die Trocknung sofort nach der ersten Wägung begonnen, um tageszeitliche Schwankungen auszuschalten und einen Verlust bei langsamem Absterben zu vermeiden.

## 2. Methode der Stickstoffbestimmung.

Die quantitative Bestimmung des Gesamtstickstoffs wurde zum Teil nach der Methode von KJELDAHL mit der Parnas-Wagner-Apparatur vorgenommen. Zu Beginn der Versuche aber, als die Pflanzen noch relativ klein waren und daher der Stickstoffgehalt unter dem Bereich brauchbarer Genauigkeit dieser Methode lag, wurde das Mikrodiffusionsverfahren nach CONWAY (1947) angewendet. Da sich dieses Verfahren, das sehr genau und einfach in der Ausführung ist, eigenartigerweise in Deutschland noch nicht Eingang verschafft hat, soll es hier kurz beschrieben werden. In England ist es fast ausschließlich üblich.

Der Ablauf der chemischen Vorgänge ist im Prinzip der gleiche wie bei der Wasserdampfdestillation nach KJELDAHL. Es wird in kleinen Gefäßen aufgeschlossen, bis die Schwefelsäure klar ist. Als Aufschlußgefäße wurden stets Röhrchen aus Geräteglas verwendet, die einen Durchmesser von 10 mm und eine Länge von 40—50 mm hatten. Die Veraschung geschah bei schräg stehenden Röhrchen unter Zusatz von Selenreaktionsgemisch von Merck auf dem Sandbad.

Die klare und erkaltete Schwefelsäure wird nun in das Mikrodiffusionsgefäß gespült. Die Gefäße (Abb. 1) werden von der Firma Gallenkamp in London hergestellt, sind aber jetzt schon in einigen Geschäften in Deutschland erhältlich. Es handelt sich dabei um runde Schalen aus Pyrexglas mit einer 4 mm starken Wandung, 33 mm lichter Weite und 10 mm Tiefe. In der Mitte befindet sich eine ringförmige Erhebung von 6 mm Höhe; dadurch werden zwei getrennte Räume geschaffen, ein innerer kreisförmiger und ein äußerer ringförmiger. Der obere Rand des Gefäßes ist plan geschliffen und wird mit einem einseitig mattierten, quadratischen Glasdeckel von 45 mm Kantenlänge verschlossen.

Die Handhabung der „units“, wie die Gefäße in der englischen Literatur heißen, ist denkbar einfach. Der Aufschluß wird quantitativ in das äußere Ringgefäß gespült. Sodann wird in das innere die eingestellte Säure pipettiert (0,2—0,3 ml) und der Deckel, der auf der mattierten Seite mit einer neutralen oder besser alkalisch reagierenden Kittsubstanz bestrichen ist, aufgeklebt. Von einer Seite her

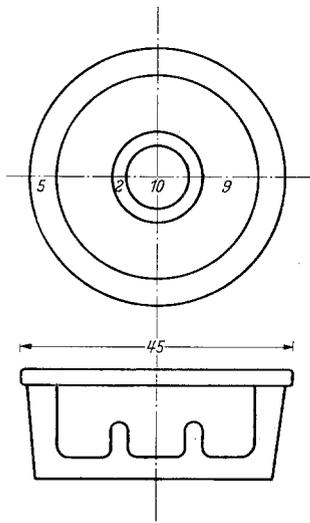


Abb. 1. Mikrodiffusionsgefäß „Conway unit“ Nr. 2. Maße in mm.  $\frac{3}{4}$  der natürlichen Größe.

schiebt man ihn nun so weit auf, daß die Pippetenspitze gerade eingeführt werden kann, und läßt 50%ige Kalilauge zufließen, bis der ganze Aufschluß basisch geworden ist. Nun wird der Deckel rasch geschlossen. Dabei ist zu beachten, daß er überall gut aufliegt und nirgends Luftblasen auf dem Rand zu sehen sind.

Die Zeit, in der das Ammoniak in die Säure zu 99,5% eindiffundiert, errechnet sich nach einer von CONWAY mitgeteilten Formel, die aber hier nicht näher abgeleitet zu werden braucht. Für die Praxis genügt es, wenn man sich an die empirisch ermittelten Werte hält. Diese ergeben, wenn  $t$  die gesuchte Diffusionszeit in Minuten und  $a$  die Tiefe der Flüssigkeit im äußeren Gefäß in Zentimetern ist:

$$t_1 = 1880 a^2 \text{ (min) bei } 20^\circ$$

$$\text{und } t_2 = 1230 a^2 \text{ (min) bei } 38^\circ.$$

Zum Austreiben des Ammoniaks kann neben der erwähnten Kalilauge auch gesättigte Kaliumcarbonatlösung oder gesättigte Kaliummetaboratlösung, *nicht* aber Natronlauge verwendet werden.

Als Kittsubstanz hat sich eine von CONWAY angegebene Mischung aus 3 Gewichtsteilen gepudertem Tragantgummi, 11 Teilen Wasser, 15 Teilen Glycerin und 8 Teilen gesättigter Kaliumcarbonatlösung als vorteilhaft erwiesen. Diese Masse ist leicht mit Wasser nach dem Gebrauch zu entfernen, ganz im Gegensatz zu den organischen oder mineralischen Fetten.

Nach Ablauf der Diffusionszeit, die wegen der großen Konzentrationsunterschiede in den beiden Flüssigkeitsräumen nicht zu weit überschritten werden sollte, wird der Deckel abgezogen und in der üblichen Weise die Säure gleich im „unit“ zurücktitriert. Da es sich um sehr kleine Mengen handelt, kann nicht mit den üblichen Büretten und Rührern gearbeitet werden.

Als Mikrobürette hat sich folgende einfache Anordnung sehr gut bewährt: Eine Injektionsspritze (1 cm<sup>3</sup>) wird auf einem Holzklötzchen abnehmbar befestigt. Dahinter wird auf der gleichen Basis eine Mikrometermeßschraube ohne den Bügel so angebracht, daß beim Zudrehen der Spindel der Kolben nach vorne gedrückt wird. Aus der Zahl der Umdrehungen, die an der Schraube abgelesen werden kann, läßt sich nach Eichung leicht das Volumen der ausgeflossenen Lauge errechnen. Eine lange, vorne rechtwinklig abgebogene Kanüle dient als Bürettenspitze, die in die Säure eintaucht, um eine Tropfenbildung zu verhindern. Die ganze Apparatur wird waagrecht an einem Stativ befestigt.

Als Rührwerk ist ein mit einem Akkumulator betriebener Trix-Motor, der über eine Schnurtransmission einen kleinen Platinpropeller bewegt, geeignet. Die „units“ werden von unten mit einer Zahnstange an den Rührer und die Bürettenspitze herangeschraubt.

Als Indicator bewährt sich eine Mischung aus 9 Teilen Methylrot und einem Teil Methylenblau in 80%igem Alkohol gut, da sein Umschlag schon bei  $p_H$  5,4 liegt. Die Wirkung des Kohlendioxydes der Luft macht sich in diesem Bereich noch nicht merklich geltend, so daß nicht in Stickstoffatmosphäre gearbeitet zu werden braucht (vgl. LUX 1949). Der Farbwechsel erfolgt sehr scharf von Purpurrot nach Grün.

Mit dieser Methode können unter Verwendung von  $n/500$  Säure Stickstoffmengen von 2  $\gamma$  noch genau erfaßt werden. Mit  $n/60$  Säure liegt der Arbeitsbereich etwa zwischen 10 und 65  $\gamma$  je Probe.

Für große Mengen Stickstoff — bei *Oenothera* — wurde eine Makrokjeldahl-Apparatur verwendet, wie sie die Firma Bender u. Hobein in München für Brauereien herstellt. Die Aufschließkolben hatten ein Fassungsvermögen von 500 ml. Als Vorlage diente  $n/10$  Schwefelsäure, die mit  $n/10$  Natronlauge unter Zugabe des oben beschriebenen Kontrastindicators zurücktitriert wurde.

## 3. Ergebnis.

Da die bisher in der Alterungsforschung übliche Art, über ein gewisses Alter des untersuchten Individuums mit dem Datum oder mit dem soundsovielten Tage der Kulturdauer zu berichten, nicht besonders glücklich erschien, wurde hier ein neuer Weg beschritten. Der zu betrachtende Zeitpunkt wurde durch einen Bruch ausgedrückt, der auf einen Blick über die Lage dieses Punktes im Gesamtleben Aufschluß gibt; er wurde „Altersquotient“ genannt. Als Beispiel sei der hier in Frage kommende Fall gewählt: Die Kultur von *Arabidopsis* dauerte vom Pikieren am 12. 12. 52 bis zum Absterben am 3. 4. 53 110 Tage. Die Abstände zwischen den einzelnen Analysen waren jeweils 5 Tage.  $110:5=22$ ; 22 wurde damit zum Nenner des Altersquotienten. Der Absterbepunkt wurde gleich 1 gesetzt, d. h. in den Zähler kam auch 22. Bei Nennung eines Ergebnisses mit dem betreffenden Quotienten zusammen wird sofort ersichtlich, wo dieser Punkt innerhalb des gesamten Lebens liegt. Aus Abb. 2 dürfte der Vorteil dieser Methode zu sehen sein. Bei relativ kurzer Lebensdauer kann man natürlich als Nenner direkt die Zahl der Tage einsetzen, ohne vorher durch den Abstand der Einzelanalysen zu dividieren.

Die Tabelle 1 gibt über die einzelnen Werte Aufschluß, die den verschiedenen Altersquotienten zugeordnet sind. Jede waagrechte Spalte zeigt die Mittelwerte von je 10 getrennt analysierten Pflanzen. — Das erste große senkrechte Feld enthält die Daten für die gesamte Pflanze, die beiden nächsten Felder eine Aufgliederung in Rosette mit Wurzel und in den Blütensproß.

In der folgenden Zusammenstellung sind die Zustände der Versuchspflanzen bei den einzelnen Daten näher charakterisiert:

9/22	Noch nicht geschößt, 13 Blätter . . . . .	28. 1. 53
10/22	Beginn des Schossens, 16 Blätter . . . . .	2. 2. 53
11/22	Höhe des Blütensprosses 5,7 cm, 18 Blätter . . . . .	7. 2. 53
13/22	Beginnende Verzweigung des Blütensprosses, Höhe: 14,3 cm; Blattzahl: 22 . . . . .	13. 2. 53
14/22	Reiche Fruchtbildung, erste Früchte beginnen zu ver- gilben. Starke Verzweigung der Blütensprosse. Höhe: 20,5 cm; 25 Blätter . . . . .	23. 2. 53
15/22	Einzelne reife Früchte. Höhe: 31 cm; Blattzahl: 27 . . . . .	27. 2. 53
16/22	Etwas mehr reife Früchte. Höhe: 33 cm; Blattzahl: 27 (Blattläuse) . . . . .	4. 3. 53
17/22	Höhe: 35 cm; Blattzahl: 32 . . . . .	9. 3. 53
18/22	Höhe: 36 cm; Blattzahl: 30 . . . . .	14. 3. 53
19/22	Beginnende Vergilbung einzelner Blätter. Höhe: 37 cm; Blattzahl: 30 . . . . .	19. 3. 53
20/22	Vergilbend. Höhe: 36 cm; Blattzahl: 24 . . . . .	24. 3. 53
21/22	Blütensprosse teilweise schon ausgetrocknet. Höhe: 39 cm; Blattzahl: 20 . . . . .	29. 3. 53
22/22	Pflanzen schon weitgehend ausgetrocknet. Fast alle Blät- ter vergilbt. Höhe: 39 cm; Blattzahl: 15 . . . . .	3. 4. 53

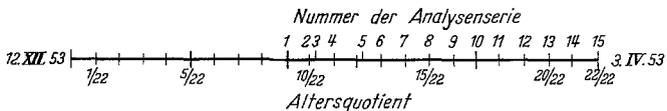


Abb. 2. Schema zur Bildung des Altersquotienten für das Beispiel von *Arabidopsis*.

Abb. 3. Frischgewicht (ausgezogene Linie) und Trockengewicht (gestrichelte Linie) bei *Arabidopsis*. Prozentualer Wassergehalt punktiert.

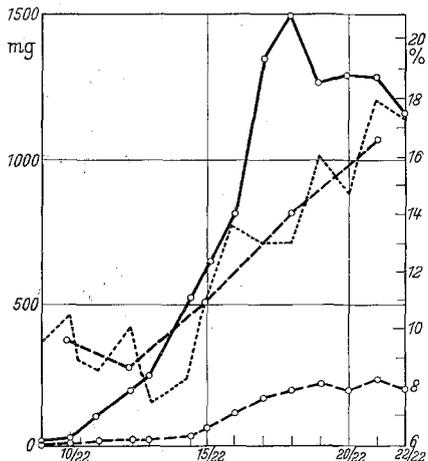


Abb. 3.

Abb. 4. Absoluter N-Gehalt bei *Arabidopsis*. Ausgezogene Linie: ganze Pflanze; gestrichelt: Blütenstreiß; punktiert: Rosette mit Wurzel.

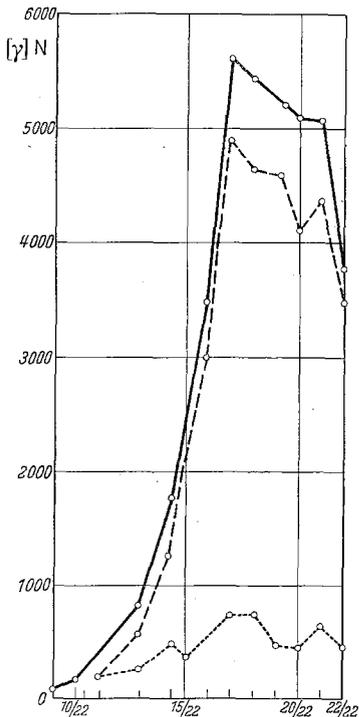


Abb. 4.

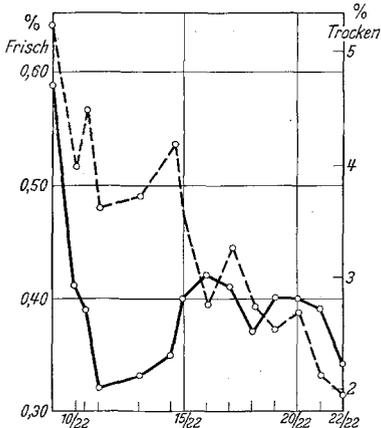


Abb. 5. Prozentualer N-Gehalt bei *Arabidopsis*, bezogen auf das Frischgewicht (ausgezogen) und bezogen auf das Trockengewicht (gestrichelt).

Die Auswertung der Einzelergebnisse gab nun folgendes Bild: Sowohl das Frischgewicht (Abb. 3) wie auch der absolute Stickstoffgehalt (Abb. 4) zeigten einen raschen Anstieg während der Wachstumsperiode, wie zu erwarten. Anders verhielt sich der prozentuale Stickstoffgehalt (Abb. 5); er zeigt mehr oder weniger deutlich absteigende Tendenz. Auch dies war nicht überraschend, da die Trockenmasse, wie aus Tabelle I ersichtlich ist, laufend zunahm und in den sich entwickelnden Samen eine große Menge von Fetten (im Embryo) und Kohlenhydraten (in den Schalen) festgelegt wurde. Gelegentliche Schwankungen (Teilmaxima und -minima) in den Kurven dürften in erster Linie auf die zur physiologischen Schwankungsbreite immer noch relativ geringe Zahl von Einzeluntersuchungen zurückzuführen sein, da kein reinerbiges Material verwendet worden war (z. B. Abb. 3 bei 19/22, Abb. 5 bei 11/22, 18/22 und 20/22, Abb. 6 bei 15/22 und 18/22). Bemerkenswert war aber der erneute Anstieg des prozentualen Stickstoffgehaltes (Abb. 5)

Tabelle I. N-Gehalt, Frisch- und Trockengewicht bei *Arabidopsis* im Verlauf des gesamten Lebens. Erläuterung im Text.

Alters-quotient	Nr.	Datum	Ganze Pflanze				Rosette und Wurzel				Blütensproß				
			Frisch mg	Trocken mg	H <sub>2</sub> O mg	H <sub>2</sub> O %	$\gamma$ N	Frisch %N	Trocken %N	$\gamma$ N	Frisch %N	Trocken %N	$\gamma$ N	Frisch %N	Trocken %N
9/22	1.	28. 1. 53	14,7	1,4	13,2	90	61,6	0,59	5,23	186,2	0,30	3,32	191,3	0,36	4,13
10/22	2.	2. 2. 53	37,1	3,9	33,2	90	156,9	0,41	4,18				564,0	0,34	3,73
	3.	4. 2. 53	64,9	5,8	58,2	91	249,8	0,39	4,54				1288,8	0,36	4,00
11/22	4.	7. 2. 53	116,2	10,1	106,1	92	368,6	0,32	3,64				2063,0	0,44	3,91
	5.	13. 2. 53	211,3	21,1	190,2	91							2996,0	0,47	3,73
13/22	6.	16. 2. 53	251,0	18,5	232,5	92	796,6	0,33	3,73				4901,0	0,43	3,64
14/22	7.	23. 2. 53	502,7	42,4	460,3	92	1760,3	0,35	4,19				4640,0	0,40	3,40
15/22	8.	27. 2. 53	612,4	68,8	543,6	88	2407,6	0,40	3,56				4616,0	0,42	2,88
16/22	9.	4. 3. 53	806,3	110,0	696,3	86	3482,0	0,42	2,76				4118,0	0,41	2,98
17/22	10.	9. 3. 53	1342,7	174,8	1167,8	87	5618,0	0,41	3,26				4368,0	0,40	2,50
18/22	11.	14. 3. 53	1486,6	194,4	1292,2	85	5380,5	0,37	2,79				3486,0	0,35	2,16
19/22	12.	19. 3. 53	1260,8	199,6	1061,2	84	5076,0	0,40	2,54				4616,0	0,42	2,88
20/22	13.	24. 3. 53	1295,0	189,0	1106,0	84	5066,0	0,40	2,70				4118,0	0,41	2,98
21/22	14.	29. 3. 53	1283,2	234,4	1048,8	81	5009,6	0,39	2,11				4368,0	0,40	2,50
22/22	15.	3. 4. 53	1152,4	198,4	954	82	3943,3	0,34	1,94				3486,0	0,35	2,16

von 11/22—14/22 bzw. 16/22. Dieser Anstieg fiel mit dem starken Wachstum zusammen. Die gleiche Erscheinung, die noch einer Aufklärung bedarf, ist, wenschon in schwächerem Maße, auch an *Cannabis* von MOTHES (1952) gefunden worden.

Der absolute Stickstoffgehalt hatte sein Maximum zu einem Zeitpunkt erreicht, der im Äußeren der Pflanze in keiner Weise gekennzeichnet war (Abb. 4 bei 17/22). Dieser Punkt eilte dem Maximum des Frischgewichtes (Abb. 3, 18/22) und dem Maximum des Trockengewichtes (Abbildung 3, 21/22) mehr oder weniger

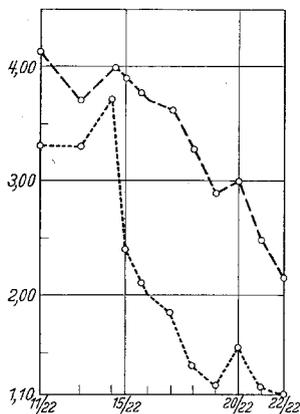


Abb. 6.

Abb. 6. Prozentualer N-Gehalt vom Blütensproß (gestrichelt) und von der Rosette mit Wurzel (punktirt), bezogen auf das Trockengewicht bei *Arabidopsis*

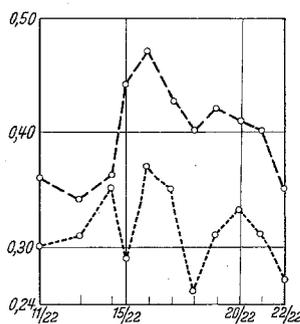


Abb. 7.

Abb. 7. Wie Abb. 6, nur in Abhängigkeit vom Frischgewicht.

weit voraus. Auch diese Erscheinung findet in der genannten Arbeit von MOTHES ihre Bestätigung.

Der prozentuale Stickstoffgehalt, aufgliedert nach Blütensproß und Rosette mit Wurzel, zeigte sehr schön das gleichsinnige Absinken nach Erreichen des Maximums bei 14/22 bzw. bei 16/22 in Abb. 6 und 7.

#### 4. Versuchsanstellung bei *Oenothera suaveolens*.

Die Pflanzen wurden in Töpfen von 12 cm Durchmesser im Gewächshaus gezogen. Sie waren im Februar pikiert worden und am 1. Juni konnten die ersten 8 Pflanzen (4 von jeder Variante) geerntet werden. Die Wurzeln wurden trocken von der anhaftenden Erde befreit, die ganzen Pflanzen gewogen, bei 110° abgetötet und dann bei 60° etwa 48 Std getrocknet. Nach einer weiteren Wägung wurde sie einzeln in konzentrierter Schwefelsäure verascht und der Gesamtstickstoff mit der beschriebenen Makrokjeldahl-Apparatur bestimmt.

Die Ernte erfolgte in monatlichen Abständen. Am 21. 11. 53 waren alle Pflanzen abgestorben. Die Kultur dauerte also 10 Monate und der Nenner des Altersquotienten ist  $10/1 = 10$ .

*Ergebnis.* Der Stickstoffschwund am Ende der Vegetationsperiode war bei den beiden Varianten von *Oenothera suaveolens* nicht so ausgeprägt wie bei *Arabidopsis*. Dies dürfte zwei Gründe haben: Erstens wurden die Pflanzen, die an sich zweijährig sind, in 1 Jahr bis zur Frucht gebracht, was natürlich den normalen Haushalt beeinträchtigen wird, und zweitens ist die letzte Analyse nicht bei oder kurz vor dem natürlichen Alterstod durchgeführt worden. Die Pflanzen standen in einem Gewächshaus und wären, unabgehärtet wie sie waren, sehr rasch zugrunde gegangen, wenn man sie im Spätherbst plötzlich ins Freie gebracht hätte.

Trotzdem ist aus Abb. 8 die abnehmende Tendenz des Stickstoffgehaltes gut ersichtlich. Die Tabelle 2 zeigt die zu der Kurve gehörigen Einzelwerte sowie die anderen Daten.

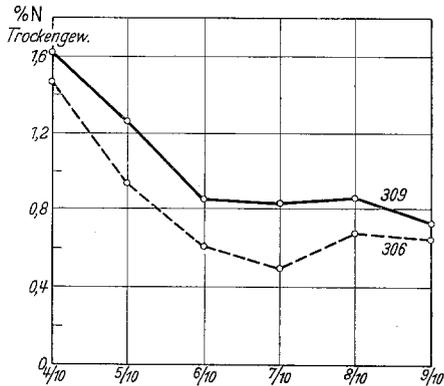


Abb. 8. Prozentualer N-Gehalt bei *Oenothera* im Verlauf von 6 Monaten, bezogen auf das Trockengewicht.

Tabelle 2. Gesamt-N bei den beiden Varianten von *Oenothera suaveolens* in monatlichen Abständen.

Altersquotient	Nr.	Datum	Frisch g	Trocken g	H <sub>2</sub> O g	H <sub>2</sub> O %	N mg	Trocken %-N	Variante
4/10	1	1. 6.	2,54	0,45	2,10	84	6,66	1,48	k-Variante (306)
5/10	2	1. 7.	16,2	3,0	13,1	81	28,3	0,94	
6/10	3	1. 8.	27,3	5,3	21,4	78	35,6	0,60	
7/10	4	1. 9.	18,7	5,3	13,4	83	26,2	0,49	
8/10	5	1. 10.	14,7	4,5	10,4	71	30,0	0,68	
9/10	6	1. 11.	17,1	5,6	11,5	67	36,8	0,65	
4/10	1	1. 6.	1,60	0,25	1,35	84	3,60	1,64	Xanthodermis-Variante (309)
5/10	2	1. 7.	12,8	2,7	10,6	83	34,4	1,27	
6/10	3	1. 8.	26,8	5,3	21,5	80	45,7	0,84	
7/10	4	1. 9.	18,1	4,5	13,2	73	38,1	0,85	
8/10	5	1. 10.	12,2	3,7	8,5	70	32,7	0,88	
9/10	6	1. 11.	11,5	3,5	8,0	70	25,0	0,71	

### 5. Diskussion.

Auf Grund der hier angeführten Ergebnisse und der eingangs erwähnten Literatur darf der Verlust von Stickstoff gegen Ende der Vegetationsperiode in einer ganzen Reihe von Fällen als gesichert gelten. Er ist nun keineswegs so klein, daß er mit irgendwelchen Fehlern gedeckt werden könnte, wie Pollenverlust oder Ausfallen einiger reifer Samen,

was auch stets durch Absammeln der Früchte weitgehend vermieden wurde; auch die abgestorbenen Blätter der Rosette sowie die nicht quantitativ zu erntenden Wurzeln reichen nicht aus, dieses Defizit zu decken, beträgt doch der Gesamtverlust bei *Arabidopsis* von 17/22 bis zum Ende 1675  $\gamma$  Stickstoff; dies sind fast 30% des Maximalwertes mit 5618  $\gamma$ . Bei *Oenothera* erreichte der Verlust im Durchschnitt für beide Varianten während der letzten 4/10 24%.

### III. Stickstoffbilanzen.

Nachdem die Frage des Gehaltes an Gesamtstickstoff bei *Arabidopsis* und *Oenothera* über den Verlauf des Lebens geprüft war, wurde die Klärung dieses Stickstoffverlustes in Angriff genommen. Es gab zwei Erklärungsmöglichkeiten, die schon eingangs angedeutet worden waren: erstens die Abwanderung N-haltiger Verbindungen in den Boden, und zweitens die Abgabe gasförmigen molekularen Stickstoffs oder anderer Verbindungen an die Luft. Möglicherweise treten auch beide Faktoren zusammen.

Die erste Möglichkeit soll in Kapitel IV behandelt werden. Für die zweite Art des Verlustes gibt es nun einen sicheren, wenn auch indirekten Beweis, nämlich den Bilanzversuch. Dieser ist aber aus verschiedenen Gründen experimentell sehr schwierig und daher auch immer mehr oder weniger problematisch. Es fehlt in der Literatur nicht an derartigen Versuchen, aber immer wieder wird auf die Mängel hingewiesen, die solchen Unterfangen anhaften. Besonders die von SCHANDERL (1947) berichteten Bilanzen, die fast alle positiv ausfielen, sind einer heftigen Kritik ausgesetzt, und sie weisen auch zweifellos eine Reihe methodischer Schwächen auf, soweit man das aus den recht knappen Angaben über die Art der Versuchsanstellung beurteilen kann. Besondere Beachtung findet der von RIPPEL-BALDES (1950) durchgeführte Versuch mit Kartoffeln, obwohl diese Pflanze, wie der Verfasser selbst schreibt, in diesem Falle nicht besonders gut geeignet ist. Das Ergebnis, das zur hier gestellten Frage keinen Beitrag liefern kann, da die Ernte vor Eintritt des normalen Alterstodes durchgeführt wurde, ist ein glattes Aufgehen der Bilanz; d. h. die gebotene Stickstoffmenge war gleich der nach Abschluß des Versuches gefundenen.

Es wurde nun der Stickstoffhaushalt bei *Arabidopsis* und bei einer Reihe von *Pilzen* überprüft und dabei alle möglichen Fehlerquellen, so gut es ging, vermieden.

#### 1. Versuchsanstellung bei *Arabidopsis*.

Als Objekt diente wieder *Arabidopsis Thaliana*. Es wurden 15 Parallelversuche und 5 Kontrollen angesetzt. Als Gefäße für die Pflanzen dienten Präparatgläser mit 6,5 cm Durchmesser und 9 cm Höhe, die

mit einer 1 cm tiefen Schicht stickstofffreien Quarzsandes gefüllt waren. Dieser Sand wurde mit 10 ml v. d. Crone-Nährlösung getränkt und in jedes Glas kamen 10 Samen zur Keimung. Der Versuch begann am 3. 2. 53 und endete am 28. 4. 53, als fast alle Pflanzen vergilbt waren und schon Samen, die im Glase ausgefallen waren, zu keimen begannen. Die Gefäße waren mit einer lose aufliegenden Glasplatte geschlossen. Aufgestellt waren sie auf einem Bord im Gewächshaus. Am 8. 3., 20. 3. und 4. 4. wurde je Glas 5 ml der gleichen Nährlösung nachgegeben. Das Gießen geschah nach Bedarf mit destilliertem Wasser, das in den gebotenen Mengen keine nachweisbaren Spuren N-haltiger Substanzen enthielt.

## 2. Methode der Analyse.

Damit keine Verluste an Stickstoff bei Anstieg des  $p_H$ -Wertes im Substrat eintreten, wurde auf die einfache Verwendung eines Ammonsalzes als N-Quelle verzichtet. Die quantitative Bestimmung von Nitrat-, Ammon- und Aminostickstoff zusammen bereitete große Schwierigkeiten. Es wurde schließlich folgendes Verfahren als brauchbarstes herausgefunden, das zwar nicht ohne Verluste an Stickstoff arbeitet, aber einen konstanten Fehler aufweist, der in Rechnung gesetzt werden kann.

Die Pflanzen wurden 2 Tage vor der Analyse nicht mehr gegossen, was ihr rasches Absterben zur Folge hatte. Soweit sie nicht schon tot waren, fielen sie keiner bakteriellen Zersetzung anheim. Der gesamte Inhalt der Gefäße wurde dann einzeln in je einen Aufschließkolben von 500 ml gespült und mit DEWARDAScher Legierung im Alkalischen über Nacht auf dem Sandbad bei etwa 80° belassen. Während dieser Zeit waren die Kolben an einen absteigenden Kühler dicht angeschlossen, der in eine Vorlage mit  $n/50$  Salzsäure eintauchte. Das Mitreißen von Laugennebel durch den entwickelten Wasserstoff wurde durch einen zwischen geschalteten Bausch stickstofffreier Glaswolle, die mit schwacher Schwefelsäure befeuchtet war, und durch eine Rücklaufkugel verhindert. (Die Vorrichtung war in verschiedenen variierten Kontrollversuchen erprobt worden.) Am nächsten Morgen wurde dann die Glaswolle in den Kolben gestoßen, das abgeschlossene System auf Siedetemperatur (Sandbad mit Drei-Stufen-Schaltung) gebracht und so lange destilliert, bis etwa die Hälfte der im Kolben befindlichen Flüssigkeit (etwa 200 ml) übergegangen war. Hierauf erfolgte die Titration mit  $n/50$  Natronlauge und dem bereits erwähnten Kontrastindicator.

Der im Kolben verbliebene Rest wurde mit 25 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt und auf Stufe 1 (etwa 80°) unter Zusatz von Selenreaktionsgemisch und etwas Perhydrol p. a. zwei Tage belassen, dann wurde unter reichlicher Zugabe von Perhydrol kurz aufgeköcht, bis die Lösung klar geworden war. Die Destillation direkt aus dem Kolben war nicht möglich, da der darin befindliche Sand zu starke Siedeverzüge verursachte. Daher kam das Diffusionsverfahren zur Anwendung (vgl. S. 321).

Als Diffusionsgefäße dienten dickwandige Glasdosen mit plan-geschliffenem Rand (Durchmesser 9 cm, Höhe 5 cm), in denen auf Glasfüßchen ein Schälchen mit der Titerflüssigkeit stand. Wie Testproben mit Ammonsulfat ergaben, war die optimale Diffusionszeit bei Zimmertemperatur 24 Std und die Diffusionsrate infolge des relativ großen toten Raumes 95,5%. Das Aufkitten des Deckels geschah

genau wie bei den „units“ (vgl. S. 322). Auch hier wurde  $n/50$  Salzsäure vorgelegt und wie oben zurücktitriert.

Die Testversuche mit Nitrat und Harnstoff bzw. Ammonsulfat hatten bei Mengen, die denen des Versuches entsprachen, und bei Zugabe des oben erwähnten Sandes ergeben, daß bei dieser Art des Analysenganges ein konstanter N-Verlust von 12% eintrat. Dies ist so zu erklären, daß bei der Reduktion des Nitrates zum Ammoniak als Zwischenglied Nitrit entsteht, das mit dem schon oder noch vorhandenen Ammoniak auch im alkalischen Medium nach VAN SLYKE reagiert; dabei entsteht molekularer Stickstoff, der nicht mehr erfaßt werden kann.

### 3. Ergebnis.

Die Tabelle 3 gibt zunächst eine Übersicht über den Zustand der Pflanzen in den einzelnen Gläsern, über die Einwaage an Stickstoff, der sich aus dem Kaliumnitrat der Nährlösung, dem Molybdännitrat der A-Z-Lösung und dem Stickstoffgehalt der Samen zusammensetzt; 10 Samen enthielten 25  $\gamma$  N. Die dritte Spalte gibt die gefundenen Werte nach der Reduktion und nach der Diffusion. Die Menge des bei der Reduktion erfaßten Stickstoffs zeigt deutlich, daß bei diesem Vorgang bereits ein großer Teil des organisch festgelegten N im Alkalischen bei Wärme ausgetrieben wird. Die nächste Spalte gibt die Summe des Gesamtstickstoffes an, und die sechste schließlich die Differenz aus Einwaage und Gefundenem, also den Verlust. Zuletzt wird noch der prozentuale N-Verlust angeführt. Der Gesamtverlust ist also im Mittel 26%.

Tabelle 3. N-Bilanzen bei *Arabidopsis*.

Zustand	Einwaage ( $\gamma$ N)	Gefunden ( $\gamma$ N)			Differenz (Verlust) ( $\gamma$ N)	Prozent der Einwaage	Bemerkung	
		Reduktion	Diffusion	Summe				
Abgestorben . .	3463	—	—	—	—	—	Glas gesprungen	
Absterbend . .	3463	1560	840	2400	1063	30		
Abgestorben . .	3463	—	—	—	—	—	zerbrochen	
Abgestorben . .	3463	1712	816	2528	935	27		
Abgestorben . .	3463	1632	996	2628	838	24,2		
Abgestorben . .	3463	1871	712	2583	880	25,4		
Abgestorben . .	3463	1780	719	2499	964	27,8		
Absterbend . .	3463	1812	947	2759	804	23,2		
Absterbend . .	3463	1639	792	2431	1032	29,8		
Abgestorben . .	3463	1750	1061	2811	752	22,7		
Absterbend . .	3463	1838	754	2592	871	25,1		
Absterbend . .	3463	1704	938	2642	821	23,7		
Absterbend . .	3463	1593	944	2537	926	26,8		
Abgestorben . .	3463	1822	834	2656	807	23,3		
Absterbend . .	3463	1738	809	2547	916	26,2		
$\bar{M}$ (n = 13) . .	3463			2559	904	26		

Die Tabelle 4 ergibt eine Übersicht über die 5 Kontrollproben ohne Pflanzen. Bei ihnen wurde ein Verlust von 12% gefunden, was genau mit dem in den Vorversuchen ermittelten konstanten Fehler übereinstimmt.

Tabelle 4. *Ergebnisse der N-Analysen bei den Blindproben zu den N-Bilanzen bei Arabidopsis.*

Nr.	Einwaage ( $\gamma$ N)	Gefunden ( $\gamma$ N)			Differenz (Verlust) ( $\gamma$ N)	Prozent der Einwaage
		Reduktion	Diffusion	Summe		
16	1385	1105	111	1216	169	12,2
17	1385	1110	110	1220	165	11,9
18	1385	1090	121	1211	174	12,6
19	1385	1103	120	1223	162	11,7
20	1385	1099	120	1219	166	12,0
$\bar{M}$ (n = 5)	1385			1218	167	12

Der Verlust berechnet sich also folgendermaßen:

Einwaage: 3463  $\gamma$ N = 100 %

Gefunden: 2559  $\gamma$ N = 74 %

Differenz: 904  $\gamma$ N = 26 %

Konstanter N-Verlust = 12 %

Tatsächlicher N-Verlust = 14% = 485  $\gamma$  N.

#### 4. Bilanzen bei Pilzen.

Bei einer Reihe von *Pilzen* konnte auf diese Weise auch ein Verlust von Stickstoff an die Luft festgestellt werden.

Eine Nährlösung aus Malzextrakt (Cenovis) und Pepton nach ZYCHA (1935) wurde steril in kleine Reagenzgläser oder in 50-ml-Erlenmeyerkolben abgefüllt. Die Röhrechen enthielten 0,5 oder 1 ml, die Kolben 10 ml Lösung. Sie wurden dann von Reinkulturen her beimpft, und nach einer gewissen Zeit wurde der gesamte Inhalt gleich in den Kulturgefäßen auf dem Sandbad naß verascht. Die Destillation erfolgte in der Parnas-Wagner-Apparatur. Zum Vergleich wurden immer etwa 10 Gefäße mit der gleichen Substratmenge als Blindproben verarbeitet, die gleichlange bei 27° in derselben Klimakammer gestanden waren. Der Einzelversuch wurde immer in 10—15 Parallelproben durchgeführt. Während der ganzen Kulturdauer standen die Gefäße, die immer mit Zellstoffpfropfen verschlossen waren, unter Glasglocken, um ein zu starkes Verdunsten zu verhindern.

*Bemerkung.* Bei diesen Versuchen konnte häufig eine starke Schwankung in der Wachstums- und Keimungsgeschwindigkeit beobachtet werden. Bei schlechtem, regnerischen Wetter wuchsen die Pilze im allgemeinen besser als bei Hochdrucklage, wie auch von anderer Seite festgestellt wurde. (Vgl. z. B. RIPPEL-BALDES 1952, S. 142 mit Hinweis auf BORTELS 1949.)

Jeder der 16 untersuchten Stämme wurde mindestens 10mal geprüft; 8 zeigten einen deutlichen N-Verlust. Die Kulturzeiten waren recht verschieden: von 6 Tagen als Minimum bis zu 34 Tagen als Maximum. Bei Wiederholung des Versuchs am gleichen Stamm ergaben sich stets etwas andere Werte, aber die Größenordnung des Ergebnisses war immer

die gleiche. Es kam nicht vor, daß ein Pilz einmal N-Verlust zeigte, das andere Mal dagegen nicht. Aus diesen Verschiedenheiten konnte eine physiologische Schwankungsbreite von 6% ermittelt werden; ein Gewinn von 4—7%, wie er bei *Helminthosporium sp.*, *Verticillium sp.* und *Rhizopus nigricans* gefunden wurde, kann also nicht als reell gelten. Die Tabelle 5 gibt eine Übersicht über das Verhalten der untersuchten Pilze.

### 5. Diskussion.

Obwohl das Ergebnis der Bilanzen bei *Arabidopsis* den Stickstoffverlust an die Luft bestätigt, kann man sich doch nicht dem Gefühl verschließen, daß damit noch kein eindeutiger Beweis erbracht sei; die Methode ist nicht gerade ideal und alles andere als elegant. Daher wurde auf ihre Durchführung die höchstmögliche Sorgfalt verwandt. Eine Überbrückung dieser Schwierigkeiten ergäbe sich leicht durch die Anwendung hochprozentiger  $^{15}\text{N}$ -haltiger Gemische von Kaliumnitrat, wie sie von EASTMAN-KODAK in Rochester angeboten werden. Leider waren solche mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht zugänglich.

Dagegen stand ein Ammonchlorid zur Verfügung, das zu 4%  $^{15}\text{N}$  enthielt<sup>1</sup>. Die Menge war aber so gering, daß Versuche an höheren Pflanzen damit nicht durchgeführt werden konnten. Bei Pilzen zeigte sich damit kein Effekt. Es wurden die Arten untersucht, die den stärksten Verlust bei Ernährung mit Pepton gehabt hatten (*Absidia* 274, *Chaetomium sp.* und *Alternaria sp.*; vgl. Tabelle 5). Zur Kontrolle wurden dann auch noch *Actinomucor repens* und *Mucor hiemalis* + und — geprüft, aber auch diese hatten bei Darbietung von Ammonchlorid statt Pepton ganz glatt aufgehende Bilanzen. Damit würde also eine Beobachtung von ALLISON und Mitarbeiter (1948 b) bestätigt, daß der Stickstoffverlust von der Art des gebotenen Substrates abhängig sei.

Wie in dem Kapitel über die Methodik der N-Bestimmung bei den Bilanzen an *Arabidopsis* schon erwähnt, ist das angewandte Verfahren nicht sehr schön. Ein anderes ist aber nicht bekannt. Dennoch kann man das Ergebnis, wenn auch mit einem gewissen Vorbehalt, als einen Beleg für den Verlust von gasförmigen, stickstoffhaltigen Substanzen im Verlaufe des Lebens werten. Freilich muß auch hier wieder die Einschränkung gemacht werden, daß von höheren Pflanzen nur eine Art untersucht wurde. Es sei aber in diesem Zusammenhang an die Vorstellung VIRTANENS erinnert, die er im Herbst 1953 bei einem Vortrag in München entwickelte. Er forderte als — allerdings bis jetzt noch

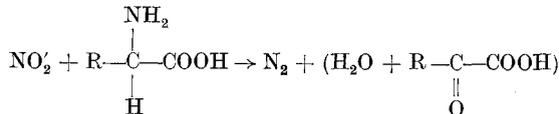
<sup>1</sup> Von Herrn Doz. Dr. BECKER am Physikalischen Institut der Universität Marburg in freundlicher Weise kostenlos überlassen.

Tabelle 5. Zusammenstellung der Pilzstämme, bei welchen N-Bilanzen durchgeführt wurden, mit dem Ergebnis in Prozenten der Einwaage an Stickstoff.

	Kultur- dauer Tage	Zahl der Versuche	Bilanzergebnis
<i>1. Fungi imperfecti:</i>			
Fusarium sp. . . . .	9	15	15,8% Verlust
Helminthosporium sp. . . . .	15	10	4 % Gewinn
Alternaria sp. . . . .	34	20	22 % Verlust
Botrytis cf. cinerea . . . . .	9	10	8,7% Verlust
Verticillium sp. . . . .	19	10	7,3% Gewinn
<i>2. Mucorineen:</i>			
Rhizopus nigricans . . . . .	15	12	4,4% Gewinn
Actinomucor repens. . . . .	9	20	22 % Verlust
Mucor racemosus . . . . .	12	10	12 % Verlust
Phycomyces Blakesleeanus . . . . .	12	10	kein Verlust
Absidia 274 * . . . . .	11	30	26 % Verlust
<i>3. Ascomyceten:</i>			
Chaetomium sp. . . . .	9	24	23 % Verlust
Aspergillus niger . . . . .	11	14	9 % Verlust
Aspergillus sp. (grün) . . . . .	9	16	11,5% Verlust
Penicillium sp. . . . .	13	15	3,8% Verlust
Penicillium cf. notatum . . . . .	13	10	kein Verlust
Torula Hefe (rosa) . . . . .	6	10	kein Verlust

\* Von Herrn MUSKAT am hiesigen Institut aus einer tunesischen Erdprobe isolierte Art.

nicht faßbares — Zwischenglied beim Abbau des Eiweißes Nitrit und formulierte den Vorgang folgendermaßen:



Das entspricht wieder weitgehend der Reaktion nach VAN SLYKE. Energetisch betrachtet, handelt es sich dabei um einen ausgesprochen exothermen Vorgang, was seinen Ablauf in der vergilbenden Pflanze gut verständlich machen würde, also in einem Zustand, in dem die enzymatischen Systeme schon weitgehend gestört zu sein scheinen.

Die Verluste bei den Pilzen gehen sicher auf andere Reaktionen zurück, da sie schon nach so kurzen Kulturzeiten wie 9 Tagen feststellbar waren. Sie scheinen mit dem normalen N-Stoffwechsel in Zusammenhang zu stehen und nicht erst in der letzten Phase des Lebens aufzutreten. Jedenfalls zeigen auch sie die prinzipielle Möglichkeit der Abgabe gasförmiger N-haltiger Verbindungen an. Überprüft wurde an *Aspergillus niger* und an *Alternaria sp.* die Möglichkeit einer Ammoniakabscheidung. Die Pilze wurden hierzu in die großen Diffusionsgefäße (vgl. S. 329) geimpft, die mit Malz-Pepton-Agar ausgegossen waren. Die vorgelegte n/100 Schwefelsäure zeigte gegenüber ihrer ursprünglichen

Acidität nach 12 Tagen keine Veränderung. Dies beweist, daß kein Ammoniak abgeschieden wurde; andere Arten sind nicht auf diese Weise geprüft worden. Also ist auch anzunehmen, daß es sich nicht um einen von Amidase gesteuerten Prozeß handelt, der die fragliche Substanz in Freiheit setzt (vgl. MYRBÄCK 1953, S. 82). Auch die bei Pilzen häufig auftretenden Geruchsstoffe scheinen, nach Angaben von BLINC (1940), dafür nicht verantwortlich zu sein, denn es handelt sich in den untersuchten Fällen um rein aromatische Ester.

Eine gewisse Bestätigung des von VIRTANEN geforderten Nitrites scheint in dem parasitischen Pilz *Blakeslea trispora* gegeben zu sein. Nach Angaben von LILLY und BARNETT (1951, S. 101) ist er nämlich in der Lage, Nitrit zu verwerten. Er kommt aber nur als Schwächeparasit in tropischen Gebieten vor. ZYCHA schreibt, daß er auf vergilbenden Tabakblättern und auf welkendem Unkraut lebt. Man könnte also von der physiologischen Eigenart dieses Pilzes und seinem Vorkommen indirekt auf das Vorhandensein von Nitrit in diesen absterbenden Organen schließen.

In diesem Zusammenhang sei auch noch auf eine Arbeit von POWELL und STRANGE (1953) hingewiesen. Die Verfasser fanden bei *Bact. megathericum* und *Bact. subtilis* während der Keimung der Sporen einen N-Verlust, der durch die Abgabe von Aminosäuren, Peptiden und Hexosamin, welches zu einem nicht dialysierbaren Peptid gehörte sowie Dipicolinsäure verursacht wird.

#### IV. Stickstoffverluste durch die Wurzel.

Die eingangs schon erwähnte Möglichkeit eines Verlustes von N-haltigen Substanzen wurde an Mais (Sorte „Badischer Landmais“) und Spargel experimentell überprüft. Hierzu mußte eine Kulturmöglichkeit gefunden werden, die es erlaubte, die Pflanzen ohne Schädigung zu ziehen und zugleich den Wurzelbereich steril zu halten. Zu diesem Zwecke wurden zuerst die ganzen Pflanzen in Flaschen kultiviert. Die hohe Luftfeuchtigkeit verhinderte aber ein normales Wachstum. *Iberis amara* kam auf Sand, der mit v. d. Crone-Nährlösung getränkt war, in 3-Liter-Flaschen aus weißem Industrieglas bis zur Blüte; die Pflanzen zeigten aber einen extrem gestreckten Wuchs und bildeten kaum Blätter aus, so daß hier sicherlich keine brauchbaren Ergebnisse zu erwarten gewesen wären. Als recht erfolgreich erwies sich hingegen die „halbst sterile“ Kultur. Die Methode wurde in Anlehnung an SCHROPP (1951) entwickelt.

Die Samen von Mais und Spargel wurden mit konzentriertem Bromwasser 45 min lang bei Zimmertemperatur sterilisiert und dann in Petri-Schalen auf Agar ausgelegt. Mais war nach 5—7 Tagen so weit

gekeimt, daß er in Wasserkultur genommen werden konnte, Spargel brauchte hierzu etwa 3 Wochen.

500-ml-Erlenmeyer-Kolben wurden oben durch eine Gummimanschette (Fahrradschlauch!) mit einem kleinen Bakelitbecher (Gefäße von Reico-Fleischextrakt) verbunden (Abb. 9). Die Becher hatten am Boden eine Bohrung von 6 mm Durchmesser. Die Kolben wurden mit v. d. Crone-Nährlösung gefüllt und nach Aufsetzen der Becher 40 min im Autoklaven sterilisiert. Von dort kamen sie in einen Impfkasten. Nach dem Abkühlen konnten die Keimlinge mit der Wurzel durch das Loch in die Nährlösung gesteckt und der Becher gut bis zur Hälfte mit sterilem Quarzsand gefüllt werden. So blieben sie einige Tage stehen, bis die Pflanzen einige Zentimeter über den Sand herausgewachsen waren. Nun wurde der die Pflanze stützende und haltende Sand sorgfältig mit Kataklymbolus abgedeckt und die Kolben, mit Papphülsen verdunkelt, im Gewächshaus aufgestellt.

Die Kulturdauer richtete sich nach dem Verbrauch der Nährlösung. Beim Mais belief sie sich auf etwa  $2\frac{1}{2}$  Monate, während die Spargelpflanzen 5 Monate auf der Lösung bleiben konnten. War der Boden der Kolben nur mehr einige Zentimeter hoch mit Nährlösung bedeckt, so wurde die Pflanze herausgenommen und die Lösung bei etwa  $40^\circ$  im Vakuum auf 2 ml eingengt. — Insgesamt wurden so die Wurzelabscheidungen von 7 Maispflanzen und von 6 Spargelpflanzen erhalten. Angelegt waren jeweils 10 Gefäße; der Rest war infiziert worden.

Die eingengten Lösungen wurden nur auf Aminosäuren hin untersucht, da diese wohl den Hauptanteil der N-haltigen Abscheidungen ausmachen dürften. Die Trennung der einzelnen Säuren geschah nach der papierchromatographischen Methode (CRAMER 1948).

Als Papier wurde Schleicher & Schüll 2043 b verwendet. Die Lösungsmittel, die immer nebeneinander gebraucht wurden, waren Isopropylalkohol-Eisessig-Wasser 70:20:10,  $\alpha$ -Picolin-Wasser-Ammoniak 70:28:2 mit Ammoniak in der Gasphase und Phenol wassergesättigt mit KCN in der Gasphase. Nach dem Trocknen der Bogen wurde eine Lösung von 20 mg Ninhydrin in 100 ml Isopropanol, 10 ml Wasser und 10 Tropfen Eisessig beidseitig aufgesprüht und 5 min bei  $110^\circ$  im Trockenschrank „entwickelt“. Mit der Nährlösung wurden stets auch Testsubstanzen aufgetragen, die zum Vergleich dienten. Es wurde nur eindimensional gearbeitet.

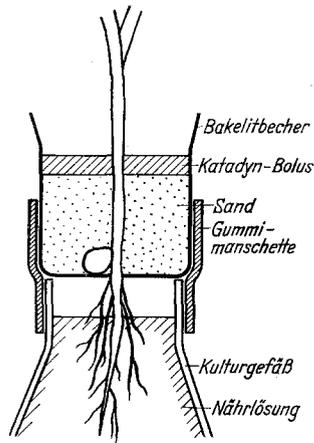


Abb. 9 Schematische Darstellung des Verschlusses eines Kulturgefäßes für die halbesterile Wasserkultur.

*Ergebnis.* Nach der oben besprochenen Behandlung der Kulturlösung ergab sich folgendes: Asparagin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glykokoll, Serin, Valin,  $\gamma$ -Aminobuttersäure und Prolin fanden sich bei Asparagus. Bei Zea konnten Asparagin, Glutamin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin, Serin, Valin und Leucin nachgewiesen werden.

Eine quantitative Auswertung wurde nicht vorgenommen, auch nicht approximativ, da die Intensität der Flecken infolge der verschiedenen Kulturdauer und der Unmöglichkeit einer genauen Bestimmung des Endvolumens nach dem Einengen nicht vergleichbar waren.

#### Diskussion.

KANDLER (1951) konnte zeigen, daß *in vitro* kultivierte Maiswurzeln Aminosäuren in das Nährsubstrat abscheiden. Er fand die gleichen

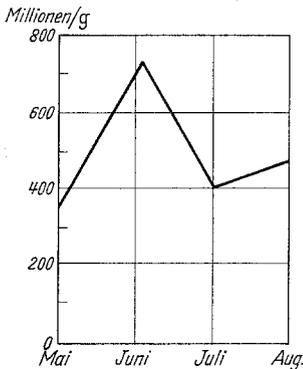


Abb. 10. Gesamtkeimzahlen in Millionen je Gramm Erde der Rhizosphäre als Funktion der Zeit. Nach GRÄF (1930), vereinfacht.

Komponenten, wie sie auch von uns in dem vorher geschilderten Versuch sichtbar gemacht werden konnten. Auch VIRTANEN (1936) stellte bereits solche Verluste durch die Wurzeln intakter Pflanzen fest. GRÄF (1930), KATZNELSON (1948) und RIPPELBALDES (1952) weisen auf die Bedeutung der Ausscheidungen von Aminosäuren, Biotin und Aneurin durch die Wurzel für die Bodenbakterien hin. GRÄF fand bei Untersuchungen über die quantitative Verteilung der Rhizosphärenorganismen einen starken Anstieg der Zahl — in erster Linie Bakterien — während der Wachstumsperiode der höheren Pflanzen. In der Reifezeit, also mit Absinken des Gesamtstickstoffgehaltes (vgl. Tab. 1), ging

auch die Bakterienzahl wieder etwas zurück, um in der Zeit nach der Ernte erneut leicht anzusteigen. Die Abb. 10 ist eine vereinfachte Wiedergabe der Kurve, die GRÄF über die Keimzahlen an der Wurzeloberfläche während der gesamten Vegetationsperiode brachte. Als Versuchspflanzen verwandte sie Pferdebohnen, Klee, Weizen, Sommergerste, Rüben, Roggen und Wintergerste. Vergleicht man damit Abb. 4 und 5, so zeigt sich, daß die Maxima der Kurven etwa zeitlich zusammenfallen. Die Gründe für dieses Verhalten sind nun wahrscheinlich in der verschiedenen Intensität der Aminosäureverluste durch die Wurzel während der einzelnen Lebensabschnitte zu suchen. Freilich werden nicht nur Aminosäuren und andere stickstoffhaltigen Substanzen beteiligt sein, sondern auch Zucker und andere Assimilate. Jedenfalls wird es sich im wesentlichen um solche Körper handeln, die mehr oder weniger spezifisch

als Nährstoffe für die Bakterien der Rhizosphäre in Frage kommen. Mit der hohen Innenkonzentration dieser Stoffe ist erklärlicherweise auch ein relativ großer Verlust auf dem Wege der Diffusion verbunden. Je mehr Nährstoffe aber zu Verfügung stehen, desto höher wird die Keimzahl dort sein, wo diese Stoffe in den Boden gelangen, also an der Oberfläche der Wurzeln. Es dürfte daher die Auslegung der erhöhten Keimzahl in dem oben wiedergegebenen Zeitraum, die WOJTKIEWICZ (1915) (s. GRÄF 1930) gab, nicht richtig sein. Er sagt, daß das Maximum auf das Fehlen der bakterienfressenden Protozoen, die durch die tiefen Temperaturen des Winters vernichtet oder geschädigt sind, zurückzuführen sei. Im Herbst seien diese Organismen wieder vorhanden und könnten das Minimum verursachen. Es ist jedoch nicht wahrscheinlich, daß sich Bakterien bei ihrer unter guten Ernährungsbedingungen gewaltigen Vermehrungsrate so stark von Protozoen dezimieren lassen. Ausschlaggebend für ihre Zahl scheint doch in erster Linie die zur Verfügung stehende Nährstoffmenge zu sein. — Der erneute Anstieg nach der Ernte wird eine Folge des beginnenden Zerfalls der Wurzeln sein.

RIPPEL-BALDES (1952, S. 315) vertritt ebenfalls die Ansicht, daß die „Sekretion“ von Aneurin, Biotin und Aminosäuren durch die Wurzeln einen direkten Einfluß auf die Mikroflora des Wurzelbereiches hat (Literatur hierüber ebenda). In einer Fußnote weist der Verfasser jedoch darauf hin, daß STOLP im Substrat steriler Pflanzenkulturen weder Aneurin noch Aminosäuren nachweisen konnte. Wenn auch die Kulturen von isolierten Wurzeln, wie sie KANDLER durchführte, noch keine Gewähr für den Verlust von Aminosäuren an intakten Pflanzen gibt, so sind doch die oben beschriebenen Versuche zumindest bei Mais und Spargel und die Angaben von VIRTANEN (1936) bei Leguminosen ein Beweis dafür.

## V. Abschlußdiskussion.

Für eine ganze Reihe von Pflanzen ist ein Verlust an gasförmigem Stickstoff schon gesichert, wie verschiedene angelsächsische Arbeiten beweisen, so von DAVIDSON (1923), PEARSALL und BILLMORIA (1937). Die Autoren bedienten sich jedoch auch des Verfahrens der Stickstoffbilanzen. Welche Fehler die Versuchsmethodik mit sich bringt, ist nicht genau zu entscheiden, aber jedenfalls liegt der Fehler größenordnungsmäßig unter dem Gesamtschwund an Stickstoff. Da die Blindversuche hier nicht mit „biologischem N“ ausgeführt werden können, ist auf die angewandte Methode kein sicherer Verlaß, und es wird der Zukunft überlassen bleiben, eine Arbeitsweise zu finden, die genauer ist und sich für Reihenuntersuchungen besser eignet.

Nun können die Bilanzen, wie schon angedeutet, nur als indirekter Beweis einer Abgabe von Stickstoff an die Luft angesehen werden. Da aus den auf S. 332 angegebenen Gründen der direkte Beweis nicht erbracht werden konnte, muß die endgültige Klärung dieser Frage noch offen gelassen werden. Es sei aber auf Arbeiten von ALLISON und Mitarbeitern (1948a und b) hingewiesen, die an verschiedenen Objekten unter Verwendung von  $^{15}\text{N}$  als Indicator diese Möglichkeit prinzipiell klären konnten.

Im speziellen Falle der Cruciferen mag auch an Verluste durch die Senföle gedacht werden; für *Arabidopsis* kommt das aber nicht in Betracht, da sich hier keine solchen Isothiocyansäureester finden (vgl. KLEIN 1932, S. 1093). Auf die Riechstoffe bei Pilzen wurde schon auf S. 334 eingegangen.

Bei der Prüfung des Stickstoffverlustes aus der Wurzel waren keine solchen Fehler zu befürchten. Die Möglichkeit, daß nicht die von der Wurzel selber abgegebenen Aminosäuren identifiziert würden, sondern nur die von den sich loslösenden Zellen der Wurzelhaube stammenden, wurde durch Filtrieren der Nährlösungen vor dem Einengen vermieden.

Mit Absicht wurde der Ausdruck „Ausscheidungen“ der Wurzel nicht gebraucht, denn es handelt sich dabei sicher nicht um eine aktive Abscheidung, sondern eher um einen Verlust durch Auslaugung, wie auch VIRTANEN (1936, S. 880) und KANDLER (1951, S. 445) betonen. Wird außerhalb der Wurzel die Konzentration der Stoffe, die herausdiffundieren können, immer wieder herabgesetzt, wie es im Boden durch die Rhizosphärenorganismen geschieht, oder wie es VIRTANEN durch Zugabe von Kaolin zur Nährlösung erreichte, dann nehmen die Verluste beträchtliche Werte an. Ist das nicht der Fall, so bildet sich ein Gleichgewicht aus, und die Gesamtmengen sind recht gering, wie in den mitgeteilten Versuchen bei Mais und Spargel.

Nach dem hier Berichteten kann man als gesichert ansehen, daß, zumindest bei den untersuchten Pflanzen, ein Verlust an Stickstoff gegen Ende der Vegetationsperiode eintritt, und daß sowohl die Wurzel einer N-Zehrung unterliegt, als auch gasförmige Stoffe, die Stickstoff enthalten, durch Exhalation vor allem an den Blättern verlorengehen.

Die Lehrmeinung, wonach die Pflanze mit ihrem Stickstoff sehr haushälterisch umgeht, soll durch diese Mitteilung keineswegs angetastet werden, handelt es sich doch bei diesen Verlusten sicherlich stets um passive Exkretion, die von der Pflanze nur nicht verhindert werden kann. Die stoffwechselphysiologische und wirtschaftliche Bedeutung dieser Erscheinung darf jedoch nicht übersehen werden.

### Zusammenfassung.

1. An *Arabidopsis thaliana* und an zwei Varietäten von *Oenothera suaveolens* wurde im letzten Teile der Vegetationsperiode ein Schwund

an Gesamtstickstoff festgestellt. Er betrug bei *Arabidopsis* 30% des Maximalwertes, der am 85. Tag der 110 Tage dauernden Kultur erreicht worden war, und 24% bei *Oenothera*, die ihren Maximalwert im 6. Monat von 10 Monaten insgesamt hatte.

2. Die auf das Trockengewicht bezogenen Relativwerte an Gesamtstickstoff nahmen bei *Arabidopsis* von 5,32—1,94% und bei *Oenothera* von 1,56—0,68% ab.

3. Bilanzversuche an *Arabidopsis* ergaben nach Kultur bis zum natürlichen Absterben einen Verlust von 14% Stickstoff.

4. Bilanzversuche an niederen Pilzen zeigten nach unterschiedlichen Kulturzeiten bei 9 von 16 Arten einen merklichen N-Verlust (bis zu 23%).

5. An halbsterilen Wasserkulturen mit Mais und mit Spargel konnte eine Auslaugung von Aminosäuren aus den Wurzeln beobachtet werden, die mit Hilfe der Papierchromatographie identifiziert wurde.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. RENNER, möchte ich für die Förderung meiner Arbeit meinen aufrichtigsten Dank sagen.

#### Literatur.

- ALLISON, F. E., K. S. LOVE, L. A. PINCK and V. L. GADDY: Gaseous losses of nitrogen from green plants. I. Studies with *Chlorella* and *Lemna*. *Plant Physiol.* **23**, 496—504 (1948a). — ALLISON, F. E., LUANN DE TAR STERLING: Gaseous losses of nitrogen from green plants. II. Studies with excised leaves in nutrient media. *Plant Physiol.* **23**, 603—608 (1948b). — BLINC, M.: Riechstoffbildung bei Schimmelpilzen. *Arch. Mikrobiol.* **11**, 391—405 (1940). — BURD, I. S.: Rate of absorption of soil constituents at successive stage of plant growth. *J. Agricult. Res.* **18**, 51 (1919). — CONWAY, E. I.: Microdiffusion analysis an volumetric error. London 1947. — CRAMER, F.: Papierchromatographie. Weinheim 1952. — DAVIDSON: Is gaseous N a product of seedling metabolism? *Bot. Gaz.* **76**, 95—101 (1923). — GRÄF, G.: Über den Einfluß des Pflanzenwachstums auf die Bakterien im Wurzelbereich. *Zbl. Bakter. II* **82**, 44—96 (1930). — ITALLIE, TH. B.: Het verloop van de opname van stikstof, fosforzuur en kali door verschillende gewassen te velde. *Versl. landbouwkund. Onderz. A* **43** (2) (1937). — KANDLER, O.: Papierchromatographischer Nachweis der Aminosäureausscheidung in vitro kultivierter Maiswurzeln. *Z. Naturforsch.* **6b**, 437—475 (1951). — KATZNELSON, LOCHHEAD and TIMONIN: Soil microorganisms and the rhizosphere. *Bot. Review* **14**, 543—572 (1948). — KLEIN, G.: Handbuch der Pflanzenanalyse, Bd. 3, Teil 2, II. Hälfte. Wien 1932. — LAIBACH, F.: Zur Ätiologie der Blütenbildung. *Naturwiss.* **31**, 246 (1943). — LILLY, V. G., and H. L. BARNETT: *Physiology of the Fungi*. New York 1951. — LOEWING, W. F.: Physiological aspects of sex in Angiosperms. *Bot. Review* **4**, 581 (1938). — LUX, H.: Praktikum der quantitativen anorganischen Analyse, 2. Aufl. München 1949. — MOTHES, K.: Zur Kenntnis des N-Stoffwechsels höherer Pflanzen. 3. Beitrag. *Planta (Berl.)* **12**, 686—731 (1931). — Stickstoffbilanz und Stickstoffverlust. *Planta (Berl.)* **28**, 599—610 (1938). — MOTHES, K., u. L. ENGELBRECHT: Über geschlechtsverschiedenen Stoffwechsel zweihäusiger Pflanzen. *Flora (Jena)* **139**, 1—27 (1952). — MYRBÄCK, K.: Enzymatische Katalyse. Berlin 1953. — PEARSALL, W. H., and BILLIMORIA: Losses of N from green plants. *Biochemic. J.* **31**, 95—101, 1743—1750 (1937). — PENSTON, N. L.: Return

of mineral elements to the soil by plants. *Nature* (London) **134**, 268—269 (1934). — POWELL, I. F., and R. E. STRANGE: Biochemical changes occurring during the germination of bacterial spores. *Biochem. J.* **54**, 205—209 (1953). — RIPPEL-BALDES, A.: Über die angebliche Stickstoffbindung durch Nichtleguminosen. *Arch. Mikrobiol.* **14**, 334—339 (1950). — *Grundriß der Mikrobiologie*, 2. Aufl. Berlin 1952. — SCHANDERL, H.: *Botanische Bakteriologie und Stickstoffhaushalt der Pflanzen auf neuer Grundlage*. Stuttgart 1947. — SCHROPP, W.: *Die Methodik der Wasserkultur höherer Pflanzen*. Radebeul 1951. — STUBBE, W.: Genetische und zytologische Untersuchungen an verschiedenen Sippen von *Oenothera suaveolens*. *Z. Vererbungslehre* **83**, 198 (1952). — VIRTANEN, A. I.: Nature of the excretion of nitrogen compounds from legume noduls. *Nature* (Lond.) **2**, 880—881 (1936). — Assimilation of molecular and combined nitrogen by microorganisms. *Symp. Metabol. Microb. Inst. Superiore di Sanità*. Roma 1953. — WILFARTH, H., H. RÖMER u. G. WIMMER: Über die Nährstoffaufnahme der Pflanzen in verschiedenen Zeiten ihres Wachstums. *Landwirtsch. Versuchsstat.* **63**, 1 (1905). — ZYCHA, H.: *Kryptogamenflora der Mark Brandenburg. Pilze II Mucorineae*. Leipzig 1935.

Dr. HANNS FRANK, München 38, Botan. Institut der Universität,  
Menzinger Str. 67.