

EIN BEITRAG ZUR KENNTNIS DES N-STOFFWECHSELS
HÖHERER PFLANZEN
(UNTER AUSSCHLUSS DES KEIMLINGSSTADIUMS UND UNTER
BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER SÄUREAMIDE).

Von

KURT MOTHES
(Leipzig).

Mit 2 Textabbildungen.

(Eingegangen am 11. November 1925.)

A. Einleitung.

Im pflanzlichen Organismus sind abgesehen vom Harnstoff zwei durch die charakteristische Gruppe $-\text{CONH}_2$ ausgezeichnete Säureamide aufgefunden worden: das Asparagin, ein Halbamid der Aminobernsteinsäure ($\text{COOH} \cdot \text{CHNH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CONH}_2$), und das Glutamin, ein Halbamid der Aminoglutarsäure ($\text{HOOC} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CHNH}_2 \cdot \text{CONH}_2$). Beide sind überaus häufig und scheinen normalerweise den höheren Pflanzen nie zu fehlen (STIEGER 1924); doch sind die aufgefundenen Mengen oft recht gering. Eine bedeutende Anreicherung dieser Verbindungen wurde in vielen Fällen in unterirdischen Reservestoffbehältern, in Frühjahrstrieben und besonders in Keimlingen beobachtet. Auch kann heute kein Zweifel mehr bestehen, daß Asparagin und Glutamin in verschiedenen Pflanzen einander vertreten. So wurde in russischen Zuckerrüben Asparagin in größeren Mengen, in den deutschen aber Glutamin gefunden (CZAPEK II, 281). Dieses eigenartige Vorkommen hat die physiologisch-chemische Forschung wie kaum ein anderes Problem beschäftigt. Die Fülle von experimentellen Arbeiten und verschiedenen Hypothesen, die das Auftreten dieser Stoffe und ihre Bedeutung für den Stoffwechsel zu erklären versuchen, verbietet es, an dieser Stelle einen eingehenden Überblick über die interessante Geschichte dieser Forschung zu geben. Dies wird als Mangel um so weniger empfunden werden können, als PRJANISCHNIKOW (1924) dies vor kurzer Zeit in großen Zügen getan hat.

Das Asparagin, dem die Forschung wegen seines häufigeren Vorkommens und leichteren analytischen Nachweises ein stärkeres Interesse zuwandte als dem Glutamin, wurde bereits von TH. HARTIG (1858) und BOUSSINGAULT (1864) als ein allgemein verbreiteter Körper von großer physiologischer Bedeutung erkannt. HARTIG beobachtete bei

seinen Studien über die Entwicklungsgeschichte des Pflanzenkeimes, wie im Laufe der Keimung an Stelle der aus dem „gelösten Klebermehl“ entstandenen „Aleurontropfen“ eine farblose Flüssigkeit tritt, aus der man mit Hilfe wasserfreien Alkohols einen krystallisierten, stickstoffreichen Stoff abzuscheiden vermag, den er „Gleis“ nannte. Im Zusammenhang mit seinen sonstigen Vorstellungen über die Vorgänge bei der Keimung schreibt er: „Dieses, wie es scheint, allgemeine Vorkommen jenes krystallinischen Stoffes in jedem jugendlichen Zellgewebe deutet darauf hin, daß seine Lösung die Form sei, in welcher die N-haltige, aus Reservestoffen gebildete Pflanzennahrung von Zelle zu Zelle sich fortbewegt.“ Er vergleicht seinen „Gleis“ mit dem Asparagin und spricht sich für ein Verwandtschaftsverhältnis aus, wie das des „Zuckers zu den Zuckerarten“. „Der Gleiskrystall ist daher gewissermaßen der Zucker des Klebermehls“.

Durch seine allgemeinen landwirtschaftlichen und physiologisch-chemischen Untersuchungen veranlaßt, vergleicht BOUSSINGAULT das Asparagin mit dem Harnstoff. Beide sind Amide, die eine Art Endprodukt im oxydativen Eiweißabbau darstellen sollen. Der Harnstoff wird als Excret vom tierischen Organismus ausgeschieden; er kann nicht von neuem zur Eiweißsynthese Verwendung finden. Die Pflanzen aber scheiden das Asparagin nicht aus; doch soll seine Wiederverwendung im N-Stoffwechsel nur unter dem Einfluß des Lichtes vonstatten gehen.

Beide Hypothesen sind für den Verlauf der Forschung von wesentlichem Einfluß gewesen. Sie haben einen heftigen Streit der Meinungen entfesselt, der — wie wir heute müheloser erkennen — oft an dem Kernpunkt des Problems vorübergegangen ist. Zunächst wandte sich PFEFFER (1872) gegen HARTIGs Annahme einer allgemeinen Verbreitung des Asparagins. Er erkannte diesem Stoff nur eine sehr begrenzte Bedeutung zu und fand ihn nicht in Zweigen und Knospen. Seine eingehenden mikrochemischen Studien über den Asparagingehalt verschiedener Pflanzenteile ließen ihn zu dem Schluß kommen, daß Asparagin das spezifische Translokationsmittel für die Reserveproteine des Samens sei. „Von den Cotyledonen aus bewegt sich das Asparagin im parenchymatischen Gewebe zu den wachsenden Organen der keimenden Pflanze, in der es so lange nachzuweisen ist, bis die Reserveproteide aus den Samenlappen entleert sind. Dann verschwindet das Asparagin, welches nur bei der Translokation der als Reservematerial aufgespeicherten Eiweißkörper eine vermittelnde Rolle spielt, und ist weiterhin nirgends in der Pflanze zu finden, auch nicht in den intensiv wachsenden oder sich neu bildenden Organen.“ In einer weiteren Arbeit (1873) hat PFEFFER wesentliche Argumente gegen BOUSSINGAULTs Annahme vorgebracht, daß das Licht einen entscheidenden Einfluß auf die Wiederverwendung des Asparagins haben soll. PFEFFER zog Lupinenkeimlinge

in CO₂-freier Luft im Licht und beobachtete eine ähnliche Anreicherung von Asparagin wie in Dunkelkulturen, während in normalen Lichtkulturen das Amid allmählich wieder verschwindet (siehe auch BALICKA-IWANOWSKA 1903). Durch gleichzeitige mikrochemische Untersuchung auf Glukose kommt PFEFFER zu dem Schluß, daß der Gehalt an N-freien Reservestoffen maßgebend ist für die in etiolierten Pflanzen auftretenden Amidmengen. Auch findet er bei Keimlingen von *Tropaeolum* sowohl in Licht- als auch in Dunkelkulturen bei späteren Entwicklungsstadien alles Asparagin wieder verschwinden. Dieses Verhalten konnte ich übrigens durch quantitative chemische Untersuchung von *Tropaeolum*-Keimlingen nicht bestätigen¹⁾.

BORODIN (1878) wandte sich gegen PFEFFER und trat für ein allgemeines Vorkommen des Asparagins ein. Seine Versuche an austreibenden Knospen abgeschnittener Zweige ließen den Schluß zu, daß das Asparagin nicht aus dem Stamm einwandere, sondern daß es an Ort und Stelle entstehe. Die zu einer Eiweißsynthese aus Asparagin nötigen N-freien Stoffe sollten aus dem Stamm in die Knospen einwandern. Er dachte dabei vor allem an die Glukose. Der Stärke sprach er die Fähigkeit zur Mitwirkung ab.

E. SCHULZE-Zürich, aus dessen Laboratorium im Laufe von drei Jahrzehnten eine Fülle wertvoller experimenteller Untersuchungen zur Beurteilung des Eiweißstoffwechsels herausgegangen sind, brachte zwei wesentliche Einwände gegen die PFEFFERSche Hypothese: Zunächst (1880) wies er auf das häufige Nebeneinander von Asparagin und reduzierenden Zuckern hin. Vor allem unterirdische Speicherorgane zeigen dieses nach E. SCHULZE mit der PFEFFERSchen Ansicht unvereinbare Vorkommen. Diese Frage wurde in verschiedenen Arbeiten berührt. K. O. MÜLLER (1887) versuchte, den „status nascendi“ der Kohlehydrate für die Regeneration der Eiweiße aus Asparagin als unbedingte Notwendigkeit zu erklären, doch hatte bereits PFEFFER (1873) wesentliche Argumente gegen diese Annahme vorgebracht. Später gelang es dann KINOSHITA (1895) und Anderen Asparagin mit Hilfe von Kohle-

¹⁾ Anmerkung: Keimlinge von *Tropaeolum min.* wurden im Dunkeln in Sand gezogen und in verschiedenen Stadien der Entwicklung analysiert.

Stickstoff in	vT. Frisch-Gew.	vH. Total-N				
		Länge des Keimlings	Total-N	NH ₃	2. Amid	Rest
6 cm	7,2	1,4	17,2	27,2	45,8	54,2
12 cm	6,6	5,5	26,2	28,3	60,0	40,0
15—20 cm	5,8	7,7	34,0	30,7	72,4	27,6

Der Amid-N zeigt eine dauernde Zunahme, der Eiweiß-N eine dauernde Abnahme.

hydraten auch im Dunkeln zum Verschwinden zu bringen. Ohne daß eine restlose Klärung der von E. SCHULZE aufgeworfenen Frage erreicht worden ist, haben sich im Laufe der Jahre wohl alle beteiligten Forscher für eine wesentliche Mitwirkung der Kohlehydrate bei der Eiweißregeneration ausgesprochen. PFEFFER selbst versuchte die Einwände SCHULZES dadurch zu entkräften (1881, I, 300), daß er auf die spezifischen Funktionen einzelner Zellen hinwies. Selbst in einer Zelle sollte eine räumliche Trennung chemischer Prozesse soweit erreichbar sein, daß eine Vereinigung von Asparagin und Kohlehydraten nur ablaufe, wenn sie zweckmäßig sei.

Ein zweiter, wesentlicherer Einwand SCHULZES (1880) beschäftigte sich mit dem Mengenverhältnis des bei der Keimung auftretenden Asparagins im Vergleich zu dem bei künstlicher Eiweißhydrolyse erhaltenen. Wenn Asparagin ein Spaltungsprodukt des Eiweißes sein sollte, müßten jene Mengen übereinstimmen. Dies fand SCHULZE jedoch in keiner Weise bestätigt. In den Keimlingen war prozentual viel mehr Amid vorhanden. Er dachte wohl damals schon stark an die Möglichkeit einer sekundären Entstehung des Asparagins, versuchte aber zunächst seine Anreicherung dadurch zu erklären, daß er in einem immerwährenden Auf- und Abbau des Eiweißes analog dem Verhalten der Stärke beim Transport den Amidn eine geringere Fähigkeit zur Eiweißregeneration zusprach als den übrigen Spaltungsprodukten, von denen er ja selbst einige aus Preßsäften zu isolieren vermochte. Doch hat er später diese auch von anderen Forschern angenommene Hypothese aufgegeben und sich zugunsten einer neuen entschieden, die das Asparagin als einen für die Eiweißbildung besonders geeigneten Stoff hinstellte.

PFEFFER hat sich gegen SCHULZES Forderung immer ablehnend verhalten und damit SCHULZE oft zum Schwanken gebracht. Die von namhaften Forschern vertretene Ansicht (LOEW, O. 1899, PFEFFER 1897), daß im Eiweißmolekül die Spaltungsprodukte nicht vorgebildet seien, sondern daß der Eiweißabbau ganz aus Zweckmäßigkeitsgründen bald so und bald so verlaufen könne, schloß wohl eine sehr einfache Erklärung des Auftretens des Asparagins ein, hat aber kaum zu einer Förderung des Problems beigetragen. Unter dem Einflusse PFEFFERS wurde manche wertvolle ältere Arbeit (BOUSSINGAULT) vergessen. Er selbst hielt an seiner Anschauung fest, auch wenn er sie später etwas modifizierte zugunsten einer Ausnutzung der Asparaginbildung für den Betriebsstoffwechsel. PFEFFERS labile Hypothese der Eiweißzerspaltung schließt eine Fülle von Erklärungsmöglichkeiten der Bedeutung und des Chemismus der Asparaginbildung ein.

Es ist noch zu erwähnen, daß SCHULZE (1880) durch einwandfreie Versuche feststellen konnte, daß das bei der Keimung gebildete Asparagin aus Eiweiß und nicht aus eingewanderten anorganischen N-Quellen hervorgeht.

Mit dem Ende des 19. Jahrhunderts trat eine andere von SCHULZE (1888) schon oft als Arbeitshypothese aufgestellte Möglichkeit der Amidbildung in den Vordergrund. Bereits A. BEYER (1867) schrieb: „Das gleichzeitige Auftreten von Äpfelsäure läßt wohl nicht mit Unrecht darauf schließen, daß möglicherweise aus den Eiweißkörpern Ammoniak austritt und sich mit der ersteren zu Asparagin verbindet“. Unter dem Einfluß der Arbeiten von E. SCHULZE (1898), PRJANISCHNIKOW (1899), LOEW (1899) und deren Schülern hat sich diese Hypothese gefestigt und ist von vielen Forschern anerkannt worden. Nach ihr ist streng zu unterscheiden eine hydrolytische Spaltung des Eiweißes unter dem Einfluß von proteolytischen Fermenten von einer weiteren oxydativen Veränderung der Spaltungsprodukte. Jener primäre Prozeß geht vor allem in den Cotyledonen vor sich, er liefert Aminosäuren, organische Basen, auch geringe Mengen von Amidn, soweit sie im zersetzten Eiweiß präformiert waren. Dieser Prozeß gleicht prinzipiell der Eiweißspaltung im tierischen Magen oder Darm und der Säureproteolyse *in vitro*. Teile dieser Spaltungsprodukte, wie es scheint besonders Basen, Alanin und Tyrosin (SCHULZE 1906, GODLEWSKI 1904, 1911, CZAPEK 2/270) erleiden eine oxydative Aufspaltung unter Bildung von Ammoniak. Dieser Ammoniak wird nun analog der Harnstoffbildung im tierischen Organismus in Asparagin unter Verwendung von Kohlehydraten bzw. verwandter Verbindungen kleineren Moleküls verwandelt. Diese vor allem von PRJANISCHNIKOW (1899, 1—4, 1904, 1910, 1913, 1922, 1 u. 2, 1924 1 u. 2) ausgebaute Theorie hat viele Bestätigungen gefunden. Schon der Gehaltunterschied der Amide und Aminosäuren in Cotyledonen und den übrigen Keimlingsteilen ließ solche sekundäre Vorgänge vermuten. Auch die oft beobachtete Bildung von Asparagin auf Kosten von aufgenommenen Ammoniumsalzen ließ die Vermutung aufkommen, daß es auch normalerweise aus NH_3 entstehen könnte (SUZUKI 1896/97, TAKABAYASHI 1897/98).

Diese Bildung von Asparagin auf Kosten dargereicherter NH_4 -Salze studierten vor allem PRJANISCHNIKOW und seine Schüler (SMIRNOW 1920, 1923). Sie haben festgestellt, daß Keimlinge aus kohlehydratreichen Samen in der Lage sind, aus Ammoniak Asparagin im Dunkeln zu bilden, kohlehydratarme aber speichern das Ammoniak und sterben an NH_3 -Vergiftung. Eine künstliche Glucoseernährung befähigt aber auch diesen Pflanzentypus, Ammoniak zu „entgiften“. PRJANISCHNIKOW kommt auf Grund seiner Versuche zu dem Schluß, daß diese sekundär im Stoffwechsel gebildeten Amide die Aufgabe haben, entstehenden oder von außen eintretenden Ammoniak zu entgiften (vgl. auch SUZUKI 1896/97 u. TAKABAYASHI). Diese Entgiftung soll vor allem dann vor sich gehen und notwendig sein, wenn nicht genügend Kohlehydrate vorhanden sind, um eine Verwendung des NH_3 zur Eiweiß-

synthese zu ermöglichen. Die Amide sind deshalb zugleich Vorratsstoffe für den N-Stoffwechsel. Hierzu hat IWANOFF (1923, 1924) eine Reihe instruktiver Beispiele bei Pilzen beigetragen, wo dieselbe Funktion der Harnstoff auszufüllen scheint.

Die Hypothese der sekundären Entstehung der Amide aus Ammoniak wurde durch eine Reihe anderer Arbeiten sehr gestützt. Hier sei nur erwähnt, daß PALLADIN (1888, 1 u. 2), BORODIN (1885), SUZUKI (1900—1902, IV), GODLEWSKI (1904, 1911) nachweisen konnten, daß in sauerstofffreier Atmosphäre der Eiweißabbau in keimenden Samen anders vor sich geht als in Luft. Das normalerweise auftretende Asparagin sowie Ammoniak sind nicht zu beobachten. Dagegen können wesentliche Mengen von Tyrosin, Leucin nachgewiesen werden. Diese Versuche haben also die Mitwirkung oxydativer Prozesse bei der Asparaginbildung sicher festgestellt.

BUTKEWITSCH, dem bereits der Nachweis proteolytischer Enzyme in keimenden Samen geglückt war (1900, 1901), konnte 1909 nachweisen, daß in anästhesierten Keimlingen ebenfalls kein Asparagin gebildet wird. Dafür erhielt er bedeutende Mengen von Ammoniak (14,4 vH. vom Total-N). Diese Arbeiten fußten auf der Anschauung von CL. BERNARD (1878), der in seinen „Leçons sur les phénomènes de la vie“ die Ansicht geäußert hatte, daß in der Narkose alle synthetischen Prozesse, besonders das Wachstum, sistiert sind, während der Stoffabbau weitergeht. So sprechen auch BUTKEWITSCHS Untersuchungen für eine sekundäre, synthetische Bildung der Amide.

Der Chemismus dieser Vorgänge ist noch ungeklärt. Der Verlauf der Desaminierung der Aminosäuren ist an tierischen Objekten studiert worden (Literatur siehe bei SMIRNOW 1923, KOMM 1925); der Bildung des Kohlenstoffskelettes der Amide ist noch keine eingehende Arbeit gewidmet worden (SMIRNOW 1920/23).

Wenn auch das Beweismaterial für die SCHULZE-PRJANISCHENIKOWsche Ansicht so groß ist, daß man sich ihm nicht verschließen kann, so befinden sich doch in den hier erwähnten Arbeiten eine Anzahl Unstimmigkeiten, die einer Klärung bedürfen. Die Bedeutung des Asparagins für den Stofftransport, das oft eigenartige Vorkommen von Amidon neben reduzierenden Zuckern ließen es notwendig erscheinen, dem Problem eine weitere Arbeit zu widmen. Entscheidend war dabei, daß fast alle Studien zur Asparaginfrage an Keimlingen angestellt worden sind. *Es erschien notwendig, zu prüfen, ob die oben beschriebenen Hypothesen auch im Stoffwechsel ausgewachsener Pflanzenteile ihre Gültigkeit behalten.* Auch lag die Vermutung nahe, durch eine eingehende Untersuchung des Stoffwechsels ausgewachsener Blätter Beiträge zu den Problemen der Stoffwanderung und des Eiweißstoffwechsels im allgemeinen bringen zu können. Ich habe deshalb mit solchen Objekten in

den Jahren 1924 und 1925 eine Reihe von Untersuchungen vorgenommen, über die im folgenden berichtet werden soll unter Hinweis auf eine vorläufige Veröffentlichung in dieser Zeitschrift, I (1925), S. 317¹⁾.

B. Methodischer Teil.

Die Vervollkommnung der quantitativen mikrochemischen Methoden und ihre erfolgreiche Anwendung in der physiologischen Chemie gaben den Anlaß, sich ihrer auch in den vorliegenden Untersuchungen zu bedienen. Es bestanden Hoffnungen, durch solche Methoden bisher unzugängliche Gebiete experimentell zu bearbeiten und damit zur Lösung des Problems durch neue Wege der Forschung beizutragen. Die geringen Mengen des zur Untersuchung erforderlichen Materials, die Schnelligkeit des Arbeitens, die diese Methoden gestatten, die Sauberkeit, die die Apparatur gewährleistet, sind wesentliche Vorteile.

Es wurden im allgemeinen nur folgende Stickstofffraktionen experimentell oder durch Rechnung quantitativ ermittelt:

1. Gesamt-N,
2. Eiweiß-N,
3. gesamtlöslicher N,
4. N des säureamidartig gebundenen Ammoniaks = Amid-N,
5. N des präformierten Ammoniaks;
6. Rest-N, als Differenz des Ammoniak-N und Amid-N vom gesamtlöslichen N errechnet; er umfaßt den N der Aminosäuren, organischen Basen usw.

Zur Bestimmung der Fraktionen 1—3 bediente ich mich der von IVAR BANG (1922) und F. PREGL (1923) eingehend beschriebenen Mikro-KJELDAHL-Methode. Die N-haltige Substanz, deren Präparation noch beschrieben wird, wurde in gewöhnlichen langhalsigen KJELDAHL-Kolben durch ammoniakfreie Schwefelsäure unter Zusatz einiger Tropfen durch Umkristallisation gereinigter Kupfersulfatlösung als Catalysator zersetzt und solange über kleiner Flamme erhitzt, bis der Kolbeninhalt klar und farblos geworden war. Diese Operation nahm je nach der zu verbrennenden Menge 2—10 Stunden in Anspruch. Wenn größere Quantitäten von Nitraten in der Substanz nicht vorhanden sind, finden

1) Es muß noch bemerkt werden, daß nach Beendigung eines großen Teiles dieser Arbeiten mir eine Reihe von Aufsätzen CHIBNALLS in die Hände fielen, die zu einem Teil nahezu schon vor einem Jahr erschienen waren und denen eine ähnliche Fragestellung zugrunde liegt. Trotz der fruchtbaren Arbeit der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft ist heute immer noch der Bezug ausländischer Zeitschriften mit schweren Hindernissen verbunden. Ich werde deshalb, auch mit Rücksicht auf den größeren Rahmen meiner Fragestellung auf diese Arbeiten erst im experimentellen Teil und in der Schlußbetrachtung zurückkommen.

wir den gesamten N nunmehr in der Form des schwefelsauren Ammoniums wieder, dessen Bestimmung durch Überdestillierung des Ammoniaks nach Alkalisierung der Flüssigkeit und Auffangen des Destillates in Schwefelsäure erfolgt. Zu diesem Zwecke wurde stets nur ein Teil des KJELDAHL-Rückstandes nach vorheriger Verdünnung mit Wasser benutzt und mindestens eine Parallelbestimmung ausgeführt. Zur Verwendung kam der bei PREGL abgebildete Apparat. Das Kühlrohr war aus Silber gefertigt und hat sich vor allem wegen der leichten Kühlung gut bewährt. Zum Auffangen des überdestillierten Ammoniaks in Schwefelsäure dienten Kölbchen aus Jenaer Glas, die gut ausgedämpft waren.

Im Anfang der Untersuchungen wurde die jodometrische Bestimmung der Schwefelsäure nach IVAR BANG benützt. Später habe ich jedoch die acidimetrische Methode PREGLS unter Benutzung von Methylrot (p-dimethylaminoazobenzolortho-carbonsäure) vorgezogen. Diese Methode gestattet unter den zu beschreibenden Bedingungen ein ebenso genaues Arbeiten wie die jodometrische und bietet eine Menge Vorteile. Der Umschlag von rot zu kanariengelb ist nach einiger Übung hinreichend scharf zu erkennen. Die nach erreichtem Farbumschlag eintretenden Veränderungen der Färbung sind bei jodometrischem Arbeiten mit Stärkekleister als Indicator stärker als bei acidimetrischem. Auch stört bei diesem etwa vorhandene Kohlensäure nicht in dem Maße, doch wurde bei allen Destillationen zur Alkalisierung der Ammoniumsulfatlösung carbonatfreie, konzentrierte Natronlauge verwendet und damit diese Fehlerquelle völlig ausgeschieden. Einen sehr scharfen Umschlag wird man bei beiden Methoden erhalten, wenn das Kölbchen mit der zu titrierenden Schwefelsäure eisgekühlt wird. Überhaupt sind starke Temperaturunterschiede und ebenso starke Verschiedenheiten des Verdünnungsgrades der Säure bei Parallelbestimmungen zu vermeiden. Gleiche Destillationszeiten und gleichmäßige Kühlung ist deshalb erforderlich. Doch sind auch diese Fehlerquellen bei der jodometrischen Methode größer als bei der acidimetrischen, die endlich noch den bedeutenden Vorteil bietet, daß bei Übertitrierung ein Rücktitrieren möglich ist.

Die später beschriebenen Untersuchungen sind alle mit der acidimetrischen Methode durchgeführt. Als Titrierflüssigkeiten dienten im allgemeinen $\frac{n}{50}$ Schwefelsäure und Natronlauge, denen der Indicator bereits zugesetzt war, was einen Vergleich der Umschlagfarbe mit der der typisch basischen oder sauren Flüssigkeit vorteilhaft ermöglichte und eine immer gleiche Menge Indicatorensubstanz zur Verwendung gelangen ließ. Nur in seltenen Fällen gelangte eine $\frac{n}{100}$ Lösung zur Verwendung.

Da 1 ccm der durch Ammoniak neutralisierten $\frac{n}{50}$ Schwefelsäure 0,28 mg Stickstoff entspricht, die Büretten aber ein Ablesen von 0,02 ccm mit genügender Genauigkeit ermöglichen, ist die Bestimmung von 0,0056 mg N noch möglich. Es liegt an der Präparation der zu untersuchenden Fraktionen, daß eine größere Genauigkeit nicht erforderlich ist, da die Grenzen der Versuchsfehler, die noch beschrieben werden, eine exakte Bestimmung von Mengen unter 0,01 mg N nicht gewährleisten. Die Fehlergrenze der KJELDAHL-Bestimmungen wurde immer unterhalb 1 vH. gefunden.

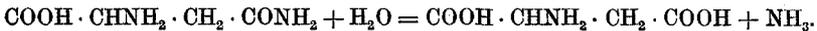
Es ist noch zu bemerken, daß ein konstanter Faktor bei der Errechnung der Ergebnisse in Abzug zu bringen ist. Trotz bester Chemikalien hat sich gezeigt, daß Spuren von Ammoniak immer in ihnen enthalten sind. Allerdings haben sie oft keine praktische Bedeutung. Nur bei der Bestimmung des präformierten Ammoniaks und des Amid-N müssen sie in vielen Fällen berücksichtigt werden. Diese Fraktionen wurden unter Benutzung der von SCHULZE und WINTERSTEIN in ABDERHALDENS biochem. Arbeitsmethoden (Band II) beschriebenen Vakuumdestillation erhalten. Das Ammoniak wurde im langsamen Luftstrom nach Zusatz von Barytlaug unter guter Kühlung überdestilliert und in eisgekühlter $\frac{n}{50}$ bis $\frac{n}{100}$ Schwefelsäure aufgefangen. Da die pflanzlichen

Extrakte oft stark schäumten, was zum Teil auf die Präparierung zurückzuführen ist, hat sich ein Einschmelzen einer Sicherheitskugel in das Aufsteigrohr des Destillationskolbens gut bewährt, ebenso der Zusatz von einigen Tropfen reinen Paraffinöls, das jedes gefährliche Schäumen verhindert. Die Destillation wurde bei 40—50° C ausgeführt, die Destillationszeit betrug etwa 10—20 Minuten. Genügend genaue Resultate erhält man immer bei vorsichtigem Arbeiten. Vor allem ist darauf zu achten, daß der Luftstrom erst dann durch die Capillare eingeleitet wird, wenn das Sieden beginnt und das Kühlrohr aus Silber genügend tief in die vorgelegte Schwefelsäure eintaucht. Im übrigen kann auf die obenbeschriebene Art des acidimetrischen Arbeitens verwiesen werden.

Die Bestimmung des Amid-N geschah nach der SACHSSESchen Methode, die ebenfalls SCHULZE und WINTERSTEIN in ABDERHALDENS biochem. Arbeitsmethode beschrieben haben (Bd. II, S. 513). Zur Abspaltung des amidartig gebundenen Ammoniaks wurden 100 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit mit 3 ccm konzentrierter Schwefelsäure versetzt und 2 Stunden am Rückflußkühler im Sieden erhalten. Nach annäherndem Neutralisieren der Schwefelsäure wurde die Bestimmung des hydrolytisch abgespaltenen Ammoniaks unter Zusatz von Baryt-

lauge, wie oben beschrieben, in der Vakuumdestillation vorgenommen. Auch bei diesen Bestimmungen wurden immer Parallelversuche unter-
nommen, die eine Fehlergrenze von höchstens 4 vH. ergaben. Im
allgemeinen lag sie darunter.

Für die Berechnung des Amid-N ist noch zu sagen, daß in den
später angeführten Tabellen im allgemeinen vom doppelten Amid-N
die Rede ist. Die in der Pflanze bisher beobachteten Amide Asparagin
und Glutamin weisen außer der carboxylgebundenen NH_2 -Gruppe noch
eine Aminogruppe auf, die bei der Hydrolyse nicht abgespalten wird:



Es kann aber nach allen bisherigen Untersuchungen und den eigenen
Arbeiten kein Zweifel bestehen, daß auch dieser zweiten HN_2 -Gruppe
eine ähnliche physiologische Bedeutung zukommt. Wie in der Einleitung
ausgeführt, geht das Kohlenstoffskelett des Asparagins sicher nicht aus
N-haltigen Substanzen, etwa Eiweiß, hervor, sondern mit größter Wahr-
scheinlichkeit aus N-freien, aus Spaltprodukten der Kohlehydrate wie
Äpfelsäure usw. Bei der Entstehung des Asparagins wird also auch
diese zweite HN_2 -Gruppe angelagert. Es entspricht demnach unseren
chemischen Darstellungen, wenn in den Tabellen ein doppelter Amid-N
aufgeführt wird. — Weiter ist zu beachten, daß der Amid-N nur dann
direkt in richtiger Menge erhalten wird, wenn die Hydrolyse mit Ma-
terial erfolgt, das vom präformierten Ammoniak bereits befreit ist.
Dann wurde aus dieser barythaltigen Flüssigkeit zunächst durch Neu-
tralisierung mit Schwefelsäure das Baryt entfernt. Wird aber als Aus-
gangsmaterial eine noch ammoniakhaltige Substanz benutzt, dann mußte
der in einer Sonderbestimmung ermittelte Wert des präformierten
Ammoniak in Abzug gebracht werden.

Es wäre nun noch die Präparation der die verschiedenen N-Ver-
bindungen enthaltenden Fraktionen zu beschreiben. Der Trennung des
Eiweiß-N und des löslichen N standen zunächst große Schwierigkeiten
im Wege. Es war zunächst nötig, daß mit frischem Material gearbeitet
wurde, da beim Trocknen nach SMIRNOW (1924) und anderen Autoren
große Verluste an präformiertem Ammoniak zu befürchten sind und
auch andere Umsetzungen (CHIBNALL 1922/III) unkontrollierbar vor
sich gehen. Deshalb wurden die Pflanzenteile, von denen meist 3—8 g
verwendet wurden, im Mörser unter Zusatz eines Eiweißfällungsmittels
zerkleinert und eventuell unter Zusatz von gereinigtem Quarzsand fein
zerrieben, so daß fast alle Zellen geöffnet wurden. Mit Eiweißfällungs-
mitteln wurden verschiedene Erfahrungen gesammelt. Zunächst wurde
Uranylacetat in 10 proz. Lösung heiß angewendet, jedoch mußte die
Mischung einen Tag stehen, um ein gutes Filtrieren zu ermöglichen.

Dies war sehr hinderlich. Außerdem ist diese Methode sehr kostspielig. Sie wurde fallen gelassen.

Gut bewährte sich eine 0,3 proz. Uransalzlösung, die nach IVAR BANG (1922) mit gesättigter KCl-Lösung zubereitet war. Die Filtration ging sehr gut. Doch hatte diese Fällung den Nachteil, daß die große Salzmenge, die im Filtrat vorhanden war, bei der KJELDAHL-Verbrennung sehr störte. Ihre Entfernung aber hätte zu leicht Verluste herbeigeführt. Überhaupt mußte die Methode jedes öftere Filtrieren oder Fällungen vermeiden, da die zu untersuchenden Substanzen sehr leicht adsorbiert werden.

0,5 proz. Phosphormolybdänsäurelösung unter Zusatz von 1,5 proz. H_2SO_4 nach BANG (1922) bewährte sich als Fällungsmittel ebenfalls gut. Die Werte stimmten gut mit den mit Uranylacetat gefundenen überein. Doch zeigte auch dieses Fällungsmittel große Nachteile. Zunächst verändert bei heißer Anwendung die hohe Säurekonzentration sehr leicht die Eiweißkörper oder die Amide. Zum anderen ist es sehr nachteilig, daß das Filtrat, das die löslichen N-Verbindungen enthält, sehr schnell eine dunkle, blaugrüne Färbung annimmt, die eine leichte Beobachtung von Niederschlägen oder Trübungen ausschließt. Endlich zeigt sich, daß bei einigen Pflanzenarten kein klares Filtrat zu erhalten war, wenn auch bewiesen werden konnte, daß die Trübung nicht von einer N-haltigen Substanz hervorgerufen worden war.

Trichloressigsäure bewährte sich als Fällungsmittel wenig; es gab sehr verschiedene Werte. Alkoholzusatz verbesserte die Eigenschaften. Doch wurde nach mannigfachen Versuchen mit diesem Stoff abgesehen.

Nach vielem Experimentieren wurde mit 4 proz. Tanninlösung, der noch 0,1 vH. H_2SO_4 zugesetzt war, gearbeitet und in ihr ein ausgezeichnetes Eiweißfällungsmittel für unsere Zwecke gefunden. Mit ihr wurden fast alle später beschriebenen Untersuchungen ausgeführt. Die Anwendung geschah folgendermaßen: Die Pflanzenteile wurden unter Zusatz von 4 proz. Tanninlösung zerrieben und eine gewisse Zeit ($\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{2}$ Stunde) stehen gelassen. Dann wurde durch ein N-freies quantitatives Filter filtriert. Die Zellmassen, die auch alles Eiweiß enthielten, wurden 8—10mal ausgewaschen, dann gelinde ausgepreßt. Es zeigte sich, daß eine heiße Anwendung von Tannin, aber kalte Filtration bessere Resultate ergab als eine kalte Anwendung. Am vollständigsten war die Extraktion, wenn beim Zerstampfen der Blattmassen vor Zusatz der Tanninlösung einige Tropfen Toluol beigefügt wurden. — Der Filterrückstand wurde nun einer KJELDAHL-Bestimmung unterworfen, desgleichen ein Teil des Filtrates. Ich erhielt so die Werte für den Eiweiß-N und den löslichen N, deren Summe den Total-N ergibt, der in einigen Fällen durch KJELDAHL-Bestimmung der frischen Blattmasse zur Kontrolle auch analytisch ermittelt wurde. Der Rest des Filtrats wurde teils zur

Bestimmung des präformierten Ammoniaks, teils zur Ermittlung des durch Säurehydrolyse abspaltbaren Amid-N verwendet. Durch einfache Rechnung ergab sich dann der Wert für den Rest-N.

Bestimmungen der organischen Basen durch Fällung mit Phosphorwolframsäure führte wegen der geringen vorhandenen Mengen zu keinem brauchbaren Erfolg. Obgleich eine Untersuchung der möglichen Quellen des Asparagin-N sehr vorteilhaft erscheint, mußte deshalb von einer Berücksichtigung der Basen und der Aminosäuren Abstand genommen werden. Dies konnte um so leichter getan werden, als die bisher vorliegenden Arbeiten den Basen keine besondere Rolle im Stoffwechsel zusprechen. So fand CHIBNALL (1922, II) einen regelmäßigen, durchschnittlichen Gehalt von 2 vH. Basen-N bezogen auf Gesamt-N. Im Vergleich zum löslichen N war es immer weniger als man auf Grund einer hydrolytischen Eiweißspaltung erwarten sollte, wohl ein weiterer Beweis dafür, daß ein Teil der Basen schnell einer weiteren Spaltung anheimfällt.

Einen Einblick in die Fehlergrenzen der Methode und die Wirkungsweise verschiedener Fällungsmittel geben folgende analytische Belege:

1. (Siehe Tabelle 1) A. Zweifedrige, ausgewachsene Blätter von nichtausgewachsenen *Vicia faba*-Pflanzen werden so analysiert, daß ein Vergleich der Fiedern ermöglicht wird. Frischgewicht pro Portion etwa 6 g; Fällungsmittel Uranylchlorid heiß.

B. wie A, aber nicht ausgewachsene Blätter.

C. 12 ausgewachsene Primärblätter von *Phaseolus multiflorus* werden längs der Mittelrippe geteilt. Die Blatthälften werden zu Parallelbestimmungen verwendet. Fällungsmittel Toluol, Tannin heiß.

Tabelle 1.

Stickstoff	in vT. des Frisch-Gewichts	vH. des Total-N				
	Total-N	NH ₃	2. Amid	Rest	löslich	Eiweiß
A. <i>Vicia faba equ.</i>	7,34	0,23	1,77	8,90	10,90	89,10
	7,22	0,24	1,76	8,73	10,73	89,27
B. <i>Vicia faba equ.</i>		0,57	2,70	13,17	16,44	83,56
		0,58	2,66	13,02	16,26	83,74
C. <i>Phaseol. multifl.</i>	3,52	0,90	4,26	8,54	13,70	86,30
	3,58	0,95	4,24	8,56	13,75	86,25

2. (Siehe Tabelle 2.) In ausgewachsenen Blättern von *Vicia faba* wurden der Eiweiß-N und der lösliche N mit verschiedenen Fällungsmitteln bestimmt. Versuchsmaterial sehr einheitlich.

Wieweit diese Differenzen vom Material selbst abhängen (s. Gesamt-N), konnte nicht geklärt werden.

Tabelle 2.

Fällungsmittel	Filtration	Total-N in vT. Frisch- Gew.	Eiw.-N in vH. Total-N.	Lösl.-N in vH. Total-N
I. Phosphormolybdänsäure kalt	sofort	6,84	81,86	18,14
II. " " "	nach 13 Stund.	6,99	81,70	18,30
III. " " + 15 vH. Alkohol kalt	sofort	7,11	82,14	17,86
IV. Phosphormolybdänsre. heiß	"	7,11	80,82	19,18
V. " " "	5 Min. gekocht	7,05	78,81	21,19
VI. Tannin " "	sofort	7,04	79,55	20,45

3. Blätter wie unter I C. 12 Blatthälften mit Tannin kalt gefällt, die anderen 12 Blatthälften mit Tannin heiß nach Toluolvorbehandlung. Die Menge der verwendeten Tanninlösung betrug 80 ccm. Die Bestimmung des Gesamt-N des Filtrates betrug 5,23 bzw. 5,68 mg N. Der Filtrerrückstand wurde weiter ausgewaschen mit nochmals 80 ccm Tanninlösung. Die Filtrate enthielten 0,42 bzw. 0,19 mg N.

4. Blätter wie unter I C; je 12 Blatthälften wurden unter Toluolzusatz zerrieben, mit Tannin heiß gefällt, kalt filtriert und ausgewaschen. Filtrat 80 ccm. Stickstoffmengen des Filtrates: 6,25 mg bzw. 6,31 mg. Weiteres Auswaschen mit 100 ccm Tanninlösung ergab im Filtrat 0,38 bzw. 0,29 mg N. Nochmaliges Auswaschen mit 50 ccm Tanninlösung ergab im Filtrat 0,10 bzw. 0,07 mg N.

Die Fehlergrenzen der Methode gestatten also bei sorgfältiger Beachtung der Verschiedenheiten des Materials ein genügend exaktes Arbeiten. Es könnte noch der Einwand gemacht werden, daß der Stickstoffgehalt des Chlorophylls die Resultate wesentlich beeinflussen könnte. Dem gegenüber ist festzustellen, daß auf Grund der Untersuchungen über das Chlorophyll (1913) von WILLSTÄTTER und STOLL der Gehalt an Chlorophyll in Tausendstel des Blatttrockengewichts zwischen 5,6 und 12,8 schwankt. Diese Zahlen auf unser Material umgerechnet, ergibt aber einen Stickstoffgehalt (ausgedrückt in Tausendstel des Frischgewichtes) von 0,035—0,08 (—0,16). Wie der Augenschein lehrt, bleibt das Chlorophyll bei der Filtration mit dem Eiweiß im Filtrerrückstand. Selbst wenn man die größtmöglichen N-Werte des Chlorophylls berücksichtigt, werden diese keinen wesentlichen Einfluß auf das Endresultat haben. Eine andere Möglichkeit, Störungen der Rechnung durch das Chlorophyll zu erhalten, liegt dort, wo beim Vergilben der Blätter eventuell Spaltungsprodukte des Chlorophylls als löslicher N auftauchen. Da aber in diesen Fällen, wie die Versuche zeigen, der lösliche N selbst stark zunimmt, kann die geringe mögliche Zunahme durch den Chlorophyll-N keine Ungenauigkeit der Endresultate verursachen.

Das Versuchsmaterial bestand im allgemeinen aus ausgewachsenen Blättern. Wo eine Ausnahme nötig war, wurde dies in den unten fol-

genden Versuchsprotokollen vermerkt. Als Versuchspflanzen wurden verwendet: *Phaseolus multiflorus*, *Lupinus luteus* und *albus*, *Vicia faba* equ., *Amicia zygomeris*, *Cucurbita*, *Colocasia*, *Xanthosoma*, *Tropaeolum*, *Linosyris vulgaris*. Da Blätter verschiedenen Alters und verschiedener Farbe nicht allein im Gehalt an Gesamt-N, sondern auch in dem Verhältnis der einzelnen Stickstofffraktionen große Differenzen aufweisen, wurden die Versuche so angelegt, daß Fehler durch solche individuelle Unterschiede der Blätter und der übrigen untersuchten Pflanzenteile vermieden wurden. Bei *Vicia faba* gelang dies leicht dadurch, daß zu Kontroll- oder Parallelbestimmungen entsprechende Fiederblätter Verwendung fanden, die in bezug auf den Gehalt an N-Fractionen sehr einheitlich zusammengesetzt sind. Dasselbe gilt für die zwei Primärblätter der Bohne, wenn sie äußerlich keine Entwicklungsverschiedenheiten zeigen. Auch *Lupinus* zeigt sehr einheitliche Analysen der Blätter. Da bei Versuchen mit diesen Pflanzen meist 15—25 Blätter verwendet wurden, mußten sich Schwankungen im N-Gehalt ausgleichen.

Bei den übrigen Pflanzen, auch bei vielen Versuchen mit *Phaseolus* wurde mit Erfolg eine Blatthälftenmethode angewendet.

C. Experimenteller Teil.

I. Die Amide im normalen Stoffwechsel.

Als Grundlage der anzustellenden Experimente mit ausgewachsenen Blättern muß eine genaue Kenntnis der Verschiedenheiten ihres Stoffwechsels im normalen Ablauf der Entwicklung unter dem Einfluß der Wachstumsvorgänge, der Nacht, von Temperaturschwankungen usw. dienen. Die bisher vorliegenden Untersuchungen haben sich nur wenig mit dem Studium der normalen Verhältnisse beschäftigt, wenn wir von den zahlreichen Arbeiten über die Keimung und die Entwicklung junger Pflanzen und das Austreiben der Knospen absehen. Spezielle quantitative Beobachtungen über Stoffwechselveränderungen bei ausgewachsenen Blättern liegen kaum vor.

a) *Der Stoffwechsel im Laufe einer Entwicklungsperiode.*

HORNBERGER (1882) hat eingehende Untersuchungen über den Stickstoffwechsel der Maispflanze angestellt. Doch geben die Ergebnisse mehr einen summarischen Überblick über die Veränderungen der stofflichen Zusammensetzung in einzelnen Pflanzenteilen und keine Möglichkeit, den Stoffwechsel einzelner Blätter aufzuhellen. HORNBERGER stellt u. a. fest, daß im Laufe der Entwicklung der Total-N und Eiweiß-N in der gesamten Blattmasse von 100 Pflanzen zunimmt, während der Nichtprotein-N sich kaum verändert. Dagegen nimmt in den Achsenorganen der Eiweiß- und Nichteiweiß-N ungefähr im gleichen Verhältnis zu.

EMMERLING (1880) hat eingehende Analysen verschiedener Pflanzenteile von *Vicia faba maj.* angestellt. Er kommt zu dem Ergebnis, daß sich der Amidgehalt in ausgewachsenen Blättern fast während der ganzen Entwicklungszeit annähernd konstant erhält. Nur zur Zeit der Reife der Samen beobachtet er eine Abnahme. Jüngere Blätter sind bedeutend reicher an Amid, ebenso Blüten, Sprosse und Knospen. Den Stengel findet er ebenso wie die Wurzel arm an Amiden. Er kommt wegen der Verteilung der Amide zu dem Schluß, daß sie in allen in lebhaftem Wachsen und Vermehren ihrer Masse begriffenen Organen in größerer Menge vorhanden sind als in älteren, entwickelteren. Leider untersucht der Verfasser in dieser Arbeit nur wenige N-Fractionen, so daß man keinen Überblick über die Vorgänge erhalten kann.

Die im Jahre 1887 und 1900 erschienenen Arbeiten des Verfassers bringen ähnlich wie die HORNBERGERSche Arbeit summarische Untersuchungen gewisser Pflanzenteile und geben deshalb keinen Aufschluß über die Veränderungen in einer begrenzten Zahl ausgewachsener Blätter. Deshalb soll hier nicht darauf eingegangen werden.

KOSUTANY (1897) stellt fest, daß im Laufe des Sommers die ausgewachsenen Blätter immer ärmer an Gesamt-N werden. Doch bezieht er seine Analysen auf Trockengewicht. Auf Frischgewicht bezogen, zeigen sie große Verschiedenheiten.

E. SCHULZE hat ebenfalls Untersuchungen über die stofflichen Veränderungen während der Entwicklung der Pflanzen angestellt. Doch sind auch hier nur die Verhältnisse in allen Blättern oder allen Achsenorganen usw. berücksichtigt. Wie weit es sich hier um Vergleiche der Zusammensetzung verschiedener Pflanzenteile handelt, soll später dargelegt werden. Bedeutsam erscheinen in diesem Zusammenhang zwei Arbeiten (1910 und 1911), die sich mit der Proteinbildung in reifenden Pflanzensamen beschäftigen. SCHULZE beobachtet bei Leguminosen in unreifen Hülsen eine starke Anreicherung von Asparagin, während die jungen Samen nur Spuren aufweisen. Er schließt auf eine Einwanderung des Asparagins, das in verschiedenen Organen der Pflanze mit ungleicher Geschwindigkeit zur Eiweißsynthese verbraucht werden soll und verweist auf die häufig festgestellte Tatsache, daß Blattstiele reicher an Asparagin sind als Blattspreiten.

B. SCHULZE und SCHÜTZ (1909) berichten, daß in Blättern von *Acer negundo* im Laufe des Sommers eine starke Verminderung des Total-N und Eiweiß-N, eine geringe Abnahme der Aminosäuren und unregelmäßige Schwankung des Amid-N zu beobachten sind.

OTTO und KOOPER (1910) stellen fest, daß der Stickstoffgehalt ausgewachsener Blätter bezogen auf das Trockengewicht in den frühesten Entwicklungsstadien am höchsten ist und von da ab bis zum Absterben der Blätter allmählich und kontinuierlich abnimmt.

A. C. CHIBNALL (1922, II) hat eingehende Untersuchungen über die Veränderung in ausgewachsenen Blättern von *Phaseolus multiflorus* im Laufe einer 143tägigen Entwicklung angestellt. Wie oben erwähnt, ist diese Arbeit erst nach Beendigung eines Teiles meiner eigenen Untersuchungen in meinen Besitz gelangt. CHIBNALL kommt zu dem Ergebnis, daß Total-N und Eiweiß-N, bezogen auf das Frischgewicht der Blätter, mit dem Wachstum variieren, daß ihre Menge abnimmt, wenn die Pflanze stark wächst oder Früchte bildet. Amid-N und NH₃-N bleiben unverändert und an Menge sehr gering, während die Schwankungen des Stickstoffs der Mono-Aminosäuren denen des Total-N parallel gehen. Werden die gefundenen Mengen auf das Trockengewicht bezogen, ergeben sich andere Verhältnisse, da dieses im Vergleich zum Frischgewicht dauernd zunimmt. Diese Untersuchungen sind mit großen Blattmengen angestellt. Besondere Beobachtungen über den Einfluß der Temperatur erfolgten nicht.

Ich habe nun im Laufe der Jahre 1924 und 1925 eine Reihe von Analysen ausgewachsener Blätter angestellt, deren Ergebnis von denen CHIBNALLS abweichen. Wie die folgenden Tabellen zeigen, findet in einem Blatte, das seine endgültige Größe erreicht hat, zunächst eine

Tabelle 3.

	Datum	N in vT. des Frischgewichtes					
		NH ₃	2. Amid.	Rest	Lösl.	Eiweiß	Total
I. Pflanze 20 cm hoch	10. X. 24	0,02	0,43	0,42	0,87	4,47	5,34
	15. X. 24	0,02	0,40	0,58	1,00	4,72	5,72
	20. X. 24	0,04	0,41	0,93	1,38	4,36	5,74
	25. X. 24	0,02	0,37	0,76	1,15	4,36	5,51
	» 40 cm hoch	30. X. 24	0,03	0,29	0,69	1,01	4,07
Blätter beginnen zu vergilben	4. XI. 24	0,02	0,31	0,48	0,81	3,93	4,74
	9. XI. 24	0,02	0,27	0,39	0,68	3,44	4,12
	14. XI. 24	0,02	0,30	0,44	0,76	2,07	2,83
II. Pflanze 10 cm hoch	10. X. 24	0,04	0,18	0,52	0,74	4,60	5,34
» 15 cm lang	15. X. 24	0,04	0,21	0,57	0,82	4,90	5,72
	20. X. 24	0,03	0,16	0,54	0,73	5,18	5,91
» 45 cm hoch	25. X. 24	0,05	0,14	0,39	0,58	4,76	5,34
Vergilben der Primärblätter	30. X. 24	0,02	0,18	0,48	0,68	4,39	5,07
	4. XI. 25	0,04	0,17	0,32	0,53	3,82	4,35

gewisse Zeitlang eine Vermehrung des Eiweiß-N statt, die übrigens nach Beobachtungen an *Lupinus luteus* und Fiederblättern von *Phaseolus* nicht immer von einer Steigerung der Total-N-Menge begleitet zu sein braucht. Mit zunehmender Entwicklung der Pflanze wandern wieder beträchtliche Mengen von N aus, bis das Gelbwerden eine Störung im Leben der Zellen andeutet. Die in zwei zusammenhängenden Reihen erfolgten Analysen

sind an ausgewachsenen Blättern der unteren Stengelzonen vorgenommen worden mit *Vicia faba* (I.) und *Phaseolus multiflorus* (II.), dessen Primärblätter ein ausgezeichnetes Versuchsmaterial für solche Untersuchungen abgeben wegen der Schnelligkeit des Ablaufes der Stoffwechselvorgänge. In beiden Fällen handelt es sich um Gewächshauspflanzen. Bei *Vicia* wurde an einer großen Zahl von Pflanzen durch ein rotes Bändchen eine Zone markiert, unterhalb derer Blätter von jedesmal drei gleichgewachsenen Pflanzen geschnitten wurden. Bei *Phaseolus* wurden jedesmal fünf Primärblätter analysiert.

Die Nichteisweiße unserer Tabelle zeigen unregelmäßige Schwankungen, die, wie ich später zeigen werde, im wesentlichen auf Beleuch-

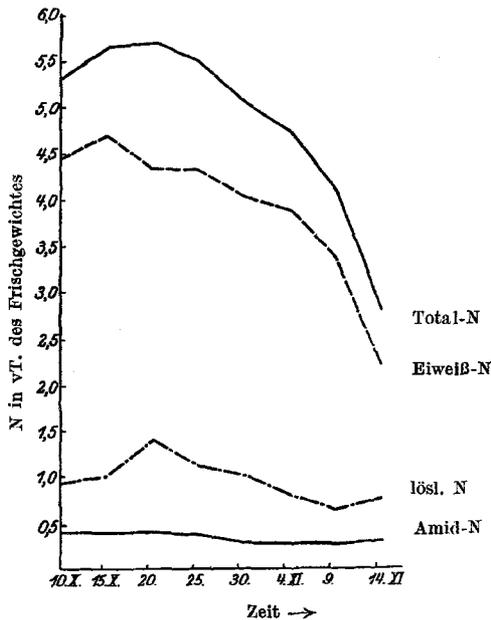


Abb. 1, zu Tabelle 3, I. Blätter von *Vicia faba* im Laufe einer Entwicklungsperiode.

tungs- und Temperaturunterschiede zurückzuführen sind, auf die bei diesen Versuchen leider nicht genug geachtet worden ist. Doch können wir der Tabelle entnehmen, daß die löslichen Substanzen nicht in dem Maße abnehmen, wie das Eiweiß (siehe Abb. 1).

Die beiden Versuche wurden beendet durch Absterbeerscheinungen, denen ich mich unten kurz zuwenden werde.

b) Der Nachtstoffwechsel.

Nach den wenigen, bisher vorliegenden Arbeiten über die Veränderungen im Stickstoffhaushalt des Blattes während der Nacht erschien es angebracht, eingehende Untersuchungen anzustellen.

SAPOSCHNIKOW (1894) stellte eine nächtliche Abnahme des Eiweiß-N in ausgewachsenen Blättern von *Vitis* fest. Er schloß auf eine Auswanderung des Eiweißes. In abgeschnittenen Blättern, die er 14 bis 16 Stunden lang ins Dunkle stellte, die Stiele in Wasser, fand er keine Eiweißabnahme, in einigen Fällen sogar eine merkliche Zunahme.

SUZUKI (1897/98) hat in Anlehnung an SAPOSCHNIKOWS Ergebnisse einige Untersuchungen über die nächtliche Auswanderung N-haltiger Substanzen angestellt. Wenn er die analytisch festgestellten Stoffmengen seiner einzelnen Fraktionen auf das Frischgewicht der Blätter bezog, kam er zu dem Schluß, daß sowohl der Total-N (bis 13 vH. des Abendwertes), als auch der Eiweiß-N (bis 17 vH.) und der Asparagin-N (bis 43 vH.) eine bedeutende Verminderung erfahren. Schnitt er Blätter am Abend ab und ließ sie in feuchter Atmosphäre 20 bzw. 48 Stunden im Dunkeln liegen, so beobachtete er einen starken Eiweißabbau und eine bedeutende Vermehrung der Amide (um 64 vH. bzw. 136 vH.) und auch der Aminosäuren (485 vH.). Er schließt aus diesen Ergebnissen, daß in der Nacht Reserveproteine zu Aminosäuren abgebaut und diese abtransportiert werden. Der Transport gehe sehr schnell vor sich und bringe die Spaltungsprodukte des Eiweißes an Orte, wo eine Eiweißbildung auf Kosten von NH_4 -Salzen oder Nitraten nur sehr schwierig vor sich gehe.

KOSUTANY, P. (1897) hat an *Vitis riparia* „sawage“ Untersuchungen über den Nachtstoffwechsel ausgewachsener Blätter angestellt. Doch sind diese Analysen in vieler Beziehung mangelhaft. Zunächst bezieht er auf das Trockengewicht der Blätter. Dann schneidet er sein Versuchsmaterial nachmittags zwischen 2 und 3 Uhr und nachts 3 Uhr. Weiter läßt er die Nachmittag- oder Nachtblätter des öfteren 12 Stunden liegen. Er ist auf Grund einiger Kontrollbestimmungen der Ansicht, daß in dieser kurzen Zeit keine Umsetzungen im Blatt vor sich gehen. SUZUKI hat an anderen Objekten das Gegenteil gezeigt. Seine Ergebnisse stimmen mit den oben angeführten nicht durchgängig überein. Er beobachtet über Nacht eine Vermehrung des Total-N und des Eiweiß-N, eine Anreicherung von präformiertem Ammoniak, völliges Verschwinden des Asparagins und eine Abnahme des löslichen Stickstoffes.

SCHULZE, B. und SCHÜTZ (1909) haben den Nachtstoffwechsel der Blätter von *Acer negundo* sehr eingehend untersucht. Ihre Analysen wurden auf Trockengewicht bezogen und leider am Morgen und Abend desselben Tages ausgeführt, was die mühevollen Untersuchungen stark entwertet. Am Abend beobachteten sie immer einen größeren N-Gehalt, auch eine größere Menge von Eiweiß-N. Der Amid-N zeigt in vielen Fällen am Morgen kleinere Werte, doch wurde er an den Abendanalysen zweimal überhaupt nicht angetroffen. Der NH_3 -N und Aminosäuren-N zeigt unregelmäßige Schwankungen; doch war von jenem am Morgen

meist mehr vorhanden als am Abend. Endlich fanden OTTO und KOOPER (1910), daß eine nächtliche Auswanderung von Stickstoff in ausgewachsenen Blättern stattfindet. Sie ermittelten nur den Total-N und bezogen ihn auf das Frischgewicht.

Um die Differenzen in den beschriebenen Arbeiten aufzuklären und durch eingehendes Studium des Nachtstoffwechsels einen Einblick in die physiologische Bedeutung des Asparagins in ausgewachsenen Blättern zu erhalten, stellte ich selbst eine Anzahl Versuche an, die nun kurz beschrieben werden sollen.

Zunächst erschien es notwendig, die nächtlichen Veränderungen des Frischgewichtes und des Trockengewichtes zu ermitteln, um unter Vermeidung größerer Fehler eine Möglichkeit des Vergleiches verschiedener N-Werte zu finden.

CHIBNALL (1923) hat festgestellt unter Heranziehung einer größeren Zahl von Publikationen über die nächtliche Auswanderung von Stickstoff aus Blättern, daß die Beziehung der gefundenen Stickstoffwerte auf das Trockengewicht immer zu falschen Resultaten führen muß, da die Auswanderung N-haltiger und N-freier Stoffe in sehr verschiedenem Maße vor sich geht. Er ist der Ansicht, daß eine Beziehung auf das Frischgewicht zu genügend genauen Resultaten führt. Ich selbst habe nun einen Vergleich mit den Blattflächen durchgeführt in der Annahme, daß diese bei ausgewachsenen Blättern eine brauchbare Konstante darstellen.

Versuch (siehe Tabelle 4), 3. Mai 1925. Versuchspflanze *Phaseol. multifl.*, in Sand gezogen, 40 cm hoch. Abends 8 Uhr von 12 Pflanzen je ein ausgewachsenes Primärblatt längs der Mittelrippe halbiert. Die eine Hälfte des Blattes wird mit der Mittelrippe an der Pflanze belassen und am nächsten Morgen gegen 8 Uhr abgetrennt, die übrigen 12 Primärblätter werden in gleicher Weise zur Kontrollbestimmung verwendet. Die Pflanzen stehen nachts unter einem Dunkelsturz bei gleichmäßiger Temperatur (15—17° C). Die Blattflächen werden durch Aufzeichnen auf Papier in Gewichtseinheiten der entsprechenden Papierflächen bestimmt; dann wird das Material bei 100° C schnell getrocknet.

Tabelle 4.

	pro Flächeneinheit			in vH. d. Frischgew.		i. vH. d. Tr.-Gew.
	Frischgew.	Trockengew.	mgr. N	Trockengew.	N	N
abends	1,81	0,200	8,31	11,13	0,465	4,18
morgens	1,75	0,185	7,72	10,50	0,441	4,16
abends	1,77	0,199	8,53	11,17	0,479	4,28
morgens	1,73	0,183	7,83	10,57	0,447	4,23

Der Versuch ergibt, daß Blattfläche und Frischgewicht eine annähernd gleichgute Konstante darstellen. Der Gesamt-N nimmt auf das Trockengewicht bezogen nur wenig ab, auf das Frischgewicht be-

zogen sehr erheblich. Der Einfachheit halber wurde deshalb in allen folgenden Analysen das Frischgewicht als Vergleichskonstante benutzt.

Es folgt nun die Beschreibung der Versuche über den Nachtstoffwechsel. Die Ergebnisse sind unten zusammengefaßt (Tabelle 5).

Tabelle 5.

(Stickstoff in vT. des Frischgewichtes, prozentuale Differenzen auf die Abendwerte bezogen.)

	Tag	Erntezeit	NH ₃	2. Amid	Rest	Lösl.	Eiweiß	Total
1. <i>Vicia faba equ.</i> . .	23./24. IX. 24	5 ⁰⁰ h	0,04	0,11	0,43	0,58	4,49	5,07
		7 ⁰⁰ h	0,07	0,06	0,21	0,34	4,21	4,55
	Differenz in vH.		+ 75	- 45	- 50	- 40	- 6	- 10
2. <i>Vicia faba equ.</i> . .	24./25. III. 25	5 ⁰⁰ h	0,05	0,65	0,23	0,93	4,30	5,23
		7 ⁰⁰ h	0,06	0,44	0,19	0,69	4,17	4,86
	Differenz in vH.		+ 20	- 32	- 17	- 26	- 3	- 7
3a. <i>Vicia faba equ.</i> ausgew. Blätter	24./25. IV. 25	6 ⁰⁰ h	0,04	0,12	0,50	0,66	4,90	5,56
		11 ⁰⁰ h	0,05	0,10	0,48	0,63	4,70	5,33
	Differenz in vH.		+ 25	- 17	- 4	- 5	- 4	- 4
3b. <i>Vicia faba</i> . . . junge Blätter	24./25. IV. 25	6 ⁰⁰ h	0,06	0,50	0,93	1,49	7,57	9,06
		11 ⁰⁰ h	0,07	0,51	0,87	1,45	7,45	8,90
	Differenz in vH.		+ 16	+ 2	- 7	- 3	- 2	- 2
4. <i>Lupinus luteus</i> .	16./17. IX. 24	5 ⁰⁰ h	0,03	0,07	0,18	0,28	6,05	6,33
		7 ⁰⁰ h	0,03	0,04	0,13	0,20	5,80	6,00
	Differenz in vH.		-	- 43	- 28	- 29	- 4	- 5
	16./17. IX. 24	5 ⁰⁰ h	0,03	0,06	0,17	0,26	6,23	6,49
		7 ⁰⁰ h	0,03	0,03	0,14	0,20	5,60	5,80
Differenz in vH.		-	- 50	- 18	- 23	- 10	- 11	
5. <i>Phaseolus multifl.</i>	24./25. II. 25	5 ¹⁵ h	0,01	0,25	0,79	1,05	3,83	4,88
		9 ⁰⁰ h	0,01	0,16	0,72	0,89	3,75	4,64
	Differenz in vH.		-	- 36	- 9	- 15	- 2	- 5

1. Versuch. *Vicia faba equ.*, Topfpflanzen. Über Nacht im Dunkelzimmer bei 13°. Fällung Tannin 4 vH.
2. Versuch: *Vicia faba equ.*, im Kalthaus gezogen, sehr frisch. Zur Analyse gelangen je eine Fieder einer größeren Zahl zweifiederiger Blätter. Die übrigen Fiedern werden am Morgen analysiert. Fällung: Tanin 4 vH. heiß.
3. Versuch: Wie unter 2. Stengel durch rote Bändchen in ausgewachsene und wachsende Zone geteilt. Pflanzen nachts im Dunkelzimmer bei 12°.

4. *Versuch: Lupinus luteus*, fruchtende Freilandpflanze. Nur ausgewachsene Blätter ohne Stiele wurden verwendet. Über Nacht unter Dunkelsturz Fällung: Tannin 4 vH.
5. *Versuch: Phaseolus multiflorus*-Pflanzen in temperiertem Haus im Sand gezogen, 40 cm hoch. Am 22. und 23. II. sehr trübes, am 24. II. sonniges Wetter. Nachts im Gewächshaus unter Dunkelsturz bei 22°. Fällung: Tannin 4 vH. heiß.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammenfassend, können wir sagen, daß nachts in den ausgewachsenen Blättern eine Verminderung aller Stickstoff-Fractionen mit Ausnahme des Ammoniaks zu beobachten ist. Es ist kaum anzunehmen, daß dieser Ammoniak ein Abbauprodukt anderer N-haltiger Substanzen darstellt. Vielmehr weist die nächtliche Anreicherung des NH_3 , die auch von anderen Autoren beobachtet wurde, auf eine langsamere Verarbeitung hin. *Unbedeutend ist die Abnahme des Eiweißstickstoffes, bedeutend die des Amid-N, große Schwankungen finden wir in den einzelnen Versuchen bei dem Rest-N, nicht ausgewachsene Blätter zeigen diese Veränderungen nicht oder nur in geringem Maße.*

Diese Erscheinungen sind je nach dem augenblicklichen Stand der Asparaginforschung verschieden beurteilt worden. Der eine Teil der beteiligten Forscher setzt sich für eine Wanderung der Eiweiße ein und deutet das Verschwinden der löslichen Fractionen als eine Eiweißsynthese. Der andere Teil betont die leichte Wanderfähigkeit der löslichen N-Verbindungen und hält eine nächtliche Eiweißspaltung für wahrscheinlich. Die Spaltungsprodukte sollen sehr schnell abtransportiert werden.

Um diese Frage zu klären, stellte ich Untersuchungen über den Nachtstoffwechsel abgeschnittener Blätter an. Solchen Experimenten kann von vornherein entgegeng gehalten werden, daß sie abnormale Bedingungen schaffen und die Ergebnisse keine Rückschlüsse auf den normalen Verlauf gestatten. Doch ist kaum anzunehmen, daß die geringen beobachteten Veränderungen eine so grundsätzliche Verschiebung des N-Gleichgewichtes bedeuten, daß prinzipiell andere Vorgänge in Erscheinung treten. Vielmehr wird man höchstens quantitative Unterschiede beobachten. Dafür spricht auch, daß normalerweise im Blatt bedeutende Verschiebungen des Gleichgewichtes durch äußere Umstände (Temperaturen usw.) möglich sind.

SUZUKI (1897/98) und SAPOSCHNIKOW (1894) haben bereits ähnliche Experimente angestellt, sind aber zu entgegengesetzten Resultaten gelangt. Ich habe zunächst zwei Untersuchungen durchgeführt, über die jetzt berichtet werden soll (siehe Tabelle 6).

1. *Phaseolus multiflorus*-Pflanzen in warmtemperiertem Haus gezogen, ein Meter hoch. Von ausgewachsenen Stengelblättern wurde das mittlere Fiederblatt entfernt, die beiden übrigen Blättchen abgeschnitten, je eines analysiert,

das andere mit der Oberseite auf Wasser gelegt und über Nacht bei 17° ins Dunkelzimmer gebracht.

2. *Vicia faba*-Pflanzen in kalttemperiertem Haus gezogen, 40 cm hoch. Von ausgewachsenen zweifiedrigen Blättern der mittleren Stengelzonen eine Fieder abends analysiert, die andere mit der Oberseite auf Wasser gebracht und über Nacht unter Dunkelsturz bei 12° belassen.

Analysezeiten: 26. II. 25, abends 1/26 Uhr,

27. II. 25, morgens 8 Uhr.

Füllung: Toluol, Tannin 4 vH. heiß.

Tabelle 6.

Stickstoff in		vT. Fr.-Gew.	vH. Total-N				
Fraktionen:			Total	NH ₃	2. Amid.	Rest	Lösl.
I. <i>Phaseolus multifl.</i>	abends	4,82	2,02	4,60	17,58	24,20	75,80
	morgens	4,77	1,14	5,23	20,45	26,82	73,18
II. <i>Vicia faba equ.</i>	abends	5,48	1,32	1,96	8,57	11,85	88,15
	morgens	5,57	0,94	3,23	9,24	13,41	86,59

Eine Auswanderung von Stickstoff aus abgeschnittenen Blättern in so kurzer Zeit ist kaum nachweisbar. Das zeigen auch die auf Abend-Frischgewicht bezogenen Werte des Gesamt-N. Ein Vergleich der einzelnen Fraktionen mit dem Gesamt-N gibt also eine genügende Gewähr für Genauigkeit. Die Ergebnisse dieser beiden Versuche lassen sich so zusammenfassen: Eiweiß- und Ammoniak-N nehmen an Menge ab. Der lösliche N nimmt zu, doch der Amid-N mehr als der Rest-N. Ob diese Steigerung des Amid-N auf das Verschwinden von NH₃-N und zu einem Teil auf hydrolytischen Abbau des Eiweißes zurückzuführen ist, oder ob er einem sekundärem Prozeß seine Entstehung verdankt, ist schwer zu entscheiden. Der erste Versuch ließe sich auf jene Art erklären. Im zweiten Versuch ist die Steigerung des Amid-Gehaltes so bedeutend, daß nur eine Entstehung auf anderem Wege erklärlich erscheint.

c) Der Einfluß der Temperatur.

Wenn die Annahme zu Recht besteht, daß die Amide insbesondere bei Kohlehydratmangel in Pflanzen entstehen und die Rolle eines Entgifters des im Atmungsstoffwechsel aus abgebautem Eiweiß entstehenden Ammoniaks spielen, müssen verschiedene Temperaturen auf den Stickstoffhaushalt der Blätter mindestens bei Kohlehydratmangel von wesentlichem Einfluß sein. Doch bietet die vorhandene und in der Einleitung erwähnte Literatur genügend Hinweise, daß der Begriff des Kohlehydratmangels ein recht schwankender ist. So sind Asparagin und Glutamin oft in Pflanzen beobachtet worden, wo von einem Kohlehydratmangel nicht die Rede sein kann (SCHULZE 1880).

Auch DELEANO (1912) hat bei der Untersuchung des Atmungsstoffwechsels abgeschnittener Blätter beobachtet, daß ein oxydativer Abbau des Eiweißes bereits vor dem völligen Verschwinden der Kohlehydrate eintritt. Es erschien deshalb angebracht, den N-Stoffwechsel ausgewachsener Blätter unter verschiedenen Bedingungen der Temperatur zu untersuchen. Auch hier sollen zunächst „normale“ Verhältnisse behandelt werden. Später werde ich noch länger dauernde Versuche erwähnen, die mit abgeschnittenen Blättern im Dunkeln bei verschiedenen Temperaturen ausgeführt wurden. Die folgenden Versuche (Tabelle 7) wurden mit ausgewachsenen Blättern junger Pflanzen angestellt:

Tabelle 7.

Stickstoff in		vT.Fr.-Gew.	vH. Total-N				
			Total	2. Amid. + NH ₃	Rest	Lösl.	Eiw.
1	warm	3,80	5,11	13,10	18,21	81,79	
	kalt	4,44	3,01	10,67	13,68	86,32	
2	A	abends kalt	4,44	3,01	10,67	13,68	86,32
		morgens warm	4,21	3,26	11,74	15,00	85,00
	B	abends warm	3,80	5,11	13,10	18,21	81,79
		morgens kalt	3,52	4,63	13,41	18,04	81,96
3	abends	warm		3,04	13,35	16,39	83,61
		kalt		3,52	13,45	16,97	83,03
	morgens		2,45	11,31	13,76	86,24	
4	abends	warm		(5,11)	(13,16)	(18,27)	(81,73)
		kalt		7,81	18,29	26,10	73,90
	morgens		3,30	13,40	16,70	83,30	

1. Versuch: *Vicia faba equ.*, Topfpflanze im Kalthaus bei 8° gezogen. Am 11. XI. 24 wurde ein Teil der Pflanzen in ein warm temperiertes Haus gebracht. Am 20. XI. wurden von beiden Pflanzenserien ausgewachsene Blätter gleichen Alters geschnitten und analysiert. Fällung Toiuol, Tannin 4 vH. heiß.
2. Versuch: Pflanzen wie unter 1. vorbereitet. Von einer größeren Zahl von Blättern, sowohl der kaltgezogenen Pflanzen (A) als auch der warmgezogenen (B) wurde je eine Fieder am Abend 1/25 Uhr untersucht. Die Kalthauspflanzen wurden über Nacht in ein Warmhaus bei 15—17° gebracht, die warm gezogenen in ein Nordhaus bei 3° gestellt. Die Morgenanalysen wurden um 1/29 Uhr ausgeführt. Die Beziehung des Gesamt--N auf das Frischgewicht erscheint wertlos, da der Wassergehalt der Blätter bei so starken Temperaturunterschieden beträchtliche Schwankungen aufweist. Fällung wie unter 1.
3. Versuch: *Vicia faba equ.*, Topfpflanzen, 30 cm hoch, im Kalthaus gezogen. Am 17. XI. 24 wurde ein Teil der ausgewachsenen Blätter analysiert. Die Pflanzen wurden über Nacht teils in ein Warmhaus unter Dunkelsturz bei

21° gebracht, teils in ein Nordhaus bei 3°. Die Morgenanalysen wurden 7^h30 ausgeführt. Sonst wie unter 2. Trotzdem möglichst gleichaltrige Blätter ausgesucht wurden, konnte in diesem Versuch nicht die Genauigkeit erreicht werden, wie in den ersten beiden.

4. *Versuch*: *Vicia faba equ.*, Warmhauspflanzen, wie unter 2 B. Am 20. XI. 5^h wurden von 16 Blättern die Hälfte der Fiedern über Nacht auf Wasser schwimmend in einem Thermostaten bei 28—29° gebracht, der übrige Teil ebenfalls auf Wasser in ein Nordhaus bei 3°. Die Abendwerte sind aus dem Versuch Nr. 2 entnommen, stellen also keine für diese Blätter geltenden exakten Werte dar.

Diese Versuche lassen den Schluß zu, daß auch in Blättern, die reich an Stärke sind, Temperaturschwankungen einen wesentlichen Einfluß auf die Zusammensetzung des Total-N haben. Je höher die Temperatur ist, desto mehr lösliche Verbindungen finden wir vor; der Amid-N weist stärkere Veränderungen auf als der Rest-N. Die durch solche äußere Einflüsse bedingten Veränderungen gehen sehr schnell vor sich, so daß große Vorsicht bei der Beurteilung der Versuche über den Nachtstoffwechsel am Platze ist. Während normalerweise eine starke nächtliche Verminderung des Amidgehaltes in ausgewachsenen, an der Pflanze belassenen Blättern nachweisbar ist, finden wir in „sehr warmen Nächten“ das Gegenteil. Besonders groß sind die Differenzen bei abgeschnittenen Blättern. Der Versuch läßt die Vermutung als begründet erscheinen, daß im Blatt drei Vorgänge nebeneinander gleichzeitig verlaufen: eine Eiweißsynthese auf Kosten von Asparagin, eine hydrolytische Eiweißspaltung mit nachfolgendem oxydativen Abbau der Spaltungsprodukte unter Asparaginbildung und ein Abtransport der löslichen Verbindungen. Diese Vorgänge laufen bei verschiedenen Temperaturen mit verschiedenen Geschwindigkeiten ab, so daß bald der eine, bald der andere in den Analysen in die Erscheinung tritt.

II. Pflanzen in Kohlehydrathunger.

Wie in der Einleitung erwähnt, haben eine Reihe von Arbeiten ergeben, daß zwischen dem Kohlehydratgehalt der Pflanzen und dem Auftreten des Asparagins enge Beziehungen bestehen. Erstens kann Kohlehydratmangel einen oxydativen Eiweißabbau zwecks Gewinnung von nutzbarer Energie zur Folge haben. Daß normalerweise eine solche „Eiweißatmung“ vor sich geht, ist nach neueren Arbeiten kaum wahrscheinlich (vgl. KOSTYTSCHEW 1924). Doch haben verschiedene Forscher einen dauernden oxydativen Abbau des Eiweißes für möglich gehalten; nach ihrer Ansicht kommt den Kohlehydraten die Rolle zu, das Atmungsmaterial = Eiweiß aus seinen Spaltprodukten zu regenerieren. Ein Mangel an Kohlehydraten müßte also eine Anhäufung dieser Endprodukte zur Folge haben. Wenn auch diese Hypothese wenig Wahrscheinlichkeit besitzt, schien es doch angebracht, den N-Stoffwechsel bei Kohlehydratmangel in ausgewachsenen Blättern zu studieren. Außer

CHIBNALL (1922 II und 1924 VI) haben sich MIJACHI (1896—97), SUZUKI (1897—98), SAPOSCHNIKOW (1894) und DELEANO (1912) mit solchen Untersuchungen befaßt. Sie haben übereinstimmend festgestellt, daß in verdunkelten abgeschnittenen Blättern ein starker Eiweißabbau vor sich geht mit gleichzeitiger Anhäufung von löslichem N, besonders von Amid-N.

Mir erschien es ratsam, mit Versuchen an verdunkelten Pflanzen zu beginnen, dann mit Experimenten an einzelnen, verdunkelten Blättern an normal belichteten Pflanzen zu solchen mit verdunkelten, abgeschnittenen Blättern überzugehen. Nachdem ich in einer Reihe von Analysen an Topf- und Freilandpflanzen durch längere Verdunkelung eine starke Abnahme an Gesamt-N und Eiweiß-N in ausgewachsenen Blättern beobachtet hatte, der eine Zunahme des löslichen N parallel lief, stellte ich folgende Versuche an (Tabelle 8):

Tabelle 8.

	Stickstoff in Fraktionen	vT. Frisch- gewicht	vH. Total-N				
		Total	NH ₃	2-Amid.	Rest	Lösl.	Eiweiß
1 V. f.	12. I. 1925.	5,30	0,8	2,3	6,9	10,0	90,0
	nach 4 Tagen	5,15	1,1	2,3	7,4	10,8	89,2
	nach 8 Tagen	4,13	0,8	3,0	7,5	11,3	88,7
	nach 18 Tagen	3,90	1,1	7,7	9,4	18,2	81,8
2 L. a.	26. I. 1925.	5,43	0,9	3,0	6,6	10,5	89,5
	12 Tage dunkel	3,44	1,6	8,3	5,1	15,0	85,0
	26. I. 1925.	5,23	0,9	2,9	6,6	10,4	89,6
	12 Tage normal	4,60	1,0	3,2	6,4	10,6	89,4
3 Ph. m.	18. VI. 1925.	—	1,5	1,8	6,1	9,4	90,6
	5 Tage dunkel	—	1,6	4,8	10,1	16,5	83,5

1. *Vicia faba*, Topfpflanzen, in einem Kalthaus während des Winters unter Glas gezogen, 40 cm hoch, gleichmäßig gewachsen, Blätter frisch grün. Die zur Untersuchung ausgewählten Pflanzen wurden durch ein rotes Bändchen in zwei Zonen geteilt. Die Blätter der unteren Zone von 3—5 Pflanzen wurden zu den Analysen verwendet. Die Pflanzen wurden 18 Tage lang in ein kalt temperiertes Gewächshaus unter einen Dunkelschirm gebracht und in gewissen Abständen analysiert. Nach 8 Tagen begannen einzelne Blättchen gelblich grün zu werden. Nach 18 Tagen war die Mehrzahl gelb gefärbt. Fällung Tannin 4 vH. heiß.

2. *Lupinus albus*, in einem kalt temperierten Gewächshaus gezogen, schön gleichmäßig gewachsen. Nach einer Zonenteilung wie bei Versuch 1 wurden die ausgewachsenen Blätter der Hälfte der Pflanzen von je einem der beiden Töpfe analysiert; der eine Topf unter einen Dunkelschirm gebracht, der andere unter normalen Verhältnissen belassen. Nach 12 Tagen zeigten die Blätter der Dunkelpflanzen gelbe Flecken. Der Versuch wurde abgebrochen. Fällung Tannin 4 vH. heiß.

3. *Phaseolus multiflorus*, etwa 50 cm hoch. Die Hälfte der Primärblätter von 6 Pflanzen wurde am 18. VI. analysiert; die Pflanzen 5 Tage dunkel gestellt, dann die übrigen Primärblätter analysiert. Fällung Toluol, Tannin heiß.

Obgleich auch in den normal beleuchteten Pflanzen eine Verminderung des Total-N zu beobachten ist, tritt diese Erscheinung in den verdunkelten Pflanzen weit stärker auf. Neben dieser Verminderung des Total-N verschiebt sich bei diesen innerhalb der einzelnen Fraktionen das Verhältnis zugunsten des löslichen Stickstoffes, und zwar nimmt der Amid-N in stärkerem Maße zu als der Rest-N. In den beleuchteten Pflanzen ist eine wesentliche Verschiebung der Verhältnisse nicht zu beobachten.

4. Versuch (siehe Tabelle 9): *Phaseol. multifl.*, in einem kleinen Kalthaus gezogen, 30 cm hoch, gleichmäßig entwickelte Pflanzen.

A. Von 6 Pflanzen wurden 6 Primärblätter am 18. IV. 11^h analysiert. Die Pflanzen wurden unter einen Dunkelschirm gebracht. Die übrigen 6 Primärblätter wurden am 24. IV. 5^h analysiert. Farbe der Blätter: 4 schön grün, 1 gelblich grün, 1 gelb.

B. 6 Pflanzen wurden in ein südliches Gewächshaus bei normaler Beleuchtung gebracht und vor direkter Bestrahlung geschützt. 6 Primärblätter wurden mit Stanniol bedeckt, die übrigen unbedeckt gelassen.

Analysen am 22. IV. 5^h.

Verdunkelte Blätter: 2 völlig gelb, aber turkescent,
2 gelbgrün, 2 grün;

Beleuchtete Blätter: 6 frisch grün.

Temperaturen im Durchschnitt: 17°, Beleuchtung: gut.

Tabelle 9.

N in	vT. Frischgewicht			vH. Total-N				
	Lösl.	Eiw.	Total	NH ₃	2. Amid	Rest	Lösl.	Eiw.
zu Beginn	0,48	3,04	3,52	0,9	4,2	8,6	13,7	86,3
nach 4 Tagen	0,66	2,52	3,18	2,5	6,4	12,1	21,0	79,0
A prozentualer Unterschied	+ 37	- 17	- 9,6	—	+ 52	+ 41	+ 53	- 8,5
4 Tage belichtet	0,32	2,79	3,11	1,1	2,7	6,2	10,0	90,0
4 Tage dunkel	0,37	2,10	2,47	1,5	4,0	9,3	14,8	85,2
B prozentualer Unterschied	(+ 16)	(- 25)	(- 21)	—	(+ 48)	(+ 50)	(+ 48)	(- 5,3)

Dieser Versuch zeigt prinzipiell dieselben Ergebnisse wie die Versuche 1—3. Auffällig ist, daß die Verminderung an Total-N in verdunkelten Blättern beleuchteter Pflanzen stärker ist als in ganz verdunkelten. Diese stärkere Verminderung des Eiweißgehaltes tut sich äußerlich kund in der gelberen Farbe der Blätter.

Auf Grund der Versuche über den Nachtstoffwechsel liegt die Vermutung nahe, daß der Verlust an Total-N durch Auswandern löslicher

Eiweißzerfallsprodukte verursacht wird. Um diese Zerfallsprodukte zu erfassen, wurden Experimente mit abgeschnittenen Blättern angestellt, die entweder mit den Stielen sich in Wasser befanden oder mit ihrer Oberseite auf Wasser schwammen. Gegen solche Untersuchungen können von vornherein zwei Einwände gemacht werden: Zunächst werden abnormale Bedingungen geschaffen. Die verhinderte Ableitung kann Gleichgewichtsstörungen hervorrufen. Da jedoch auch normalerweise in Blättern unter gewissen Bedingungen hohe Konzentrationen von löslichem N beobachtet werden und die Gleichgewichtsstörung zunächst nur in einer Verringerung der Geschwindigkeit der ablaufenden Prozesse gesehen werden kann, ist zu erwarten, daß sich die Abnormalität nicht in einer prinzipiellen Verschiedenheit der ablaufenden Prozesse zeigt, sondern eben nur in einer graduellen.

Ein zweiter Einwand könnte in der Behauptung bestehen, daß bei einer solchen Versuchsanordnung ein Verlust von N durch Auswandern in das Wasser das Ergebnis fälscht. Nun habe ich bei vielen Bestimmungen des Total-N, auf Frischgewicht bezogen, keine wesentlichen Änderungen beobachten können. Eine Klärung dieser Frage brachte aber folgender Versuch: 12 Primärblätter von *Phaseolus multiflorus* wurden mit den Stielen in mit Wasser gefüllte Kölbchen gebracht und 8 Tage darin gelassen. Dann wurde das Wasser eingedampft und einer KJELDAHL-Bestimmung unterworfen. Es enthielt 0,28 mg N, das ist ungefähr 0,4 vH. des Total-N der 12 Blätter (vgl. auch DELEANO 1912). Als Fehlerquelle können also diese Spuren nicht angesehen werden.

Es folgt nun die Beschreibung der Versuche. Um Wiederholungen zu vermeiden, sei angeführt, daß in allen Fällen zu Kontrollbestimmungen gegenständige Fiedern oder gegenständige Primärblätter verwendet wurden. Zu jeder Bestimmung dienten 4—7 g frische Blattmasse. Die Nummern der Versuche decken sich mit denen der Tabelle 10, die die Ergebnisse enthält.

1. *Vicia faba*, Freilandpflanzen, Beginn am 16. VII. 24 nach einer Reihe sonniger Tage. Fällung: Phosphormolybdänsre kalt +5 vH. Alkohol. Nach 6 Tagen abgebrochen, Blätter gelblich und fleckig. Total-N: 7,25 vT. Frischgewicht.
2. *Lupinus luteus*, Freilandpflanzen. Beginn 22. IX. 24. Fällung: Tannin 4 vH. Total-N: 5,8 vT. Frischgewicht.
3. *Linosyris vulgaris*, Freilandpflanzen, grundständige Blätter. Beginn 6. V. 25. Total-N.: 6,3 vT. Frischgewicht. Nach 7 Tagen abgebrochen, Blätter noch frisch grün. Fällung Tannin heiß.
4. *Vicia faba*, 40 cm hohe Kalthauspflanzen, vor dem Versuch 14 Tage im Freien. Beginn 17. IV. 25. Blätter auf Wasser schwimmend bei 15°. Nach 5 Tagen Blättchen gelblich. Fällung: Tannin heiß (siehe Abb. 2).
5. *Phaseolus multiflorus*, 50 cm hoch; Primärblätter. Fällung: Tannin. Beginn 21. VI. 25.
6. Ebenso, Pflanzen nur Primärblätter ausgebildet. Beginn 18. VI. 25. Fällung: Tannin.

Tabelle 10.

	Stickstoff in	vH. Total-N					vH. Löslich N		
	von	NH ₃	2. Amid.	Rest	Lösl.	Eiw.	NH ₃	2. Amid.	Rest
1. <i>Vicia faba</i>	16. VII.	0,25	2,33	6,33	8,91	91,09	2,87	26,15	70,89
		0,26	2,33	6,11	8,70	91,30	2,98	26,78	70,24
	nach 1 Tag	0,25	3,78	12,98	17,01	82,99	1,47	22,22	76,31
		0,25	3,80	12,96	17,01	82,99	1,47	22,34	76,19
	nach 4 ³ / ₄ Tagen	0,94	12,49	16,79	30,22	69,78	3,11	41,33	55,56
		0,88	12,25	19,27	32,40	67,60	2,71	37,89	59,40
	nach 6 Tagen	2,60	13,07	17,38	33,05	66,95	7,81	39,54	52,65
2. <i>Lupinus luteus</i>	durchschnittlicher Anfangswert . . .	1,00 3,00 4,00 96,00					25 75		
	nach 3 Tagen	0,38	5,06	11,54	16,98	83,02	2	29	69
		0,50	4,85	11,39	16,74	83,26			
	" 5 "	1,26	13,11	16,29	30,66	69,34	4	41	55
		1,34	12,55	19,41	33,30	66,70			
3. <i>Limosyris vulgaris</i>	Anfangswert	1,2	0,8	7,4	9,4	90,6	13	9	78
	nach 5 Tagen	1,1	4,2	13,4	18,7	81,3	6	23	71
	" 7 "	1,1	5,9	16,9	23,9	76,1	5	25	70
4. <i>Vicia faba</i>	Anfangswert	0,46	4,14	8,60	13,20	86,80	4	31	66
	nach 1 Tag	0,51	4,78	8,11	13,40	86,60	4	36	60
	" 2 Tagen	0,62	5,42	9,61	15,65	84,35	4	35	61
	" 3 "	0,70	7,60	12,80	21,10	78,90	3	36	61
	" 4 "	1,20	9,40	15,30	25,90	74,10	5	36	59
	" 5 "	1,30	14,80	13,70	29,80	70,20	4	50	46
" 8 "	2,40	22,90	17,40	42,70	57,30	6	53	41	
5. <i>Phas. multifl.</i>	Anfangswert	1,5	1,8	6,1	9,4	90,6	16	19	65
	nach 8 Tagen	3,0	21,2	14,9	39,1	60,9	8	54	38
6. <i>Phas. multifl.</i>	Anfangswert	1,2	1,3	5,2	7,7	92,3	16	17	67
	nach 8 Tagen	1,6	10,7	25,0	37,3	62,7	4	29	67

Die *Ergebnisse* lassen sich folgendermaßen zusammenfassen (siehe Abb. 2): In abgeschnittenen, verdunkelten Blättern geht ein starker Eiweißabbau vor sich, dessen Geschwindigkeit nach Maßgabe der Pflanzenart und sonstigen Eigenschaften der Blätter (Kohlehydratgehalt, Alter) ein bestimmtes Maximum besitzt. *Das Gelbwerden der Blätter deutet einen weit vorgeschrittenen Abbau an, zugleich aber auch den tödlichen Ausgang des Experimentes. Je mehr sich der Eiweißzerfall diesem Ende nähert, desto geringer ist seine Geschwindigkeit.*

Die Veränderungen innerhalb des löslichen N sind mannigfacher Art. Zunächst ist eine stärkere Bildung des Rest-N zu bemerken; doch

holt der Amid-N seine Anfangswerte bald wieder ein und nimmt prozentual mehr zu als der Rest-N. Der Amid-N erreicht Werte bis zu 50 vH. des löslichen Stickstoffes, wie wir es sonst in ausgewachsenen Pflanzen nur in Achsenorganen finden. Gegen Ende der länger dauernden Experimente beobachten wir neben der früh einsetzenden absoluten Steigerung des Ammoniak-N auch eine relative, bezogen auf den löslichen Stickstoff. *Diese Vermehrung des Ammoniaks geht, wie es scheint, auf Kosten des Rest-N vor sich. Die Bedingungen zur Bildung des Amid-N scheinen nicht mehr erfüllt zu sein.*

Wir können aus diesen Befunden schließen, daß der oxydative Abbau N-haltiger Substanz erst nach 2—4tägiger Verdunkelung die hydrolytischen Prozesse überwiegt. Einige beiläufige Beobachtungen und die

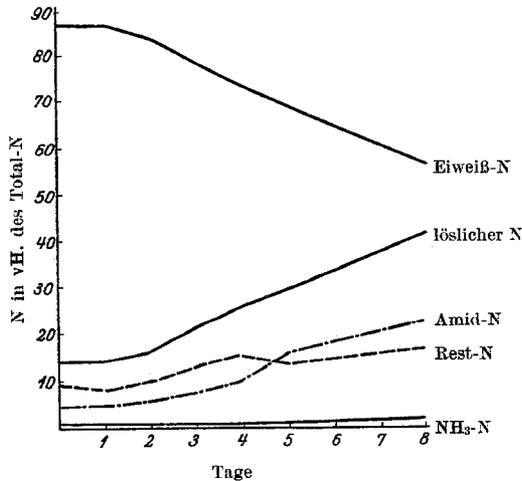


Abb. 2 zu Tafel 10,4. *Vicia faba*-Blätter 8 Tage im Dunkeln bei 15° C

Abhängigkeit der Geschwindigkeit enzymatischer Prozesse von der Temperatur veranlaßten mich, diese Experimente teilweise zu wiederholen, um den Einfluß der Temperatur auf diese Vorgänge zu studieren.

1. Versuch (Tab. 11): *Lupinus luteus*, Freilandpflanzen, Blätter trotz des Spätherbstes (4. XI. 24) noch schön grün. Abgeschnittene Blätter mit Stielen in Wasser

A. bei 22°.

B. bei 6°.

Die warmgestellten Blätter zeigten nach 6 Tagen gelbe Flecke, deshalb wurde der Versuch abgebrochen; die kaltgestellten waren noch grün.

2. Versuch (Tab. 11, 2.): *Xanthosoma violacea*, im Palmenhaus gezogen. Am 5. XII. 24 wurden 3 noch nicht völlig ausgewachsene Blätter analysiert. 3 gleichaltrige und gleichgestaltete wurden mit den Stielen in Wasser ins Dunkle gebracht und 3 Tage so im Palmenhaus belassen. Der Versuch

wurde dann abgebrochen, weil die Blätter zwischen den Nerven gelb wurden. Weitere 3 Blätter wurden 4 Tage lang ins Dunkle bei 5° C mit den Stielen in Wasser gebracht. Sie blieben trotz der ungewohnten niederen Temperatur schön frisch und grün.

Tabelle II.

Stickstoff in		vH. des Total-N					vH. des Lösl.-N			
		NH ₃	2. Amid.	Rest	Lösl.	Eiw.	NH ₃	2. Amid.	Lösl.	
1. <i>Lup.</i> <i>lut.</i>	anfangs		0,1	1,14	6,52	7,76	92,24	1,29	14,68	84,03
	nach 2 ¹ / ₄ Tagen	warm	0,22	6,71	15,77	22,70	77,30	0,97	29,56	69,47
		kalt	0,17	2,18	5,17	7,52	92,48	2,26	28,99	68,75
	nach 3 ¹ / ₄ Tagen	warm	0,65	10,80	15,36	26,81	73,19	2,43	40,28	57,29
		kalt	0,30	2,62	5,65	8,57	91,43	3,55	30,57	65,88
	6 Tage	warm	5,09	13,66	16,14	34,89	65,11	14,58	39,14	46,28
		kalt	0,42	3,00	4,97	8,39	91,61	5,00	35,76	59,24
	2. <i>Xanth.</i> <i>viol.</i>	anfangs		0,13	0,38	5,67	6,18	93,82	2,1	6,2
3 Tage		warm	0,13	1,58	12,73	14,44	85,56	1,0	11,0	88,0
4 Tage		kalt	0,1	0,69	3,70	4,49	95,51	(2,2)	15,3	82,5

Diese Versuche zeigen, daß die beiden uns interessierenden Prozesse, die hydrolytische Eiweißspaltung und der oxydative Abbau der Spaltungsprodukte, von der Temperatur in verschiedenem Maße abhängig sind. Im ersten Versuch wird der Eiweißabbau in der Kälte völlig sistiert, die Bildung von Asparagin geht aber weiter, wenn auch bedeutend langsamer als in der Wärme. Der Wärmeversuch zeigt äußerlich schon an der Farbe der Blätter, daß der Eiweißabbau weit vorgeschritten ist. Auch zeigt sich hier eine wesentliche Ammoniakbildung.

Der Parallelversuch mit einer amidarmen Aracee zeigt in der Kälte trotz der Bildung von Asparagin eine Vermehrung des Eiweißes auf Kosten von Rest-N.

III. Anreicherung von Kohlehydraten.

Die oben beschriebenen Versuche haben eindeutig bewiesen, daß bei Kohlehydratmangel ein starker Eiweißabbau stattfindet. Die Anhäufung von Amidon und Ammoniak deuten ferner an, daß neben hydrolytischen Prozessen Oxydationen vorkommen, deren Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur und von dem vorhandenen N-freien Atmungsmaterial in starkem Maße abhängig ist. Es besteht nun die Frage, ob *nur* bei Kohlehydratmangel ein solcher Eiweißabbau stattfindet. Spricht doch das normale Vorkommen von Amidon in ausgewachsenen Blättern dafür, daß immerwährend eine Bildung solcher Stoffe vor sich geht; vielleicht verhindern die anwesenden Kohlehydrate

lediglich ihre Anhäufung. Zur Klärung dieser Frage mußten Versuche angestellt werden, bei denen ganze Pflanzen oder einzelne Blätter künstlich mit Kohlehydraten angereichert wurden, das Verhältnis C : N also zugunsten des Kohlenstoffes verschoben wurde. Doch soll gleich bemerkt werden, daß die Versuche mit ganzen Pflanzen keine brauchbaren Ergebnisse lieferten, da feinere Schwankungen der Zusammensetzung nur dann mit unserer Methode exakt bestimmt werden können, wenn einwandfrei einheitliches Material zur Verfügung steht. Dieses Idealmaterial war aber für derartige Versuche nicht auffindbar. Die Kohlehydratanreicherung in abgeschnittenen Blättern, in denen also eine Ableitung annähernd verhindert war, geschah teils durch normale Beleuchtung, teils in Dunkelversuchen durch künstliche Glucoseernährung. Diese Experimente wurden so durchgeführt, daß die Blätter mit den Stielen in wassergefüllten Kölbchen standen und der normalen Beleuchtung ausgesetzt waren unter Vermeidung direkter Besonnung. Die Stiele wurden täglich etwas gekürzt, um eine Verstopfung der Leitungsbahnen durch Bakterien zu verhindern. Soweit es sich um künstliche Kohlehydratzufuhr handelte, wurde die Versuchsanordnung entweder ebenso getroffen, nur daß an Stelle des Wassers eine sterilisierte Traubenzuckerlösung trat, oder die Blätter wurden mit der Oberseite auf eine solche Lösung gelegt. In beiden Fällen wurde die Lösung täglich erneuert. Da die Versuche mit schwimmenden Blättern im allgemeinen besser ausfielen und sie später in anderen Ernährungsversuchen des öfteren wiederholt wurden, versuchte ich, eine Sterilisierung meiner Blätter ohne Schädigung zu ermöglichen.

Es ist bekannt (siehe KLEIN u. KISSER 1924), daß Bakterien gegen Wasserstoffperoxyd eine größere Empfindlichkeit zeigen als höhere Pflanzen, sofern sie unverletzt sind. Andernfalls zeigt sich an den Wunden die bekannte Katalasewirkung, der eine Bräunung der Wundzonen folgt. Meines Wissens ist eine Sterilisierung von Blättern durch H_2O_2 kaum zu Stoffwechselversuchen benutzt worden. Deshalb sei kurz darauf eingegangen.

Blätter verschiedener Pflanzen und verschiedenen Alters besitzen eine sehr verschiedene Widerstandsfähigkeit gegen H_2O_2 . So werden Schädigungen schon innerhalb der Konzentrationen 1—2,5 vH. H_2O_2 beobachtet, die sich meist durch eine anfangs leichte Bräunung der Nerven und ihrer Verzweigungsstellen, wohl auch der Blattränder bemerkbar machen. Besonders empfindlich zeigen sich verwundete und von Läusen befallene Blätter. Im allgemeinen arbeitete ich mit einer 0,5—2 proz. Lösung, in der die Blätter 10—15 Minuten untergetaucht lagen. Sie wurden dann vorsichtig auf sterilisierte Lösungen in sterilisierte Glasschalen mittels Pinzetten gebracht. Ich habe nur selten selbst nach 5tägigem Liegen der Blätter auf Glucoselösung eine Bakterien-

oder Pilzinfektion feststellen können trotz mikroskopischer Untersuchung der Blattoberflächen, während unbehandelte Blätter meist schon nach 2 Tagen stark befallen waren und eigentümliche, runde Zersetzungsherde des Parenchyms der Blattspreiten aufwiesen. Trotzdem habe ich bei allen Versuchen die sterilisierte Lösung mindestens aller 2 Tage erneuert und die Blätter beim Umlegen abermals kurze Zeit mit H_2O_2 behandelt. Daß diese einfache Methode zu so befriedigenden Resultaten führt, liegt wohl daran, daß nach BURRI (1903) auf Blättern im allgemeinen nur Bakterienarten aufgefunden worden sind, die nicht zu den Sporenbildnern gehören.

Ich komme nun zur Beschreibung der einzelnen Versuche, die in der folgenden Tabelle zusammengefaßt sind. Da Einzelheiten über die Aufzucht der Versuchspflanzen für die Beurteilung der Ergebnisse kaum von Bedeutung sind, soll auf eine genauere Beschreibung verzichtet werden. Um einen Überblick über die Beschaffenheit der ausgewachsenen Blätter zu geben, von denen stets die untersten, bei *Phaseolus* also stets die Primärblätter verwendet wurden, sind der Tabelle kurze Notizen über das Alter der Pflanzen bzw. ihre Höhe, den Gehalt an Total-N und den Beginn des Versuches als Kennzeichen der Jahreszeit beigegeben, ebenso wurden die Temperaturen, bei denen die Experimente abliefen, vermerkt. Es ist nur noch zu erwähnen, daß bei den Ernährungsversuchen meist die Blatthälftenmethode angewendet wurde, und daß bewirkt wurde, daß die Pflanzen im ammoniakarmen Zustande zur Verwendung gelangten. Alle Versuche, bei denen keine Angaben über die Beleuchtung gemacht sind, sind im Dunkeln ausgeführt worden.

Die Ergebnisse dieser Versuche, die in Tabelle 12 dargestellt sind, zeigen, daß abgeschnittene Blätter unter normalen Beleuchtungsverhältnissen sehr verschiedenartige Veränderungen ihres Gehaltes an N erleiden. Im allgemeinen war ein Eiweißabbau festzustellen unter Vermehrung des Amid- und Rest-N. Dieser Eiweißabbau erreicht bei *Lupinus* die Werte der Dunkelkulturen, bei *Phaseolus* war er im allgemeinen schwächer. Die Beleuchtungsintensität konnte bei diesen Experimenten wohl eine große Rolle spielen. Da aber alle Blätter nach der Beleuchtungsperiode Stärke enthielten außer im Versuch 1c, kann von einem Kohlehydratmangel nicht gesprochen werden. In einem einzigen Versuch (4) konnte eine Eiweißsynthese auf Kosten des Rest-N konstatiert werden. Der Amid-N nahm in diesem Falle nur wenig ab. Auffällig ist, daß im Gegensatz zu den entsprechenden Dunkelversuchen der Steigerung der Amide keine Ammoniakanhäufung parallel ging.

Diese überraschenden Ergebnisse stimmen im wesentlichen mit Versuchen CHIBNALLS (1924 VI) überein; auch er beobachtete in normal beleuchteten abgeschnittenen Blättern von *Phaseolus multiflorus* inner-

Tabelle 12.

Stickstoff in		vT. Fr.-Gew.	vH. Total-N					
Material	Versuch	Anmerk.	Total	NH ₃	2. Amid.	Rest	Lösl.	Eiw.
1. <i>Lupinus luteus</i> (50 cm)	Anfangswert		5,2	—	1	3	4	96
	3 Tage im Licht	wolkig		0,35	6,89	9,23	16,47	83,53
	5 Tage im Licht	wolkig		0,38	5,51	11,83	17,72	82,28
2. <i>Phas. multifl.</i> (40 cm)	1. III. 25		4,33	0,1	8,8	11,9	20,8	79,2
	2 ¹ / ₄ Tg. im Licht	sonnig		0,1	13,0	17,2	30,3	69,7
3. <i>Phaseolus multiflorus</i> (40 cm)	25. III. 25		4,05	0,06	4,41	13,05	17,52	82,48
	3 Tage im Licht	7° C Nebel		0,07	6,60	15,11	21,78	78,22
	3 „ dunkel	14° C „		0,60	10,23	19,21	30,04	69,96
	6 Tg. Glucose 1 vH.	14° C „		0,07	11,23	18,15	29,45	70,55
4. <i>Phas. multifl.</i> (jg. Pflanz.)	3. IV. 25		5,03	0,1	7,1	11,1	18,3	81,7
	4 Tage im Licht	sehr sonnig		0,1	6,3	3,1	9,5	90,5
5. <i>Phas. multifl.</i> (50 cm)	24. III. 25		4,42	0,07	4,92	8,30	13,29	86,71
	6 Tg. Glucose 2 vH.	(13,5° C)		0,07	7,08	13,57	20,72	79,28
6. <i>Phas. multifl.</i> (40 cm)	16. III. 25		5,02	0,1	8,8	13,9	22,8	77,2
	5 Tg. Glucose 2,5 vH.	(21° C)		0,1	12,6	14,1	26,8	73,2
7. <i>Phaseolus multiflorus</i> (jg. Pflanz.)	14. II. 25		5,37	0,18	4,98	19,89	25,05	74,95
	4 Tg. Glucose 2,5 vH.	17° C		0,20	4,95	16,61	22,06	77,94
	2 Tage H ₂ O	24° C		1,53	7,83	31,11	40,47	59,53
	2 Tg. Glucose 2,5 vH.	24° C		0,23	5,73	21,35	27,31	72,69
8. <i>Phaseolus multifl.</i> (40 cm)	A 3. IV. 25		4,65	0,1	7,0	12,0	19,1	80,9
	A 4 Tg. Glucose 4 vH.	17° C		0,1	7,3	12,1	19,5	80,5
	B 3. IV. 25			0,1	6,5	11,7	18,3	81,7
	B 4 Tage H ₂ O	17° C		0,7	22,2	12,4	35,3	64,7
9. <i>Phas. multifl.</i> (40 cm)	1. IV. 25		4,0	0,1	8,5	9,8	18,4	81,6
	5 Tg. 5—7 vH. Gluc.	14° C		0,1	7,8	8,7	16,6	83,4
10. <i>Vicia faba</i>	30. I. 25		4,98	0,17	12,79	20,69	33,65	66,35
	3 Tg. H ₂ O + CaSO ₄	12° C		0,65	14,34	25,58	40,67	59,33
	3 Tg. 2 vH. Glucose + CaSO ₄	12° C		0,25	11,78	22,47	34,51	65,49
11. <i>Vicia faba</i> (stärkearm)	24. III. 25		5,15	0,13	9,77	5,62	15,72	84,28
	3 Tg. Glucose 1 vH.	23° C		0,13	24,37	19,15	43,65	56,35
12. <i>Lupinus albus</i> (blühend)	20. III. 25		6,1	0,1	3,0	9,3	12,4	87,6
	3 Tage H ₂ O			0,4	14,9	14,1	29,4	70,6
	1 Tg. 1,25 vH. Gluc.; 3 Tg. H ₂ O	20° C		0,1	7,3	12,2	19,6	80,4
	3 Tg. 2,5 vH. Glucose			0,1	3,6	11,6	15,3	84,7

halb 4 Tagen eine starke Vermehrung des löslichen N. Da diese Befunde in direktem Widerspruch zu PRJANISCHNIKOWS und auch PFEFFERS Auffassung über die Bildung des Asparagins zu stehen schienen, wurde zunächst eine größere Zahl von Ernährungsversuchen durchgeführt, wobei ausgewachsenen Blättern Glucose in verschiedenen Konzentrationen geboten wurde. Dabei konnte eine starke Abhängigkeit der Ergebnisse von der Temperatur festgestellt werden. Je höher diese war, um so größer mußte die Glucosekonzentration gewählt werden, um den Eiweißabbau zu hemmen (Versuch 7). Es gelang in einigen Versuchen, durch hohe Zuckerkonzentrationen die Menge des vorhandenen Amids konstant zu halten, eine Eiweißsynthese auf Kosten von Amid-N konnte aber nicht erreicht werden. Lediglich die Menge des Rest-N nahm in einigen Versuchen (7a, 9) ab. Analog zu den Lichtkulturen konnte trotz großer Amidanreicherung (3d, 6, 11) eine Vermehrung des Ammoniaks im Gegensatz zu einfachen Dunkelkulturen nirgends gefunden werden, eine weitere Bestätigung der Tatsache, daß bei Gegenwart von Kohlehydraten Ammoniak in der Form des Asparagins auftritt. In allen Versuchen war der Eiweißabbau schwächer als in entsprechenden Wasserkulturen.

Trotz mancher Übereinstimmung zeigten aber diese Versuche mit kohlehydratreichen, abgeschnittenen Blättern keine Einheitlichkeit (z. B. 5 und 7). Sie lassen keinen sicheren Schluß über die Bedeutung der Kohlehydrate für Eiweiß abbauende Vorgänge zu. Doch lenkten sie die Aufmerksamkeit auf eine wahrscheinliche Verschiedenheit des N-Stoffwechsels junger und alter Blätter. Zur Klärung dieser Frage war eine schärfere Beobachtung des Blattalters notwendig. Solche Versuche wurden angestellt und sind im Zusammenhang mit anderen in Kapitel VII beschrieben.

IV. Narkoseversuche.

Die Narkose ist bisher zu stoffwechselphysiologischen Versuchen bei Pflanzen nur in geringem Maße herangezogen worden. Diese wenigen Arbeiten fußen auf der bekannten Beobachtung A. CL. BERNARDS (1878), daß in narkotisierten Keimlingen die synthetischen Prozesse gehemmt oder verhindert wurden, die abbauenden Vorgänge aber weiterliefen (siehe auch IRVING 1911). Obgleich auch die Atmung durch Narkotika wesentlich beeinflusst wird (THODAY 1919, OSTERHOUT und seine Schüler, vgl. CZAPEK, Biochemie), scheint diesem Satz BERNARDS eine allgemeine Bedeutung zuzukommen. Jedenfalls haben Narkoseversuche für die Klärung des Amidproblems wesentlich beigetragen. Die SCHULZE-PRJANISCHNIKOWSche Hypothese sieht bekanntlich im Asparagin einen sekundär aus Ammoniak entstehenden Stoff mit bestimmten Funktionen. Seine Entstehung müßte nach obigem Prinzip in der Narkose

verhindert sein, ebenso aber eine Eiweißsynthese aus Ammoniak. Dieser müßte sich also ansammeln, wenn wir die Bedingungen zu seiner Bildung schaffen.

BUTKEWITSCH (1909) glückte es tatsächlich, *in mit Toluoldämpfen behandelten Lupinenkeimlingen die Asparaginbildung zum Stillstand zu bringen; gleichzeitig beobachtete er eine Anreicherung von Ammoniak*, das nur auf oxydativem Weg entstanden sein konnte. Dieser Befund stellte in der Tat eine wesentliche Stütze der Ansicht PRJANISCHNIKOWS dar.

Es lag nahe, die Narkose auch im Zusammenhang meiner Untersuchungen zu verwenden. Mit Hilfe solcher Experimente sollte erstens allgemein der N-Stoffwechsel narkotisierter Blätter studiert werden, zweitens versucht werden, eine endgültige Klärung der Frage herbeizuführen, ob unabhängig vom Kohlehydratgehalt dauernd ein Eiweißabbau stattfände.

Alle Narkoseversuche wurden mit Primärblättern von *Phaseolus* angestellt, die auf Grund der bisherigen Erfahrungen am geeignetsten erschienen, obgleich die Gefahr bestand, durch diese Einseitigkeit der Versuchsanordnung die Ergebnisse in ihrem Werte beeinflussen zu können. Es wurden stets Chloroformdämpfe benutzt. Die abgeschnittenen Blätter standen mit den Stielen in Wasserkölbchen unter einer 8 Liter fassenden, gut abgedichteten, verdunkelten Glasglocke, in der eine gewisse Menge Chloroform zur Verdampfung gebracht wurde. Mengen über 1,5 ccm auf 8 Liter erwiesen sich dabei als schädlich; die Blätter starben ab. Ihre Farbe veränderte sich dabei von grün zu braungrün. Selbst 1 ccm Chloroform konnten die Blätter nicht längere Zeit vertragen. 0,5 ccm dagegen ergaben selbst nach achttägigen Versuchen keine Störungen. Die Blätter waren schön grün, während die im Parallelversuch ohne Narkotica verwendeten oft gelbgrüne Farbe angenommen hatten, was schon äußerlich einen stärkeren Eiweißabbau andeutete. Wurden Blätter nach mehrtägiger Narkose wieder an Licht und Luft gebracht, zeigten sie auch im Stoffwechsel durchaus normales „gesundes“ Verhalten (siehe Versuch 5), ein Beweis für die geringe Giftigkeit der schwachen Chloroformkonzentrationen (IRVING, A. A. 1911).

Es folgt nun tabellarisch geordnet eine kurze Beschreibung der vorgenommenen Versuche und ihrer Ergebnisse. Es wurde stets zu Beginn des Experimentes mit der Hälfte des physiologisch als durchaus gleichwertig zu betrachtenden Materials eine Kontrollbestimmung durchgeführt, in einigen Fällen mit weiterem Material ein Paralleldunkelversuch ohne Narkotica angesetzt.

Alle Versuche zeigen zunächst einen starken Eiweißabbau, der wohl auf die Tätigkeit hydrolytischer Fermente (vgl. BUTKEWITSCH 1904) zurückgeführt werden kann. Doch ist dieser Abbau nicht so stark

Tabelle 13.

Stickstoff in				vT. Fr.-Gewicht	vH. Total-N				
Versuch	Bemerkungen	CH-Cl ₃ auf 8 Litr.	Temp.	Total	NH ₃	2. Amid	Rest	Lösl.	Eiweiß
6. V. 25 A. 2 Tage Narkose	30—50 cm hoch			4,26	1,3	2,9	8,4	12,6	87,4
	Schwere Schädigung	2,4	22°		3,5	2,5	23,3	29,1	70,9
I. 6. V. 25 B. 3 Tage im Dunkeln	30—50 cm hoch				1,3	2,6	6,1	10,0	90,0
			22°		1,6	6,8	11,8	20,2	79,8
18. V. 25 2. 2 Tage Narkose	40 cm hoch			4,6	1,1	3,5	10,3	14,9	85,1
	ungeschädigt	1	30°		3,8	3,0	18,5	25,3	74,7
23. V. 25 3. 5 Tage verdunkelt 5 Tage Narkose	30 cm hoch			5,38	1,0	7,1	18,5	26,6	73,4
	2 Tage verdunk. Bl. gelb- gelbgrün		21°		2,9	13,2	39,6	55,7	44,3
	Bl. schön grün	0,5	21°		14,7	1,8	22,6	39,1	60,9
15. VI. 25 4. 5 Tage Narkose	50 cm hoch				1,6	4,8	10,1	16,5	83,5
	5 Tage verdunk. Bl. grün	0,5	17°		12,8	2,0	15,8	30,6	69,4
22. VI. 25 5. 4 Tage Narkose 4 Tage Narkose	Junge Pfl. Amide anger.				1,0	9,5	7,2	17,7	82,3
		0,5	18°		13,6	4,1	19,5	37,2	62,8
	8 Std. belichtet 40 Std. dunkel	0,5	18°		3,1	19,9	17,5	40,3	59,5

wie in nichtnarkotisierten Blättern, was vielleicht auf eine Hemmung durch Chloroform oder auf eine Giftwirkung entstehender Stoffwechselprodukte wie NH₃ usw. zurückzuführen ist.

Eine Vermehrung des Amid-N in anästhesierten Blättern ist nirgends beobachtet worden. Vielmehr zeigen einige Versuche eine beträchtliche Verminderung des durch Säurehydrolyse abspaltbaren Ammoniaks (vgl. BUTKEWITSCH 1909). Ob nun diese Verminderung lediglich auf einer Abspaltung des carboxylgebundenen Ammoniaks beruht oder auch von einer Abspaltung der Aminogruppe der Säureamide begleitet ist, kann nicht entschieden werden. In beiden Fällen muß dem Verschwinden von Amiden nach unseren chemischen Vorstellungen eine Hydratation zu-

grunde liegen. Wir können also sagen, daß hydrolytische Prozesse in der Narkose stark in Erscheinung treten.

Weiter zeigen alle Versuche eine beträchtliche Ammoniakanreicherung. Da NH_3 nicht von außen aufgenommen werden konnte, kann über seine Entstehung aus Eiweißen bzw. deren Spaltungsprodukten kein Zweifel bestehen.

Versuch 5 zeigt, daß auf solche Weise angereicherter Ammoniak bereits nach kurzer CO_2 -Assimilation in Asparagin umgewandelt wird.

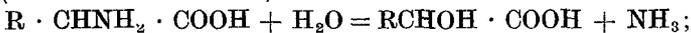
Es ist auf Grund dieser Ergebnisse ersichtlich, daß solche Narkoseversuche geeignet sind, den Chemismus dissimilatorischer Prozesse aufzuklären, vor allem auch des hydrolytischen und oxydativen Abbaues des Asparagins. Auch erscheint es aussichtsreich, solche Versuche zur Klärung der Stoffwechselverschiedenheiten in jungen und alten Blättern anzustellen. Soweit dies im Rahmen dieser Arbeit liegen konnte, wurden Vorstöße in der aufgezeichneten Richtung vorgenommen und im Kapitel VII beschrieben.

V. Anaerobiose.

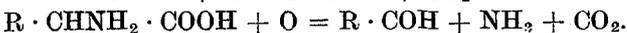
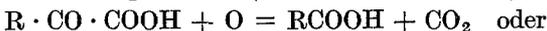
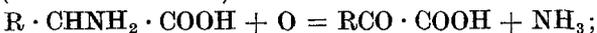
Auf Grund der Untersuchungen des letzten Kapitels kann kein Zweifel bestehen, daß auch in ausgewachsenen Blättern die Amide aus Ammoniak gebildet werden. Soweit dieser Ammoniak nicht von außen zugeführt wird, ist seine Entstehung aus anderen N-haltigen Verbindungen sicher. Die in der Einleitung erwähnten mannigfachen Untersuchungen an Keimpflanzen und die voranstehenden eigenen haben nun bewiesen, daß ein großer Teil der Amide nur auf Kosten von Eiweiß gebildet werden kann, da keine anderen N-haltigen Substanzen in der dazu erforderlichen Menge vorhanden sind.

Nun entsteht eine weitere wichtige Frage: Ist dieser Ammoniak auf hydrolytischem oder auf oxydativem Wege entstanden? Die charakteristische Aminogruppe der Aminosäuren z. B. kann auf diese oder jene Art abgespalten werden, wobei naturgemäß die neben dem NH_3 auftretenden Endprodukte verschieden sein werden:

1. (nach P. MAYER 1904):



2. (nach DAKIN 1908):



Auch eine Abspaltung des Stickstoffs organischer Basen und der Amide ist auf hydrolytischem Wege durchaus denkbar.

Nun haben mehrere Forscher die Lösung dieses wichtigen Problems durch Untersuchung des anaeroben Stoffwechsels an schnell wachsenden

Pflanzenteilen versucht. BORODIN (1885) stellte mikrochemisch fest, daß bei Abwesenheit von O_2 kein Asparagin in seinen Versuchsobjekten nachweisbar war, die es jedoch unter Sauerstoffzutritt reichlich bildeten. Dafür trat reichlich Leucin und Tyrosin auf. PALLADIN (1888, 172) arbeitete mit jungen Keimpflanzen von *Vicia faba* und *Triticum*. Er stellte dabei fest, daß die Keimlinge in Anaerobiose bei Gegenwart von Kohlehydraten kein Eiweiß abbauten, bei Kohlehydratmangel setzte dieser Vorgang energisch ein. Dabei wurde sehr wenig Asparagin gebildet, ganz im Gegensatz zu Kontrollversuchen mit normaler Sauerstoffspannung. Dafür traten andere lösliche N-Verbindungen zahlreich auf, von denen er Tyrosin und Leucin mikrochemisch nachweisen konnte. Er forderte deshalb mit Recht, daß die Amide nicht als direkte Spaltungsprodukte des Eiweißes, sondern als Produkte eines oxydativen Prozesses aufzufassen seien.

Diese Ergebnisse der PALLADINSchen Arbeiten wurden von CLAUSEN (1890) angezweifelt, doch mit wenig Erfolg.

SÜZUKI (1900—1902, IV) konnte die Angaben PALLADINS bei Gerste und Sojabohne voll bestätigen. Er beobachtete ebensoviel lösliche Eiweißabbauprodukte in Anaerobiose wie in Aerobiose, aber bei O_2 -Ausschluß keine Asparaginvermehrung. Die geringe NH_3 -Anreicherung, die seine Versuche zeigen, steht in keinem Verhältnis zur Asparaginbildung bei O_2 -Zutritt und hängt vielleicht mit der geringen Amidverminderung zusammen.

GODLEWSKI (1904, 1911) brachte dann weitere Beiträge zu diesem Problem und beobachtete bei keimenden Samen ebenfalls keine Bildung von Asparagin und Ammoniak in Anaerobiose, sondern lediglich das Auftreten von Aminosäuren und Basen.

BUTKEWITSCH (1904) zeigte dann, daß der in der Narkose in Keimlingen reichlich auftretende Ammoniak bei Abwesenheit von Sauerstoff nicht gebildet wird.

Bei all diesen Versuchen war CO_2 -Assimilation durch Dunkelkultur künstlich verhindert.

Mir erschien es wünschenswert, dazu besondere Versuche unter Ausschluß der Stoffwanderung an einzelnen Blättern anzustellen, obgleich ein abweichendes Verhalten der abgeschnittenen Blätter von vornherein unwahrscheinlich erschien. Dabei beobachtete ich, daß Primärblätter der Bohne erst am dritten Tag der Anaerobiose Schädigungen zeigten.

Der Versuch (Tab. 14, Nr. 1) wurde so durchgeführt, daß Bohnenblätter mit den Stielen in wassergefüllten Kölbchen unter eine 8 Liter fassende, verdunkelte und luftdicht abgeschlossene Glocke gebracht wurden. Der Sauerstoff der Luft wurde durch 400 ccm einer 2,5 proz. Pyrogalllösung in 2,5 vH. Natronlauge entfernt. Daneben wurde ein

Kontrollversuch unter Sauerstoffzutritt angesetzt (Versuchsdauer 3 Tage, Temperatur 22° C, Fällung: Toluol-Tannin, Gesamt-N der Blätter in Tausentstel des Frischgewichtes 4,26).

Wie die Tabelle zeigt, wurde nur eine geringe Vermehrung des Amid-N beobachtet und ein starkes Anschwellen des Rest-N. Ob und wie weit diese bedeutende Steigerung auf Schädigungen zurückzuführen ist, ist hier nebensächlich. Jedenfalls waren die Blätter nach 60stündiger Versuchsdauer noch völlig turgescens. Erst nach 72 Stunden war eine Störung erkennbar.

Im Anschluß an diese Narkoseversuche mußte noch gezeigt werden, daß auch hier unter dem Einfluß des Chloroforms (vgl. Tab. 13) auftretende Ammoniak nicht anders als auf oxydativem Wege entstanden war. Zu dieser Beweisführung mußten Narkose und Anaerobiose kombiniert werden (Tab. 14, Versuch 2), indem unter die Glocke außer der Pyrogalllösung noch 0,5 ccm Chloroform gebracht wurden. Versuchsdauer 3 Tage bei 19° C, Schädigungen nicht erkennbar.

Wie aus der folgenden Tabelle (14, Nr. 2) ersichtlich ist, kann auch in diesem Falle von einer wesentlichen Vermehrung des Ammoniaks nicht die Rede sein, wenn wir zum Vergleich die Werte aus Tabelle 13 heranziehen. Übrigens liegen die hier erhaltenen Mengen noch sehr nahe an den Fehlergrenzen, und der Steigerung des NH₃-Gehaltes um 50 vH. kann eben nur eine sehr relative Bedeutung zukommen.

Tabelle 14.
(N in vH. des Total-N.)

		NH ₃	2. Amid	Rest	Lösl.	Eiw.
1	Anfangswert	1,4	2,4	6,7	10,5	89,5
	3 Tage Anaerobiose	1,8	3,1	22,4	27,3	72,7
<i>Phas. multifl.</i>	Anfangswert	1,3	2,6	6,1	10,0	90,0
	3 Tage Aerobiose	1,6	6,8	11,8	20,2	79,8
2	Anfangswert	1,15	1,94	6,05	9,14	90,86
	<i>Phas. multifl.</i> 3 Tage Narkose + Anaerobiose	1,63	1,91	19,55	23,09	76,91

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß wie bei Keimlingen so auch bei ausgewachsenen Blättern unter Sauerstoffausschluß keine Bildung von Amiden bzw. Ammoniak stattfindet.

VI. Künstliche N-Zufuhr.

In den oben beschriebenen Versuchen konnte durch verschiedene Methoden gezeigt werden, daß normalerweise kein wesentlicher Unterschied im Amid-Stoffwechsel zwischen ausgewachsenen Blättern und Keimlingen zu bestehen scheint, vor allem konnte bewiesen werden,

daß der Ausgangsstoff der Amidbildung auch in den Blättern Ammoniak ist, dessen Entstehung durch verschiedene Experimente klargestellt worden ist. Eine weitere wichtige Ergänzung dieser Kapitel wurde durch eine künstliche N-Zufuhr erwartet. Es sind lediglich Versuche mit Ammoniumchlorid und Asparagin selbst angestellt worden, da eine Aufklärung der Entstehung des Kohlenstoffskelettes der Amide, für die Ernährungsversuche mit Ammoniumsalzen verschiedener organischer Säuren förderlich gewesen wären, im Rahmen dieser Arbeit nicht angestrebt wurde.

Zur vorliegenden Literatur ist wenig zu sagen. Ammoniumsalzfütterungen bei Blättern sind nur in geringem Maße vorgenommen worden und meist in einem anderen Zusammenhang, so daß hier ganz auf die Erwähnung der betreffenden Arbeiten verzichtet werden kann. Über künstliche Asparaginerneuerung bei Blättern ist nur die Arbeit von SAPOSCHNIKOW (1894) zu erwähnen, der bei *Vitis*-Blättern auf Kosten von Asparagin Eiweißsynthese feststellen konnte, aber auch eine Vermehrung des löslichen N. Im übrigen sei auf die Arbeiten von HANSTEEN (1896, 1899) und ZALEWSKY (1897) verwiesen.

Ich komme nun zur Beschreibung der eigenen Versuche, deren Nummern sich mit den entsprechenden der Tabellen Nr. 15—17 decken. Als Fällungsmittel diente in allen Versuchen Toluol-Tanin 4 vH., heiß. Als Versuchsmaterial wurden ausgewachsene Blätter nicht zu hohen Alters verwendet. Eine Darstellung des Stoffwechsels alter Blätter erfolgt in Kapitel VII.

a) Ammoniumsalzernährung:

1. Versuch (3. II. 25), junge Bohnenpflanzen wurden 2 Tage dunkel gestellt, dann wurden je 5 Primärblätter mit H_2O_2 sterilisiert und in zwei Versuchsreihen

1. auf NH_4Cl 0,25 vH. + 0,1 vH. $CaSO_4$
2. auf „ 0,25 „ + 0,1 „ „ + 2 vH. Glucose

gebracht. Die Lösungen waren sterilisiert. Gleichzeitig wurde ein entsprechender Versuch mit etwas älteren Blättern angesetzt (1 b). Die Blätter blieben 5 Tage auf der Nährlösung, die zur Vermeidung jeder Infektion mehrere Male erneuert wurde, wobei jedesmal auch die Blätter einer kurzen H_2O_2 -Behandlung unterworfen wurden. Der Versuch lief im Dunkeln bei 16° . Vor der Analyse wurden die Blätter gründlich abgespült.

Die Ergebnisse (siehe Tabelle 15) zeigen, daß in Gegenwart von Glucose trotz größerer Total-N-Steigerung und einem bedeutend höheren Eiweißgehalt weniger Ammoniak- und Amid-N zu beobachten ist, wobei man annehmen darf, daß in den Leitbündeln etwa gleichviel NH_3 aus der Nährlösung enthalten war.

2. Versuch (Tabelle 15) (4. II. 25). Der erste Versuch hatte den Nachteil, daß die Anfangswerte nicht ermittelt werden konnten. Es wurde deshalb ein zweiter mit Blättern von *Vicia faba* angestellt. Die schön entwickelten Pflanzen waren im Winter in einem kalt temperierten Gewächshaus gezogen worden. Gleiche Portionen (5,5—6 g) von ausgewachsenen Blättern wurden

- A sofort analysiert,
 B 4 Tage auf 0,2 vH. NH_4Cl + 0,15 vH. CaSO_4
 C 4 „ „ 0,2 „ „ + 0,15 „ „ + 1 vH. Glucose,
 D 4 „ „ 0,2 „ „ + 0,15 „ „ + 5 „ „

gebracht. Blätter und Lösungen wurden sterilisiert. Der Versuch lief 4 Tage im Dunkeln bei 12°. Vor der Analyse wurden die Blätter B—D gründlich abgespült und 2 Stunden auf Wasser gelegt, um ein möglichst völliges Entfernen von adsorbiertem und in den Leitungsbahnen angehäuften NH_3 zu erreichen.

Die Tabelle 15 (Nr. 2) zeigt, daß Glucose die N-Aufnahme bedeutend steigert. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, daß bei Gegenwart von Glucose ein rascherer Verbrauch des NH_3 einsetzt, wodurch ein größeres Diffusionsgefälle unterhalten wird. Ein Beweis dafür liegt in der Tatsache, daß Glucosekulturen den wenigsten Ammoniak-N aufweisen. Der Amid-N hat den höchsten Wert bei schwacher Glucosefütterung; die Glucosekonzentration reicht anscheinend nicht aus, sowohl die Atmung zu unterhalten, als auch das eindringende NH_3 zu Eiweiß zu formieren, d. h. den Eiweißstoffwechsel zu balancieren. Es tritt Amidbildung ein, der Ammoniak wird entgiftet und in dieser Form gespeichert.

Größerer Kohlehydratmangel führt zum Eiweißabbau. Das eindringende Ammoniak kann nicht mehr in dem Maße „entgiftet“ werden; es sammelt sich an und verhindert ein weiteres starkes Nachströmen.

Stärkere Glucosekonzentrationen verhindern nicht allein den Eiweißzerfall, sondern ermöglichen Eiweißsynthese auf Kosten von Ammoniak und Amiden.

3. Versuch (Tabelle 15, Nr. 3) (17. II. 25). Je 6 Primärblätter von schön, gleichmäßig entwickelten, 4 Wochen alten Bohnenpflanzen werden folgendermaßen behandelt.

- A sofort analysiert,
 B 4 Tage dem zerstreuten Tageslicht ausgesetzt (mit den Stielen in Wasser),
 C + D + E + F 1 Tag mit den Stielen in NH_4Cl 0,3 vH. + CaSO_4 0,1 vH. dem normalen Tageslicht ausgesetzt. Dann wird C analysiert,
 D weitere 3 Tage auf Glucose 7 vH. ins Dunkle gebracht,
 E „ 3 „ „ „ 2 „ „ „ „ „
 F „ 3 „ auf H_2O gebracht und dem zerstreuten Tageslicht ausgesetzt.

Am 21. IV. werden die Versuchsreihen B und D—F abgebrochen. Die Tabelle 15 (3) enthält die analytischen Befunde.

Eine eintägige Ammoniumsalzernährung im Tageslicht ruft also bereits bedeutende Eiweißsynthese hervor, vermehrt aber auch den Amid-N und den Rest-N. Eine Weiterbehandlung so ernährter Blätter mit 7 vH. Glucose verringert bedeutend den NH_3 -N und den Amid-N; dafür beobachten wir weitere Eiweißzunahme. Bedeutend schwächer verlaufen diese synthetischen Vorgänge auf 2 vH. Glucose oder im Tageslicht (Februar!).

4. Versuch. In einem weiteren Experiment wurde versucht, durch Auswahl stärkereicher Primärlätter der Bohne ansehnliche Amid-Bildung auf Kosten von Ammoniumsalsen hervorzurufen.

Ein Teil der Blätter wurde am 25. IV. 25 analysiert, ein anderer zur gleichen Zeit auf 0,25 vH. NH_4Cl + 0,1 vH. CaSO_4 -Lösung ins Dunkelzimmer bei 14° gebracht. Am 29. IV. wurde der Versuch abgebrochen und die Blätter nach gründlichem Abspülen noch 1 Tag auf Wasser ins Dunkle gebracht.

Die Tabelle zeigt, daß ein starkes Ansteigen des Amid-N und des Rest-N zu beobachten ist, dem nur ein relativ geringer Eiweißabbau gegenüber steht, so daß kein Zweifel bestehen kann, daß der größte Teil des aufgefundenen Amid-N aus zugeführten NH_3 entstanden ist.

Tabelle 15.

		N in vT. des Frischgewichts						
		NH_3	2. Amid	Rest	Lösl.	Eiweiß	Total	
1 a <i>Phas. mult.</i> jünger	NH_4Cl	1,16	1,07	2,40	4,63	4,60	9,23	
	NH_4Cl + Glucose	0,69	0,95	2,12	3,76	6,30	10,06	
1 b <i>Phas. mult.</i> älter	NH_4Cl	1,05	0,80	1,65	3,50	4,51	8,01	
	NH_4Cl + Glucose	0,56	0,67	1,60	2,83	5,66	8,49	
2 <i>Vicia faba</i>	A sofort	0,07	0,39	1,03	1,49	3,53	5,02	
	B NH_4Cl	1,09	0,74	1,74	3,57	2,46	6,03	
	C NH_4Cl + 1 vH. Glucose	0,55	1,28	1,22	3,05	3,34	6,39	
	D NH_4Cl + 5 vH. Glucose	0,38	0,53	1,30	2,21	5,12	7,33	
	Unterschiede	B	+1460	+ 90	+69	+140	-30	+20
	des Anfangswertes	C	+ 690	+230	+18	+105	- 5	+26
	in vH.	D	+ 440	+ 36	+26	+ 48	+45	
3 <i>Phas. mult.</i>	sofort	0,06	0,29	0,66	1,01	5,52	6,53	
	4 Tage Licht	0,04	0,27	0,61	0,92	5,32	6,24	
	1 Tag NH_4Cl	0,87	0,48	0,94	2,29	6,48	8,77	
	1 T. NH_4Cl + 3 T. Gluc. 7vH.	0,16	0,22	1,16	1,54	7,19	8,73	
	1 T. NH_4Cl + 3 T. Gluc. 2vH.	0,32	0,36	0,99	1,67	6,88	8,55	
	1 Tag NH_4Cl u. 3 Tage Licht	0,39	0,40	1,27	2,06	6,97	9,03	
4 <i>Phas. mult.</i>	sofort	0,06	0,12	0,30	0,48	2,87	3,35	
	NH_4Cl	1,71	0,80	0,65	3,16	2,53	5,69	

Zusammenfassend kann zu diesen Untersuchungen gesagt werden, daß Ammoniumsalzlösungen von ausgewachsenen Blättern leicht zur Eiweißsynthese verwendet werden können, wenn für genügend N-freie Baustoffe gesorgt ist. Tritt ein Mangel an Kohlehydraten ein, so setzt Amidbildung auf Kosten von NH_3 ein; ist der Mangel noch größer, so wird das Amid auf Kosten des Eiweißes gebildet. Die Aufnahme von Ammoniak ist in beiden Fällen bedeutend geringer. Es sind offenbar

zu geringe Konzentrationsgefälle vorhanden, die kein rasches Nachströmen von Ammoniak ermöglichen. — Es ist gleichgültig, ob die zur Eiweißsynthese notwendigen N-freien Stoffe auf dem Wege der Assimilation erzeugt oder ebenfalls einer Nährlösung in Form von Glucose entnommen werden.

b) *Asparaginer-nährung.*

Von großem Interesse schien mir nun das Verhalten des Asparagins selbst. Mannigfache Versuche in den voranstehenden Kapiteln zeigen teils eine leichte, teils eine erschwerte Verwendung des in den Zellen gebildeten Asparagins zur Eiweißsynthese. Um dies verschiedene Verhalten genauer studieren zu können, wurden einige Ernährungsversuche mit diesem Stoff durchgeführt. Auch bei diesen Experimenten kamen nur sterilisierte Lösungen zur Verwendung. Auch die Blätter wurden sterilisiert. Die Nummern der Versuche entsprechen denen der Tabellen 16—17.

5. *Versuch.* Blätter von *Vicia faba* wurden am 17. III. 25 zu gleichen Portionen (4 g).

1. sofort analysiert,
- 2., 3. und 4. bei 27° 2 Tage lang im Dunkeln mit den Stielen in 1 vH. Asparaginlösung gebracht. Dann wurde 2. analysiert und
3. 2 Tage lang nach H₂O₂-Behandlung auf sterilisierte 2,5 vH. Glucose bei 17° ins Dunkle gebracht.
4. ebenso, aber 4 Tage lang.

Die Ergebnisse in Tabelle 16 zeigen, daß während der Asparaginer-nährung starker Eiweißabbau stattgefunden hat. Ein Teil dieser Abbauprodukte ist als Amid-N gefaßt worden. Doch ist die weitaus größte Menge dieses Amid-N auf das eingewanderte Asparagin zurückzuführen. 2,5 vH. Traubenzuckerlösung vermag den weiteren Eiweißabbau annähernd zu verhindern. Doch vermehrt sich der Rest-N bedeutend auf Kosten des Asparagins, das also in neue, analytisch nicht erfaßte Verbindungen übergeführt worden ist, vielleicht in Eiweißbausteine, vielleicht auch in piperazinartige Ringverbindungen.

6. *Versuch.* Primärblätter von 25 cm hohen Bohnenpflanzen wurden am 21. III. 25 zur Hälfte analysiert. Die übrigen Blatthälften, an denen Mittelrippe und Blattstiele belassen wurden, wurden mit den Stielen in Kölbchen gebracht, die 0,4 vH. Asparaginlösung mit 2,7 vH. Glucose enthielten. Der Versuch lief im Dunkeln bei 18° 3 Tage lang. Die Ergebnisse (Tab. 16) zeigen, daß weder Eiweißabbau noch -aufbau stattgefunden hat. Neben der bedeutenden Steigerung des Amid-N beobachten wir eine geringe des Rest-N (Tab. 16).

7. *Versuch.* Primärblätter von 40 cm hohen Bohnenpflanzen wurden am 26. III. in zwei Portionen mit den Stielen in 1 proz. Asparaginlösung

Tabelle 16.

		N in vT. des Frischgewichts					
		NH ₂	2. Amid	Rest	Lösl.	Eiweiß	Total
5. V. f.	Zu Beginn	0,01	0,14	0,43	0,59	4,95	5,53
	2 Tage Asparagin	0,08	3,23	0,59	3,90	4,27	8,17
	2 Tage Asp. + 2 Tage Gluc.	(0,10)	2,72	1,11	3,93	4,04	7,97
	2 Tage Asp. + 4 Tage Gluc.	0,04	2,23	1,71	3,98	3,97	7,95
6. Phas. mult.	Zu Beginn	0,01	0,52	0,92	1,50	5,24	6,74
	3 Tage Asp. + Glucose . .	0,02	2,86	1,15	4,03	5,30	9,33

gebracht und im stark zerstreuten Tageslicht 1 Tag darin belassen. Dann wurden die Hälften der Blätter analysiert, die anderen Hälften 5 Tage lang in 2 vH. Glucoselösung gebracht, die täglich gewechselt wurde. Am 1. III. begannen die Blätter zu welken; der Versuch wurde abgebrochen.

Die Analysen (Tabelle 17) ergaben, daß abermals im Eiweißgehalt keine Veränderungen zu beobachten waren, daß der Rest-N bedeutend auf Kosten des Amid-N zugenommen hatte.

8. Versuch. Dieser am 1. IV. mit ähnlichem Material ausgeführte Versuch gleicht dem vorhergehenden, nur wurde eine 0,5 proz. Asparaginlösung und danach eine 7 proz. Traubenzuckerlösung 4 Tage lang in Anwendung gebracht.

Die Analysen (Tabelle 17) zeigen eine starke Eiweiß- und Rest-N-Zunahme auf Kosten des Amid-N.

9. Versuch. Die bisherigen Versuche und die Arbeiten SPOEHRs (1923) über die Abhängigkeit der Atmung abgeschnittener Blätter vom Kohlehydrat- und Aminosäuregehalt machten es wahrscheinlich, daß eine verschieden große Glucosekonzentration geboten werden muß, um den Eiweißhaushalt der Blätter zu balancieren, je nachdem mehr oder weniger Asparagin in die Zellen eingedrungen ist.

Ich fütterte deshalb Bohnenblätter

a) mit 0,5 proz. Asparaginlösung,

b) mit 0,1 proz. „

je 1 Tag lang bei 17° im Dunkeln, analysierte dann die Blatthälften und brachte die übrigen in beiden Fällen 3 Tage lang auf 5 proz. Traubenzuckerlösung.

In der Tat zeigt der Versuch a (s. Tab. 17) einen weiteren Eiweißabbau und eine Amidsteigerung, b aber Eiweißsynthese auf Kosten des Amid-N.

Wenn also bei diesen Versuchen im allgemeinen eine Eiweißsynthese auf Kosten zugeführten Ammoniaks oder Asparagins beobachtet werden konnte, so zeigten doch andere diese Erscheinungen nicht, trotz aus-

Tabelle 17.

		N in vH. Total-N				
		NH ₃	2. Amid	Rest	Lösl.	Eiw.
7 <i>Phas. mult.</i>	1 Tag 1 vH. Asparagin	0,4	41,8	4,5	46,7	53,3
	Darnach 5 Tage 2 vH. Glucose	0,1	32,3	14,0	46,4	53,6
8 <i>Phas. mult.</i>	1 Tag 0,5 vH. Asparagin	0,6	40,4	8,5	49,5	50,5
	Darnach 4 Tage 7 vH. Glucose	0,2	27,1	11,4	38,7	61,3
9 <i>Phas. mult.</i>	a 1 Tag Asparagin 0,5 vH.	0,4	39,7	9,1	49,2	50,8
	a Darnach 3 Tage Glucose 5 vH.	0,1	44,0	10,7	54,8	45,2
	b 1 Tag Asparagin 0,1 vH.	0,4	21,8	11,3	33,5	66,5
	b Darnach 3 Tage Glucose 5 vH.	—	19,0	12,7	31,7	68,3

giebiger Kohlehydratzufuhr. Übereinstimmend mit einigen Versuchen in Tabelle 12, bei denen im Licht Eiweiß unter Amidbildung abgebaut wurde, den Blättern also trotz Kohlehydratreichtum die Fähigkeit, Eiweiß aus den Spaltungsprodukten zu regenerieren, abgesprochen werden mußte, wurde vielmehr beobachtet, daß in gewissen Blättern Eiweißsynthese auf Kosten angereicherten Asparagins nicht zu erreichen war. Diese Blätter unterscheiden sich aber von denen der bereits beschriebenen Versuche durch höheres Alter. Systematische Versuche sollten hier Klärung bringen.

VII. Die Bedeutung des Blattalters für den N-Stoffwechsel.

Bereits an verschiedenen Stellen dieser Arbeit habe ich auf eigenartige Beobachtungen aufmerksam machen können, die die Vermutung zuließen, daß Blätter verschiedenen Alters Unterschiede in quantitativer, vielleicht sogar qualitativer Art innerhalb ihres N-Stoffwechsels besitzen. Doch war eine Entscheidung dieser Frage nicht möglich, weil eine exakte Beurteilung des Blattalters und Vergleiche einzelner Experimente nachträglich nicht mehr angestellt werden konnten, ohne den so erzielten Ergebnissen den Charakter unnützer Spekulationen zu verleihen. Vielmehr mußten eine Reihe besonderer Versuche angestellt werden, die nun unter diesem einheitlichen Gesichtspunkt beschrieben werden sollen. Nur sei vorausgeschickt, daß es nicht möglich war, eine endgültige Klärung der Frage zu erzielen, weil durch die fortgeschrittene Jahreszeit weder genügendes, noch alle Anforderungen erfüllendes Pflanzenmaterial zur Verfügung stand. So sind die im folgenden angeführten Experimente mehr als ein Vorstoß zu betrachten. Ich hoffe, im kommenden Jahr eine auf breiterer Grundlage aufgebaute Untersuchung dieses interessanten Problems vornehmen zu können.

Wie bereits frühere Untersuchungen ergaben, zeigen nicht allein

ausgewachsene und nicht ausgewachsene Blätter unter gleichen Bedingungen verschiedenartigen Stoffwechsel, sondern vor allem ausgewachsene Blätter unter sich, wobei die einen den nicht ausgewachsenen ähnelten oder sogar gleichwertig waren. Es wird also gut sein, die Extreme dieser physiologisch unterschiedlichen Organe mit jung und alt zu bezeichnen. Bereits im ersten Kapitel des experimentellen Teils habe ich gezeigt, daß Blätter verschiedenen Alters verschiedene Quantitäten N-haltiger Substanzen aufweisen, und es kann kein Zweifel sein, daß alte Blätter, die durch Vergilben ein Zeichen des Absterbens geben, charakterisiert sind durch einen bestimmten Gehalt an Eiweiß-N. Ich komme darauf in den Schlußbetrachtungen zurück. Solche Blätter mit nichtausgewachsenen Blättern unter verschiedenen Bedingungen vergleichend zu beobachten, ist das Ziel dieses Teiles der Untersuchungen.

Zunächst sei der Stoffwechsel in kohlehydratarmen und -reichen Blättern ins Auge gefaßt unter sonst gleichen Bedingungen, also auch bei unveränderten Mengen des Gesamt-N.

1. *Versuch* (Tab. 18). *Phaseolus multiflorus*. Freilandpflanzen. A. jung, B. ältere, blühende. Von je 6 Pflanzen wird die Hälfte der Primärblätter analysiert, die übrigen 2 × 6 werden in wassergefüllte Kölbchen gebracht und dem zerstreuten Tageslicht ausgesetzt. Zwei weitere Serien gleichwertiger Primärblätter unter sonst gleichen Bedingungen verdunkelt. Dauer 18. VI. bis 25. VI. 25. *Beim Abbrechen des Versuches zeigen die jungen Lichtblätter außer schwacher Gelbgrünfärbung der Nerven keine Veränderung.* Die Dunkelblätter sind an den Rändern gelblich bzw. ganz gelb. *Die alten Lichtblätter gelbgrün.*
2. *Versuch* (Tab. 18). *Phaseolus multiflorus* Freilandpflanzen, blühend und fruchtend. Von Fiederblättern werden die Endfiedern entfernt, die Hälfte der Seitenfiedern analysiert, der andere Teil mit Stielen in Wasser gebracht und zwar
 - A. von jungen, aber schon derben und ausgewachsenen Blättern am Sproßende,
 - B. von alten, grünen,
 - C. von alten, gelbgrünen.

Von jungen, 30 cm hohen Pflanzen werden die Primärblätter zu dem Versuch D verwendet. Die Blätter werden dem zerstreuten Tageslicht ausgesetzt und nach 7 Tagen am 4. Sept. 1925 analysiert.
3. *Versuch* (Tab. 18). *Amicia zygomeris*. Freilandpflanzen. Junge und alte Teilblättchen wurden mit den Stielen der Blätter in Wasserkölbchen gebracht und 5 Tage dem zerstreuten Tageslicht ausgesetzt. Eine weitere Portion alter Blätter wurde unter gleichen Bedingungen verdunkelt, aber 6 Tage lang.
4. *Versuch* (Tab. 18). *Phaseolus multiflorus*. Freilandpflanzen. A. Primärblätter junger Pflanzen, B. Fiederblätter fruchtender Pflanzen. Dauer 7 Tage. Sonst wie oben.

Aus diesen Versuchen ergibt sich klar, daß nur alte Blätter am Licht, also bei Kohlehydratreichtum, einen Eiweißabbau zeigen, wie ihn auch CHIBNALL beobachtet hat. Junge Blätter besitzen diese Eigenschaft nicht.

Tabelle 18.

		Stickstoff in		vT. Fr.- Gewicht	vH. Total-N				
	Versuch	Bemerkungen	Total	NH ₃	2. Amid	Rest	Lösl.	Eiw.	
1.	A. jung	18. VI. 25	—	—	1,2	1,3	5,2	7,7	92,3
		8 Tage Licht	Nerven gelblich	—	1,0	1,8	8,2	11,0	89,0
		8 „ dunkel	Ränder gelblich	—	1,6	10,7	25,0	37,3	62,7
	B. alt	21. VI. 25	—	—	1,5	1,8	6,1	9,4	90,6
		8 Tage Licht	gelbgrün	—	1,6	12,3	13,5	27,4	72,6
		8 „ dunkel	gelb	—	3,0	21,2	14,9	39,1	60,9
2.	A.	28. VIII. 25	—	7,15	0,5	1,0	6,4	7,9	92,1
		4. IX. 25	grün	—	0,2	1,0	7,7	8,9	91,1
	B.	28. VIII. 25	—	7,00	0,6	1,3	6,1	8,0	92,0
		4. IX. 25	grün	—	0,3	2,4	8,8	11,5	88,5
	C.	28. VIII. 25	—	3,37	0,5	0,8	11,1	14,4	85,6
		4. IX. 25	gelblich	—	0,4	5,4	15,4	21,2	78,8
	D.	28. VIII. 25	—	3,74	0,5	3,1	22,3	25,9	74,1
		4. IX. 25	grün	—	0,2	3,1	15,5	18,8	81,2
3.	A. jung	18. IX. 25	—	10,9	0,4	0,6	6,0	7,0	93,0
		5 Tage Licht	grün	—	0,3	2,6	6,3	9,4	90,6
	B. alt	18. IX. 25	—	9,85	0,4	0,5	5,6	6,5	93,5
		5 Tage Licht	grün	—	0,3	6,3	11,6	18,2	81,8
		6 „ dunkel	gelblichgrün	—	0,8	16,0	38,7	45,5	54,5
	4.	A. jung	13. X. 25	—	6,76	0,7	3,8	12,9	17,4
7 Tage Licht			grün	—	0,4	5,2	10,9	16,5	83,5
B. alt		13. X. 25	—	7,19	0,5	0,7	7,1	8,3	91,7
		7 Tage Licht	gelb-gelbgrün	—	0,8	6,0	13,4	20,2	79,8

Doch stimmen sie darin überein, daß Ammoniak im Licht niemals auftritt, was auch mit den früheren Beobachtungen bei Glucoseernährung übereinstimmt. Für eine weitere Untersuchung dieses Problems ist zunächst die Klärung der Frage notwendig, ob das Verhalten junger Blätter darauf zurückzuführen ist, daß immerwährend gespaltene Eiweiße bei Gegenwart von Kohlehydraten regeneriert werden, oder ob überhaupt keine Spaltungen auftreten. Diese Frage: Verhindern, verlangsamen oder kompensieren Kohlehydrate in jungen Blättern den Eiweißabbau? erscheint am einfachsten durch Narkoseversuche geklärt werden zu können, die ebenso wie die in Tabelle 13 beschriebenen mit Primärblättern von *Phaseolus multiflorus* angestellt wurden; die Ergebnisse enthält die Tabelle 19.

Tabelle 19.

Stickstoff in				vt. Fr. Gew.	vH. Total-N					
Versuch	Bemerkungen	CH · Cl ₃ auf 8 Ltr.	Temp.	Total	NH ₃	2. Amid.	Rest	Lösl.	Eiw.	
1a	18. VI. 25 2 Tage Narkose	junge Pflanze, stärkereich				1,2	1,3	5,2	7,7	92,3
		keine Stärke	0,5	18°		1,4	1,1	9,6	12,1	87,9
1b	21. VI. 25 2 Tage Narkose	ausgew. Pflanze, stärkereich				1,5	1,8	6,1	9,4	90,6
		wenig Stärke	0,5	18°		4,1	1,5	14,8	20,4	79,6
2a	22. VI. 25 4 Tage Narkose	junge Pflanzen + 5 vH. Glukose, steril			6,34	1,1	2,5	8,6	12,2	87,8
			0,75	18°		2,5	1,2	10,6	14,3	85,7
2b	26. VI. 25 4 Tage Narkose	blüh. Pflanzen + 5vH. Glukose, steril			4,69	1,5	1,9	6,2	9,6	90,4
			0,75	18°		5,1	1,5	15,4	22,0	78,0

Es zeigt sich also, daß in jungen, ausgewachsenen Blättern bei nur zweitägiger Narkose ebenso wie bei Glucoseernährung und längerer Narkose keine wesentliche Ammoniakvermehrung zu beobachten ist. Die geringe Zunahme des NH₃-N ist auf die Abnahme des Amid-N zurückzuführen. Ein Vergleich dieser Differenzen läßt die Vermutung aufkommen, daß beide NH₂-Gruppen aus dem Molekül abgespalten worden sind. Die jungen Blätter zeigen ferner in beiden Fällen eine Vermehrung des Rest-N. In Versuch 1a war offenbar die Stärke aufgebraucht, so daß bereits Eiweiße angegriffen wurden.

Die alten ausgewachsenen Blätter zeigen außer der Rest-N-Anreicherung in beiden Fällen eine bedeutende Vermehrung des Ammoniak-N, die nicht allein durch die Abnahme des Amid-N zu erklären ist.

Somit erscheint es erwiesen, daß in jungen Blättern Eiweiße nur bei Kohlehydratmangel abgebaut werden. Diese Tatsache stimmt mit den Anschauungen von SCHULZE und PRJANISCHNIKOW über den Amidstoffwechsel völlig überein. Ungeklärt erscheint aber der Stoffwechsel alter Blätter. Zunächst können zwei Ursachen für die Anreicherung löslicher N-Verbindungen verantwortlich gemacht werden. Entweder ist der Abbau stärker als die Synthese in alten Blättern, oder alte Blätter sind zur Synthese von Eiweißen aus Amid- oder allgemein aus ihren Spaltungsprodukten nicht mehr in der Lage. Die Beweisführung

stößt auf mannigfache Schwierigkeiten. Doch dürfte allein der Nachweis, daß in abgeschnittenen Blättern die Synthese von Eiweißen stark gehemmt ist, sehr wertvoll sein. Unter Verweis auf die Schlußbetrachtungen seien hier noch eine Reihe von Versuchen angeführt, die zur Aufhellung dieser eigenartigen Verhältnisse dienen sollten. Sie stärken die Anschauung, daß synthetische Prozesse im N-Stoffwechsel weitgehend unterbleiben mit Ausnahme der Asparaginbildung, sie haben aber noch keine endgültigen Schlüsse gestattet aus den am Eingang dieses Kapitels angeführten Gründen. Für die Beurteilung der Experimente sei noch auf einige sehr wesentliche Eigenschaften junger und alter Blätter hingewiesen. Alte Blätter transpirieren schwächer als junge. Bei Ernährungsversuchen bedeutet es, daß diese mehr Substanz aufnehmen als jene. Dies führt zu verschiedenen Gleichgewichtsverhältnissen und erschwert die Versuchsanordnung. Auch ist bei solchen Versuchen zu beachten, daß nicht die Steigerung des Total-N als Grundwert für die Stoffaufnahme einzusetzen ist, sondern daß immer bedacht werden muß, daß beträchtliche Mengen von aufgenommener Substanz noch in den Leitungsbahnen sich befinden können oder an den Zellwänden adsorbiert sind. Doch habe ich meist die Blätter nach Beendigung der Ernährung auf gewöhnlichem Wasser oder N-freier Nährlösung einige Zeit nachsaugen lassen.

Zunächst wurde ein Versuch angestellt mit Blättern jungen und „mittleren“ Alters, dessen Ergebnisse in Tabelle 20 dargestellt sind:

Versuch: Junge, nicht ausgewachsene Blätter von 40 cm hohen Bohnenpflanzen wurden ebenso wie ihre Primärblätter am 30. VI. 25 4 Tage lang auf 0,5 proz. Asparaginlösung mit 5,0 proz. Glucose gebracht, nachdem die Hälften der Blätter längs der Mittelrippe abgetrennt und analysiert worden waren.

Die Tabelle 20 zeigt, daß die jungen Blätter trotz höheren Total-N-Gehaltes bedeutend mehr N aufgenommen hatten als alte Blätter. Überraschenderweise ist aber sowohl der Zuwachs in Hundertsteln des Anfangswertes, als auch der Zuwachs in Hundertsteln des Gesamtzuwachses in beiden Fällen für den Amid-N derselbe, während die jungen Blätter mehr Eiweiß und weniger Rest-N gebildet haben als die älteren.

Es ist schwer zu entscheiden, ob die verschieden starke Asparaginaufnahme lediglich von verschiedener Permeabilität und verschiedener Oberflächengröße junger und alter Blätter beeinflusst ist, ebenso schwer ist zu entscheiden, ob den eigenartigen Proportionen der Amid-Aufnahme zur Total-N-Steigerung ein eigentümliches Gleichgewichtsverhältnis zugrunde liegt. Wesentlich ist aber die Feststellung, daß jüngere Blätter trotz größeren Eiweißgehaltes mehr Eiweiß gebildet haben als ältere.

Tabelle 20.

		N in vT. des Frisch-Gewichts					
		NH ₃	2. Amid	Rest	Lösl.	Eiweiß	Total
Junge Blätter	Zu Beginn	0,06	0,12	0,97	1,15	6,84	7,99
	4 Tage Asp. + Glucose	0,09	1,78	1,75	3,62	9,22	12,84
	Absoluter Zuwachs	0,03	1,66	0,78	2,47	2,38	4,85
Alte Blätter	Zu Beginn	0,06	0,05	0,41	0,52	4,37	4,89
	4 Tage Asp. + Glucose	0,10	0,74	0,93	1,77	5,15	6,92
	Absoluter Zuwachs	0,04	0,69	0,52	1,25	0,78	2,03
Zuwachs in vH. des Anfangswert	Junge Blätter	50	1380	80	224	35	61
	Alte Blätter	66	1380	127	240	18	41,5
Zuwachs in vH. d. Total-Zuwachses	Junge Blätter	0,60	34	16	51	49	—
	Alte Blätter	2,00	34	26	62	38	—

Instruktiver ist das folgende Experiment (Tabelle 21). Die Versuchsanstellung war so, daß Primärblätter junger Pflanzen und Fiederblätter alter Pflanzen zunächst 3 Tage in abgeschnittenem Zustand verdunkelt wurden, so daß in ihnen Amide angereichert wurden. Bei nun folgender 4tägiger natürlicher Belichtung bauten die alten Blätter weiter Eiweiß ab, die jungen aber regenerierten solches, wenn auch nicht in ausgedehntem Maße. Zu diesem Zweck müßten junge Fiederblätter zur Verfügung stehen, die ich mir leider nicht mehr in brauchbarem Zustande beschaffen konnte. Interessant ist auch, daß die alten Blätter während der 3tägigen Verdunkelung relativ weniger Eiweiß abbauten als junge, wohl wieder ein Beweis dafür, daß von besonders starker Neigung zu dissimilatorischen Prozessen in alten, ausgewachsenen Blättern nicht die Rede sein kann. Es mag noch ausdrücklich bemerkt werden, daß auch in diesem Falle die jungen Blätter „ausgewachsen“ waren.

In der Tabelle 21 ist ein weiterer Versuch dargestellt (*Versuch 2*). Abgeschnittene Blätter von *Phaseolus multiflorus* wurden mit N gefüttert und zerstreutem Tageslicht ausgesetzt. Folgende Blattsorten kamen zur Verwendung: A. Primärblätter junger Bohnenpflanzen. B. Kleine, aber derbe Blätter vom sproßende fruchtender Freilandpflanzen. C. Große, alte Fiederblätter von Freilandpflanzen. Die Ernährung wurde folgendermaßen durchgeführt:

1. 9. IX. 25 Kontrollanalysen,
 - 9.—10. IX. in 0,2 vH. (NH₄)₂SO₄ + 0,2 vH. CaSO₄,
 - 10.—14. IX. in 0,3 vH. NH₄Cl + 0,2 vH. CaSO₄,
 - 14.—15. IX. abgespült in H₂O.
2. Die Asparaginblätter wurden 4 Tage mit 1 proz. Asparaginlösung gefüttert, dann 2 Tage mit den Stielen in Wasser gebracht.

Tabelle 21.

(Vers. 1: N in vH. des Total-N; Vers. 2: N in vT. des Frischgewichtes)

			NH ₃	2. Amid	Rest	Lösl.	Eiweiß	Total
1.	Jung	7. X. 25	0,6	3,9	13,3	17,8	82,2	
		3 Tage dunkel	0,5	13,0	18,3	31,8	68,2	
		weitere 4 Tage belichtet	0,4	11,6	17,2	29,2	70,8	
	Alt	7. X. 25	0,9	1,1	8,1	10,1	89,9	
		3 Tage dunkel	0,7	3,0	11,0	14,7	85,3	
		weitere 4 Tage belichtet	0,5	8,5	12,0	21,0	79,0	
2.	A. Primär- bl.	Kontrolle	0,08	0,38	0,91	1,37	3,22	4,59
		NH ₃ -Licht	1,28	0,67	2,02	3,97	4,58	8,55
		Asparagin-Licht	0,11	3,07	2,83	6,01	4,44	10,41
	B. Jüngere	Kontrolle	0,05	0,03	0,74	0,82	6,94	7,76
		NH ₃ -Licht	1,12	0,11	2,66	3,89	7,50	11,39
		Asparagin-Licht	0,04	1,80	2,67	4,51	7,07	11,58
	C. Alte	Kontrolle	0,04	0,01	0,60	0,65	5,58	6,23
		NH ₃ -Licht	0,92	0,08	2,02	3,02	5,25	8,27
		Asparagin-Licht	0,03	1,72	2,06	3,81	5,36	9,17

Auch der zweite Versuch zeigt ähnliche Verhältnisse. Beachtenswert erscheint die bedeutende Steigerung des Rest-N. in allen drei Fällen. Es muß also der aufgenommene Stickstoff in eine lösliche Form verwandelt worden sein, die nicht gefaßt werden konnte. Dies stimmt mit früheren Versuchen überein und läßt es ratsam erscheinen, bei der Fortsetzung dieser Arbeit auch den Rest-N eingehender zu untersuchen. Hier seien noch vier weitere Versuchsreihen mitgeteilt, die teilweise mit anderem Material durchgeführt worden sind. Die Ergebnisse enthält die Tabelle 22.

1. *Phaseolus multiflorus*. Blattmaterial wie bei 21, 2 B. und 2 C. Die Blätter wurden am 16. IX. 25 geerntet, die Blatthälften zu Kontrollbestimmungen verwendet, die übrigen mit daran belassener Mittelrippe und Blattstiel im Dunkeln in eine Lösung von 0,15 vH. NH₄Cl, 0,07 vH. CaSO₄ und 4,0 vH. Glucose gestellt. Der Versuch wurde am 21. IX. abgebrochen.

2. *Phaseolus multiflorus*. Blattmaterial wie bei 21, 2 A. und 2 C. Die Blätter wurden mit den Stielen in eine mehrmals gewechselte Nährlösung gestellt von folgender Zusammensetzung: MgSO₄, KCl, KH₂PO₄ aa 0,02 vH., CaSO₄ 0,04 vH. NH₄Cl 0,2 vH. Spur Fe₂(SO₄)₃. Der Versuch wurde im zerstreuten Tageslicht angestellt und lief 3 Tage bei schönem Wetter. Die Temperatur war tagsüber durchschnittlich 21°. Vor der Analyse wurden die Blätter noch einen Tag in Wasser gestellt.

Flächenmessungen und Gewichtsbestimmungen zeigten, daß die jungen „ausgewachsenen“ Primärblätter beträchtlich gewachsen waren. Die Blattfläche für 6 Blätter betrug anfangs 364 ccm, nach dem Versuch 469 ccm, das Gewicht erst 7,95 g, dann 9,25 g. Alte Blätter zeigten keine bemerkenswerten Veränderungen.

3. *Amicia*, junge und alte Blätter wie Tab. 18, 3. Die Blätter wurden mit der Oberseite 7 Tage lang auf eine N-haltige Nährlösung wie bei voranstehendem Versuch gelegt, danach noch 1 Tag auf Wasser. Licht- und Wärmeverhältnisse wie oben (22, 2). Bemerkte sei, daß alte Blätter von *Amicia* nur sehr schwach transpirieren.

4. *Xanthosoma violacea*. Am 20. X. 25 wurden von 2 jungen, noch nicht völlig ausgewachsenen Blättern und von zwei alten die Blatthälften längs der Mittelrippe abgetrennt und analysiert. Die übrigen Hälften mit den daran belassenen Blattstielen in eine Lösung von NH_4Cl 0,4 vH. und CaSO_4 0,05 vH. bei 22° $3\frac{1}{2}$ Tage lang bei normaler Beleuchtung gestellt. Die alten Blätter blieben 6 Stunden länger darin. Dann wurden beide noch $2\frac{1}{2}$ Tage in eine Lösung von KCl , KH_2PO_4 , MgSO_4 aa 0,04 vH. gestellt. Die alten Blätter zeigten zwischen den Rippen Gelbfärbung. Gleichzeitig wurden mit gleichwertigem Material Dunkel- und Lichtkulturen angesetzt und zwar von jedem Blatt eine

Tabelle 22.

N in vH. des Frischgewichtes		NH_3	2. Amid	Rest	Lösl.	Eiweiß	Total		
1.	Jung	16. IX. 25	0,06	0,06	0,81	0,93	7,47	8,40	
		bis zum 21. IX. NH_3 + Gluc.	0,19	0,48	1,18	1,85	8,53	10,38	
	Alt	16. IX. 25	0,04	0,03	0,60	0,67	5,60	6,27	
		bis zum 21. IX. NH_3 + Gluc.	0,10	0,42	1,03	1,55	4,85	6,40	
2.	Jung	5. X. 25	0,05	0,34	1,08	1,47	6,33	7,80	
		3 Tage, NH_3 -Licht. . . .	0,39	0,53	1,74	2,66	6,80	9,46	
	Alt	5. X. 25	0,06	0,07	0,59	0,72	5,83	6,55	
		3 Tage, NH_3 -Licht	0,26	0,45	0,91	1,62	5,72	7,34	
3.	Jung	Anfangs	0,07	0,18	0,78	1,03	11,72	12,75	
		7 Tage, NH_3 -Licht	0,19	0,90	2,21	3,30	12,30	15,60	
	Alt	Anfangs	0,07	0,04	0,54	0,65	9,48	10,13	
		7 Tage, NH_3 -Licht	0,70	1,41	1,89	4,02	7,63	11,65	
	Zuwachs		Jung	0,12	0,72	1,43	2,27	0,58	2,85
			Alt	0,63	1,37	1,35	3,37	-1,85	1,52
	Zuwachs in vH. des Anfangswertes		Jung	170	400	180	220	5	22
			Alt	90	3400	250	520	-19	15
	Zuwachs in vH. des Gesamtzuwachs		Jung	4	26	50	80	20	—
			Alt	42	90	89	221	-121	—
4.	Jung	Anfangs	0,08	0,05	0,43	0,56	5,59	6,15	
		NH_3	0,43	0,26	0,76	1,45	6,45	7,90	
		Licht	0,04	0,05	0,41	0,50	5,66	6,16	
		Dunkel	0,15	0,60	1,93	2,68	3,44	6,12	
	Alt	Anfangs	0,04	0,04	0,24	0,32	5,40	5,72	
		NH_3	0,49	0,62	1,60	2,71	3,75	6,46	
		Licht	0,03	0,39	1,22	1,64	4,06	5,70	
		Dunkel	0,08	0,43	1,55	2,06	3,67	5,73	

Hälfte auf Wasser ins Dunkle gelegt, die andere mit dem Stiel in Wasser ans Tageslicht gestellt. Die Mittelrippen wurden natürlich bei der Analyse verworfen.

Bemerkt sei, daß die ermittelte N-Aufnahme nur etwa einem Drittel des aus der Nährlösung entnommenen NH_3 entsprach, so daß beträchtliche Mengen von N in den Blattstielen und Mittelrippen angereichert worden waren.

Die Ergebnisse der in Tabelle 22 dargestellten Versuche zeigen weitgehende Übereinstimmung, wenn auch Übergänge zwischen typisch jungen und alten Blättern auftreten. Im Versuch 2 sind die Zu- bzw. Abnahmen des Eiweiß-N unbedeutend wegen der kurzen Versuchsdauer. Instrukтив ist der Versuch 4, welcher zeigt, daß in *alten Blättern bei Ammoniakaufnahme noch mehr Eiweiß abgebaut wird* als im einfachen Lichtversuch. Doch sollen diese Fälle — soweit es schon möglich erscheint — erst in den Schlußbetrachtungen diskutiert werden. Zusammenfassend kann zu diesem Kapitel gesagt werden:

Eiweißsynthese wird in jungen Blättern bei Gegenwart von genügend Kohlehydraten immer hervorgerufen, wenn Ammoniak oder Asparagin geboten werden. Dabei ist es gleichgültig, ob die Stickstoffquelle im Blatt selbst (durch Dunkelversuch) aus Eiweiß gebildet oder von außen zugeführt worden ist. Überschüsse von Ammoniak werden zunächst als Amide deponiert. Doch ist auch die Zunahme des Rest-N beträchtlich, und es ist sehr fraglich, ob dieser Rest-N Eiweißbausteinen gleichzusetzen ist. Junge Blätter bauen in Gegenwart von Kohlehydraten kein Eiweiß ab, auch nicht in der Narkose.

Alte Blätter vermögen nur schwer oder überhaupt nicht bei Kohlehydratzufuhr ihren Eiweißhaushalt zu balancieren. Sie bauen Eiweiß ab, sowohl, wenn im Lichtversuch Kohlehydrate angereichert werden, als auch wenn im Dunkelversuch Glucose zugeführt wird. Dieser Eiweißabbau wird durch Zufuhr von Stickstoff in Form von Ammoniak oder Asparagin höchstens gehemmt, aber nicht verhindert. Wohl aber wird diese N-Nahrung in Rest-N verwandelt, dessen nähere chemische Beschaffenheit noch ungeklärt ist. Deshalb können alte Blätter auch bei reicher N-Ernährung an Eiweißmangel zugrunde gehen. Alte Blätter transpirieren schwächer und nehmen langsamer Stoffe auf als junge.

VIII. Die Beteiligung der Amide am Stofftransport.

Die voranstehenden Untersuchungen haben ein klares Bild über die Entstehung der Amide in ausgewachsenen Blättern gegeben und die SCHULZE-PRJANISCHNIKOWSchen Hypothese weitgehend bestätigt. Auch die in der vorläufigen Publikation (1925) dieser Arbeit noch erwähnten Unstimmigkeiten, z. B. die Bildung von Amidin in normal beleuchteten abgeschnittenen Blättern, haben durch weitere Versuche eine Erklärung in dem unterschiedlichen physiologischen Verhalten verschieden alter

Blätter gefunden. Schließlich haben die Experimente über die Verarbeitung des Asparagins auf graduelle Unterschiede zwischen jungen und alten Blättern hingewiesen.

Nur ein Moment ist im Verlaufe der bisher beschriebenen Untersuchungen noch nicht näher beleuchtet worden: Das häufige und ansehnliche Auftreten der Amide in den Achsenorganen, in Stengeln und Blattstielen, das PFEFFER (1872) zu seiner Hypothese führte, wonach das Asparagin in erster Linie einen für den Stofftransport hervorragend geeigneten und dementsprechend verwendeten Stoff darstellen sollte.

Die Anhäufung der Amide in den Leitungsbahnen ist oft sehr beachtlich, wie mannigfache Hinweise in der Literatur zeigen (PFEFFER 1871, 1876, EMMERLING 1887, SCHULZE und CASTARO 1903 usw.). Doch läßt diese Anreicherung allein keinen sicheren Schluß zu, um eine Entscheidung über die Frage der Beteiligung der Amide am Stickstofftransport herbeizuführen.

Keimpflanzen haben einen hohen Asparagingehalt im Stengel und im Hypocotyl (PFEFFER 1872), und es kann kein Zweifel bestehen, daß ein großer Teil des Stickstoffs in dieser Form auch transportiert wird; doch entscheidet dies keineswegs das Problem, da die Bildung der Amide in keinem Zusammenhang mit ihrer Wanderung zu stehen braucht. Die Amide werden eben transportiert, weil sie nun einmal da sind.

Selbst in ausgewachsenen Pflanzen muß das Vorkommen des Asparagins in Stengeln einer eingehenden Prüfung unterzogen werden. Kann ihm doch eine mannigfaltige physiologische Bedeutung zukommen. Es kann eine Speicherform des Stickstoffes sein, es kann die entgiftete Form des von den Wurzeln aufgenommenen Ammoniaks sein und als solche den Blättern zustreben, es kann die Transportsubstanz der Reserveproteine der Blätter sein und endlich auch das Endprodukt eines oxydativen Eiweißabbaues. Jedenfalls ist es unmöglich, einfach auf Grund eines Nachweises größerer Mengen von Asparagin in den Achsenorganen auf seine spezifische Rolle bei der Stoffleitung zu schließen. Wenn auch der N-Reichtum seines Moleküls zu dieser Annahme veranlaßt, so können doch lediglich rein zahlenmäßige Betrachtungen eine Lösung dieses Problems herbeiführen. Denn wenn schon der N in löslicher Form transportiert wird, wofür eine Reihe von Untersuchungen über das Überwiegen dieser Fraktion in den Achsenorganen (HORNBERGER 1882, EMMERLING 1887, SCHULZE und CASTARO 1903, SUZUKI 1897/98 usw.) sprechen, dann kann eine besondere Bedeutung des Asparagins lediglich durch Vergleiche der vorhandenen Mengen mit dem löslichen N erwiesen werden und nicht durch einfache Beziehungen auf den Total-N oder gar auf das Frischgewicht.

Eine Reihe von anderen Befunden scheinen ebenfalls für eine Beteiligung der Amide am Stofftransport zu sprechen. Vor allem die nächtliche Auswanderung aus Blättern und die Aufspeicherung in abgeschnittenen Blättern. Diese Ergebnisse haben auch CHIBNALL (1924, VI) veranlaßt, für die PFEFFERSche Hypothese einzutreten.

Um zur Klärung dieser eigenartigen Verhältnisse beizutragen, habe ich nun selbst eine Anzahl Untersuchungen vorgenommen in der Hoffnung, durch die Neuartigkeit der Methode nicht allein die Rolle der Amide, sondern die löslicher Verbindungen überhaupt beim N-Transport aufzuhellen. Vor allem erschien es möglich, mit Rücksicht auf die geringen Materialmengen, die die Methode noch einwandfrei zu analysieren gestattet, der Lokalisation der einzelnen N-Verbindungen nachzugehen. Dabei bin ich von Arbeiten der oben genannten Forscher ausgegangen und stellte zunächst an Keimlingen Analysen an, die Aufschluß über das Verhältnis des Amid-N sowohl zum Total-N als auch zum löslichen N geben sollten. Da mir nur ein Teil der Untersuchungen beachtliche Ergebnisse lieferte, die übrigen aber gegenüber der großen Zahl älterer Stoffwechselstudien an Keimlingen nichts Neues zu bieten vermochten, seien hier nur wenige Experimente erwähnt.

1. *Versuch* (Februar 1925, Tab. 23). Von jungen Kürbispflanzen, die im ersten Falle (A) eben ihre Keimblätter zur vollen Entwicklung gebracht, im zweiten (B) bereits 3—4 Blättchen entfaltet hatten, wurden verschiedene Pflanzenteile untersucht. Die Rippen einiger Keimblätter wurden in wenigen Minuten mit einem scharfen Messer herauspräpariert und für sich analysiert, ebenso wurden die Stiele der jungen Blätter abgeschnitten und gemeinsam mit den Stengeln verarbeitet.

Tabelle 23.

Stickstoff in	vT. Fr.-Gewicht	vH. Total-N					vH. lösl. N	
		Total	NH ₃	2. Amid	Rest	Lösl.	Eiweiß	2. Amid
Hypocotyle . . .	1,77	0,56	28,57	34,60	63,73	36,27	44,85	54,28
A Keimblätter . . .	4,66	0,16	17,67	7,67	25,50	74,50	30,06	69,32
Rippen d. Keimbl.	2,89	0,22	22,87	32,36	45,45	54,55	28,33	71,19
Hypocotyle . . .	0,94	0,66	14,62	19,60	34,88	65,12	41,90	56,19
Keimblätter . . .	1,80	0,35	3,05	8,80	12,20	87,80	25,00	72,14
B Rippen d. Keimbl.	1,50	0,42	7,91	30,56	38,89	61,11	20,33	78,57
Stengel u. Stiele .	1,91	0,40	6,89	28,08	35,35	64,65	19,43	79,43
Blättchen	6,27	0,14	4,37	6,86	11,37	88,63	38,46	60,38

Die Analysen (Tab. 23) ergeben nun in Übereinstimmung mit an anderen Objekten ausgeführten Untersuchungen, daß ein starkes Anschwellen des Amid-N-Wertes bezogen auf den Gesamt-N noch keines-

wegs ein Vorherrschen innerhalb des löslichen N bedeutet. *So zeigen in beiden Fällen die Rippen der Keimblätter auf Total-N bezogen mehr Amid, auf löslichen N berechnet aber weniger als die Blattspreiten.* Die Achsenorgane zeigen mit den Rippen weitgehende Übereinstimmung mit Ausnahme des Hypocotyls, das ebenso wie die Blätter reichlich Amid aufweist. In beiden Fällen handelt es sich wahrscheinlich um eine N-Speicherung.

2. *Versuch* (Tab. 24). Bei *Lupinus*-Pflänzchen, die 3—5 Blättchen entwickelt haben, finden wir trotz großer absoluter Unterschiede in den einzelnen Fraktionen eine weitgehende Übereinstimmung, wenn wir den Amid-N und den Rest-N auf den löslichen N beziehen. — Auffällig ist auch hier der hohe Amidgehalt im Hypocotyl.

Tabelle 24.

Stickstoff in	vT. Frisch-Gewicht	vH. Total-N					vH. lösl. N.	
		Total	NH ₃	2. Amid	Rest	Lösl.	Eiweiß	2. Amid
Hypocotyle .	6,43	0,31	67,36	21,73	89,40	10,60	75	24
Cotyledonen .	6,53	0,22	54,54	23,92	78,28	21,72	70	30
Stengel . . .	6,34	0,27	62,55	22,12	84,94	15,06	74	26
Stiele	6,93	0,29	63,53	21,70	85,52	14,48	74	25
Blätter	7,51	0,27	36,94	15,82	53,03	46,97	70	29

Da nun in einzelnen Fällen bei Keimpflanzen schwer zu entscheiden ist, ob die in den Achsenorganen aufgefundenen Amide als Wanderstoffe anzusprechen sind oder ob sie in den Stengeln oder Hypocotylen selbst gebildet werden, wofür mannigfache Untersuchungen von E. SCHULZE sprechen, wandte ich mich der Analyse von Blattstielen zu, von denen ich auf Grund der festgestellten nächtlichen N-Auswanderung aus Blättern vermuten konnte, daß sie charakteristischer eine tatsächliche Mitwirkung der Amide beim Stofftransport zeigen würden.

3. *Versuch*. So wurden am 1. XII. 24 von zwei Blättern einer *Colocasia*-Art Blattstiele, Blattrippen und die Blattspreiten auf ihren Gehalt an löslichen und Eiweiß-N untersucht. Die Analysen ergaben (Tab. 25), daß der absolute Stickstoffgehalt von Blattspreite zu den Blattstielen beträchtlich abnimmt, daß umgekehrt die Blattstiele relativ am reichsten an löslichem N sind.

Tabelle 25.

Stickstoff in	vT. Frisch-Gewicht	vH. Total-N	
		Total-N	Lösl. N. Eiweiß
Blattspreiten .	5,50	3,58	96,43
Rippen	1,87	13,68	86,32
Stiele	0,54	18,54	81,46

4. *Versuch.* Eine entsprechende Analyse wurde an Blättern von *Xanthosoma violacea* ausgeführt unter Berücksichtigung der übrigen N-Fractionen.

Dabei ergab sich (Tab. 26) eine ähnliche Verteilung des Total-N und des löslichen N wie bei *Colocacia*. Relativ am meisten Amid-N wurde in den Rippen gefunden, am wenigsten in den Spreiten. Doch muß bemerkt werden, daß der Präparation dieser Objekte solche Schwierigkeiten gegenüberstehen, daß, absolut genommen, der sehr geringe Amidgehalt nahe den durch die Fehlerquellen der Methode stark beeinflussbaren Werten fällt.

Tabelle 26.

Stickstoff in	vT. Frisch-Gewicht	vH. Total-N				vH. lösl. N	
		Total	NH ₃ + 2. Amid	Rest	Lösl.	Eiweiß	NH ₃ + 2. Amid
Spreiten . .	5,57	0,51	5,67	6,18	93,82	8,3	91,7
Rippen. . .	1,61	1,92	10,35	12,27	87,73	15,6	84,4
Stiele . . .	0,475	1,98	16,84	18,82	81,18	10,5	89,5

5. *Versuch* (Tab. 27 a und b). Weiter seien zwei Analysen der Primärblätter der Bohnen mitgeteilt, die am 25. III. bzw. 23. VI. 25 ausgeführt worden sind. Auch hier beobachten wir eine starke Anreicherung des löslichen N in den Achsenorganen. Der Amid-N zeigt seine relativ höchsten Werte in den Stielen, die niedrigsten in den Spreiten. Ebenso verhält sich *Lynosyris vulgaris*, wie aus Tabelle 27 c hervorgeht.

Tabelle 27.

Stickstoff in		vT. Frisch-Gewicht	vH. Total-N					vH. lösl. N	
			Total	NH ₃	2. Amid	Rest	Lösl.	Eiweiß	2. Amid
a Phas. mult.	Stiele. . . .	3,19	0,50	20,60	22,76	43,88	56,12	47	52
	Blätter . . .	4,04	0,06	4,41	13,05	17,52	82,48	25	74
b Phas. mult.	Blätter . . .	5,99	1,3	1,1	9,2	11,6	88,4	10	81
	Stiele. . . .	2,95	3,0	16,5	32,8	52,3	47,7	32	63
	Mittlerippen.	2,92	3,8	4,9	23,4	32,1	67,9	15	73
c Lin. vulg.	Blattspreiten	6,32	1,2	0,8	7,4	9,4	90,6	8,5	79
	Blattstiele. .	1,1	3,4	4,9	26,2	34,5	65,5	14	76

Alle diese Analysen weisen auf eine starke Beteiligung des löslichen N am Stofftransport hin; doch steht der Entscheidung dieser Frage ein schweres Hindernis entgegen. Es ist mit den Mitteln der angewandten Methode nicht zu entscheiden, wie viel von dem in den Achsenorganen

oder in den Blättern enthaltenen Eiweiß plasmatischer Natur ist, wie viel Reserveeiweiß ist. Und es wäre denkbar, daß in den Rippen und Stielen die Reserveproteine an Menge so stark zurücktreten, daß bei dem geringen Total-N-Gehalt eine bedeutende Steigerung der Werte für den löslichen N beobachtet werden muß.

Zur weiteren Klärung dieser Frage wurden Analysen verschiedener Teile der Achsenorgane derart ausgeführt, daß die gemeinhin als leitendes Gewebe bezeichneten Zellverbände möglichst sauber von parenchymatischem Grundgewebe getrennt wurden.

6. *Versuch.* So wurden die in Tabelle 24 bereits erwähnten Hypocotyle junger Lupinenpflanzen mit einem Skalpell in eine innere und äußere Zone geteilt, wobei jene das sogenannte Leitgewebe enthielt.

Die Tabelle 28, 6 zeigt, daß wesentliche Unterschiede in beiden Teilen analytisch nicht faßbar waren; *der innere enthielt mehr Eiweiß und weniger Asparagin.* Doch sind die Differenzen sehr gering.

7. *Versuch.* An älteren 30 cm hohen Lupinenpflanzen wurde eine ähnliche Zonenteilung am Stengel vorgenommen, wobei diesmal das Mark und die Rinde vom Bündelcylinder sorgfältig getrennt wurden. Es liegt in der Natur des Objektes, daß dabei das Mark am saubersten präpariert wird, die übrigen Teile aber stark mit Elementen der nächst inneren Schicht verunreinigt werden.

Die Analysen (Tabelle 28, 7) zeigen, daß, bezogen auf den Total-N, *der Bündelcylinder am ärmsten an Amid, am reichsten an Eiweiß ist.* Doch sind die Differenzen nicht sehr bedeutend, würden aber bei einer absolut sauberen Präparation sicher stärker hervortreten. Auffällig ist, daß der Amidgehalt in allen drei Zonen übereinstimmende Werte zeigt, sobald wir auf den löslichen N beziehen.

8. *Versuch.* Eine solche absolut saubere Präparierung schien aber dann erreicht, wenn man die an Masse bedeutend zurücktretenden Gefäßbündel aus dem Grundgewebe möglichst vollständig und unverehrt herausziehen konnte. Ich habe lange nach einem solchen Objekt gesucht, das ja außerdem noch einen möglichst starken Amidstoffwechsel aufweisen mußte. Ich fand es in *Linosyris vulgaris*, dessen grundständige Blätter bereits mehrere Male im Laufe dieser Untersuchungen verwendet worden sind. Aus den aufgebrochenen Stielen dieser Blätter (Versuch 8) wurden mit einer Pinzette die Bündel einzeln oder zu mehreren herausgezogen. Die Präparation dauerte nahezu 1 Stunde. Um alle Umsetzungen in dieser Zeit zu vermeiden, wurden die Bündel und die Grundgewebestücke in verschlossene Wägegläschen gebracht und in eine Kältemischung gestellt.

Die Masse der Bündel verhielt sich zu der der übrigen Stengelgewebe wie 3,85 : 34,20. Die Analysen dieses Objektes (Tabelle 28, 8) ergaben nun, daß die Bündel bedeutend reicher an Gesamt-N waren als

das Grundgewebe. Selbst wenn man annimmt, daß während der Präparation die Gefäßbündel wegen ihrer größeren Oberfläche mehr Wasser durch Verdunstung verloren haben könnten als die übrigen Stielteile, so können doch solche Differenzen nicht auf derartige Fehlerquellen zurückgeführt werden.

In Übereinstimmung mit den anderen Versuchen sind auch hier die Bündel am reichsten an Eiweiß und am ärmsten an Amid, von dem nur Spuren nachweisbar waren.

Ich werde auf diese interessante Untersuchung im theoretischen Teil dieser Arbeit zurückkommen.

Tabelle 28.

Stickstoff in		vT. Fr. Gewicht	vH. Total-N					vH. lösl. N.	
		Total	NH ₃	2. Amid	Rest	Lösl.	Eiweiß	Amid	Rest
6. <i>L. l.</i>	Hypokotyl, innen	6,87	0,36	63,09	24,88	88,33	11,67	71	28
	„ außen	6,18	0,28	70,07	19,73	90,08	9,92	78	22
7. <i>L. l.</i>	Stengel, Rinde	3,83	0,27	37,56	28,37	66,20	33,80	57	43
	„ Bündel	3,12	0,33	33,79	23,59	57,71	42,29	59	41
	„ Mark	2,73	0,66	41,86	29,57	72,09	27,91	58	41
8. <i>Lin. vulg.</i>	Stiele, Bündel	2,7	5,4	Spuren	24,1	29,7	70,3	—	—
	„ Grundgewebe	1,1	3,4	4,9	26,2	34,5	65,5	—	—

Diese Untersuchungen haben also ergeben, daß wesentliche Unterschiede in anatomisch differenzierten Teilen der Achsenorgane nicht zu beobachten sind. Im allgemeinen ist der Bündelcylinder am reichsten an Eiweiß und ärmsten an Amid.

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurden die Bedingungen der Amidbildung in den Achsenorganen eingehender studiert.

9. *Versuch.* Zunächst wurden (14. IV. 25.) gleichmäßig entwickelte 40 cm hohe Bohnenpflanzen 3 Tage lang verschiedenen Bedingungen ausgesetzt und zwar:

- A. Ein Teil in ein Nordhaus neben Eis bei 8° gestellt.
- B. „ „ „ „ Südhaus bei 20° gestellt.
- C. Ein Teil bei 12° verdunkelt.

Nach 3tägiger differenzierter Behandlung wurden die Spreiten der Primärblätter und ihrer Blattstiele analysiert. Die Analysen (Tabelle 29, 9) ergaben ein übereinstimmendes Verhalten von Blättern und Stielen, wenn wir den Total-N als Vergleichswert benutzen. Bezogen auf den löslichen N zeigten die Stiele ein stärkeres Ansteigen des Amid-N bei höherer Temperatur und in der Dunkelheit.

Während die Blätter nach 3tägiger Verdunkelung eine beträchtliche Einbuße an Total-N aufwiesen, war eine solche bei den Stielen nicht zu bemerken.

Dieser Versuch zeigt also, daß zwischen dem N-Gehalt der Stiele und der Blätter gewisse Korrelationen bestehen. Es hat den Anschein, daß das Überwiegen der Amide in den Stielen auf eine Mehrbildung in den Blättern zurückzuführen ist. Die Annahme erhielt eine weitere Bestätigung durch folgenden Versuch:

10. Versuch. Stiele und Blattspreiten von *Phaseolus multiflorus* wurden am 23. VI. für 53 Stunden ins Dunkle gebracht, die Stiele auf feuchter Zellstoffwatte liegend, die Blätter auf Wasser schwimmend.

Die Analysen ergaben (Tabelle 29, 10), daß die Blätter in dieser Zeit reichlich Amide bildeten, die Stiele aber nicht.

Tabelle 29.

Stickstoff in			vT. Fr.-Gew.	vH. Total-N						vH. lösl. N	
			Total	NH ₃	2. Amid	Rest	Lösl.	Eiweiß	2. Amid	Rest	
9.	A.	Stiele	1,98	7,3	20,5	20,3	48,1	51,9	42,6	42,3	
		Blattspr.	5,17	0,5	4,4	13,1	18,1	82,0	24,1	72,9	
	B.	Stiele	1,96	7,5	25,4	18,9	51,8	48,2	49,8	35,5	
		Blattspr.	5,15	1,2	5,1	14,2	20,5	79,5	25,0	69,0	
	C.	Stiele	1,94	7,7	31,1	19,4	58,2	41,8	53,5	33,3	
		Blattspr.	4,89	0,6	6,5	18,3	25,4	74,6	25,6	71,9	
10.	Anfangs	Stiele	2,95	3,0	16,5	32,8	52,3	47,7	32	63	
		Blattspr.	5,99	1,3	1,1	9,2	11,6	88,4	10	81	
	2 Tage dunkel	Stiele	—	1,7	16,1	33,5	51,3	48,7	31	65	
		Blattspr.	—	1,0	4,8	11,2	17,0	83,0	28	66	
11.	Abends	Stiele	2,12	0,7	22,6	41,5	64,8	35,2	35	64	
		Blattspr.	4,88	0,07	5,2	16,2	21,5	78,5	24	75	
	Morgens	Stiele	2,11	0,7	18,8	43,3	62,8	37,2	30	69	
		Blattspr.	4,64	0,06	3,4	15,5	19,0	81,0	18	82	
12.	Anfangs	Spreiten	5,57	0,51	5,67	6,18	93,82	—	—		
		Rippen	1,61	1,92	10,35	12,27	87,73	—	—		
		Stiele	0,48	1,98	16,84	18,82	81,18	—	—		
	3 Tage warm	Spreiten	6,35	0,13	1,58	12,73	14,44	85,56	11	88	
		Rippen	1,88	1,61	8,30	14,14	24,05	75,95	34	59	
		Stiele	0,58	0,92	7,76	18,21	26,89	73,11	29	68	
	4 Tage kalt	Spreiten	5,80	0,1	0,69	3,70	4,49	95,51	15	82	
		Rippen	1,57	0,9	2,76	5,90	9,56	90,44	29	62	
		Stiele	0,49	1,16	4,16	16,68	22,00	78,00	19	76	

11. *Versuch.* Bei Primärblättern und ihren Stielen von 40 cm hohen in Sand gezogenen Bohnenpflanzen wurde der Nachtstoffwechsel untersucht. Analysen: abends 5,15^h, morgens 9 Uhr. Nachts standen die Pflanzen bei 22° unter einem Dunkelschirm.

Diese Analysen (Tabelle 29, 11) ergaben in Übereinstimmung mit Versuch 9 und im Gegensatz zu Versuch 10 eine weitgehende Übereinstimmung des Stoffwechsels in Blattspreiten und Stielen.

12. *Versuch.* Je drei abgeschnittene Blätter von *Xanthosoma violacea* wurden mit den Stielen in Wasser gestellt und

B. 3 Tage verdunkelt in einem Warmhaus belassen,

C. 4 Tage in ein Kalthaus bei 5° dunkelgestellt.

Analysiert wurden die Blattspreiten ohne Rippen, die Rippen und die Blattstiele.

Wir beobachten abermals ein analoges Verhalten der Stiele verglichen mit den Blättern (Tabelle 29, 12).

13. *Versuch.* Durch einen weiteren Versuch sollte aufgeklärt werden, ob etwa in den Leitungsbahnen proteolytische Enzyme in besonders großer Menge enthalten sind. Dazu wurden Blätter von *Linosyris vulgaris* mit einem Korkbohrer vorsichtig unter Vermeidung größerer Leitbündel ausgestanzt. Die gewogene Blattmasse wurde dann zerrieben, mit Wasser verrührt und unter Zusatz von 1 Tropfen Toluol in eine Glasstöpselflasche gebracht und 2 Tage lang in einen Thermostaten bei 33° gestellt. Ebenso wurde mit Blättern von *Linosyris* verfahren, die nicht ihrer Rippen beraubt wurden. — Nach 2 Tagen wurde in beiden Fällen

- a) der gesamte durch Säurehydrolyse abspaltbare NH_3 ,
- b) der lösliche N,
- c) der Eiweiß-N bestimmt.

Zur Kontrolle wurden Analysen mit entsprechend präpariertem Material, das nicht der Autolyse unterworfen wurde, ausgeführt.

Die Tabelle 30, 1 zeigt, daß in beiden Fällen die Veränderungen gleichmäßig abliefen. Von einer besonderen Anhäufung von proteolytischen Enzymen in den Leitungsbahnen kann also keine Rede sein.

13. und 14. *Versuch.* Damit stimmen auch folgende Untersuchungen an *Amicia zygomeris* überein (Tabelle 30, 2). Blätter von Freilandpflanzen wurden ihrer Stiele und ihrer Mittelrippen beraubt. 8,0 g Blattspreiten wurden ebenso wie 4,0 g Stiele und Mittelrippen mit 4,0 g Blattspreiten fein mit Sand verrieben und mit gleichen Mengen Wasser versetzt. Nach Zusatz von Toluol wurde die Pflanzenmasse der Autolyse überlassen. Im ersten Fall lief das Experiment 4¹/₂ Tage bei 37,4°, im zweiten zunächst 2 Tage bei 33°, dann noch 5 Tage bei 11°. In diesem 2. Versuch wurde am Ende eine elektrometrische p_H -Bestimmung

durchgeführt; im Blattautolysat wurde $p_h = 7,32$, im Stengel-Blatt-Autolysat $p_h = 7,53$ gefunden¹⁾. Zur Beurteilung der Versuche sei noch angeführt, daß sich im Stiel — ausgedrückt in Tausendstel des Frischgewichtes — der lösliche N zum Eiweiß-N verhielt wie 0,55 : 2,55, in der Blattspreite wie 0,79 : 10,30. Auch sei vermerkt, daß die Achsenorgane von *Amicia* sehr wenig Amide enthalten im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Pflanzen. Auch die Autolysate enthalten verschwindende Mengen von Amid, so daß deren Werte mit den NH_3 -Werten angeführt worden sind.

Tabelle 30.

		N in vH. des Total-N	NH_3 + Amid.	Lösl.	Eiweiß
1	Blattspreiten	Kontrolle	2,7	11,1	88,9
		Autolyse	4,2	22,4	77,6
	Blatt + Stiele	Kontrolle	2,6	11,9	88,1
		Autolyse	3,4	21,5	78,5
2	Kontrolle	Blattspreiten	1,6	7,0	93,0
		Blatt + Stiele	2,2	9,5	90,5
	1. Autolyse	Spreiten	13	41,5	58,5
		Blatt + Stiele	9,3	46,0	54,0
	2. Autolyse	Spreiten	9	26,5	73,5
		Blatt + Stiele	6	22,0	78,0

Auch diese Versuche zeigen, daß kein Grund vorhanden ist, in den Mittelrippen oder Blattstielen eine besonders hohe Konzentration an proteolytischen Enzymen zu vermuten. Vielmehr zeigen sie eine schwächere Eiweißspaltung, was dann deutlicher hervortreten würde, wenn wir die absoluten Mengen abgebauten Eiweißes in Rechnung ziehen würden. Erstaunlich hoch ist der Ammoniakgehalt des Autolysates. Ob es sich hier um oxydativ oder hydrolytisch entstandenen handelt, ist auf Grund dieser Experimente nicht zu entscheiden. Deshalb bedürfen diese Untersuchungen einer Ergänzung, wie überhaupt Enzymstudien das Problem weiter klären dürften. Auch die größere Ammoniakanreicherung in dem Autolysat ohne Rippen und Stiele bedarf der Klärung, wobei zu beachten wäre, daß in diesem Versuch trotz größerer Ammoniakmenge ein niederer p_h gefunden wurde. Es ist wahrscheinlich, daß solche Studien kombiniert mit Narkoseversuchen der noch ungeklärten Entstehung des Asparaginskelettes aus Kohlehydraten und des Säurestoffwechsels überhaupt sehr dienlich sind. Doch liegt dies außerhalb des Rahmens dieser Arbeit.

¹⁾ Bei der Durchführung der p_h -Bestimmung half mir Herr Dr. WETZEL in freundlicher Weise. Dafür danke ich ihm auch an dieser Stelle herzlich.

Zusammenfassung der Ergebnisse des Kapitel VIII.

1. Die Achsenorgane sind bedeutend ärmer an Stickstoff als die Blätter.

2. Sie sind relativ reicher an löslichem N und reicher an Amid-N.

3. Die anatomisch differenzierten Teile der Achsenorgane zeigen keine bedeutenden analytischen Differenzen. Die Bündel sind im allgemeinen am reichsten an Total- und Eiweiß-N und am ärmsten an Amid.

4. Zwischen der Verteilung der N-Fractionen in Blättern und Stielen bestehen weitgehende Korrelationen.

5. Es hat den Anschein, daß die Amide und der Rest-N nicht in erster Linie in den Achsenorganen gebildet werden, sondern daß sie den Blättern entstammen. Ihre Bildung in den Blättern scheint aber weniger von der Ableitung als von anderen Faktoren bedingt zu sein, wie sie bereits in den früheren Kapiteln untersucht worden sind, wofür auch die Tatsache spricht, daß Blätter und Stiele voneinander getrennt und denselben Bedingungen unterworfen, die Übereinstimmung im N-Stoffwechsel nicht mehr zeigen.

6. Im Vergleich zu den Blattspreiten kann eine besondere Fähigkeit zur Bildung von löslichem N, speziell von Amid, den Achsenorganen oder Rippen nicht zugesprochen werden.

7. Das Autolysat von Blattspreiten ohne Rippen und Stiele enthält mehr Ammoniak als das der Spreiten mit Stielen, es zeigt aber einen niederen p_H -Wert.

D. Schlußbetrachtungen.

1.

Da im voranstehenden experimentellen Teil abschnittsweise eine Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse vorgenommen worden ist, kann hier auf ihre summarische Zusammenstellung verzichtet werden, soweit es nicht für eine theoretische Behandlung dieser Arbeit notwendig erscheint.

Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen die Amide. Wenn auch im Laufe der Arbeit ihr Rahmen weiter gespannt wurde und durch die Leistungsfähigkeit der Methode einige andere Probleme des N-Stoffwechsels mit berührt werden konnten, so erscheint es doch richtig, wenn ich zunächst die den Amidstoffwechsel direkt betreffenden Ergebnisse in den Vordergrund stelle.

Zu dieser theoretischen Behandlung ist zu bemerken, daß das mannigfaltige Vorkommen des Asparagins und des Glutamins wie auch das des Harnstoffes eine durchaus verschiedene Bedeutung haben kann. Die Amide in Keimpflanzen, reifenden Hülsenfrüchten, Reservestoffbehältern, jungen Blättern, Achsenorganen und in ausgewachsenen Blättern können in jedem einzelnen Falle physiologisch völlig ungleich-

wertigen Quellen entstammen und auch verschiedene Funktionen ausüben; die physiologischen Bedingungen ihrer Entstehung können aber in allen Fällen dieselben sein. Um dies näher zu charakterisieren, sei ein Beispiel den vorliegenden Untersuchungen entnommen: In jungen und alten Blättern kommen Amide vor. Werden die Blätter abgeschnitten und mit den Stielen in Wasser dem Tageslicht ausgesetzt oder im Dunkeln mit Glucose ernährt, so verschwindet in den jungen Blättern das Asparagin, in den alten bleibt es erhalten oder nimmt an Menge zu. Es liegt trotz dieser Verschiedenheiten nahe, daß das sowohl in jungen als auch in alten Blättern vorhandene Amid auf dieselbe Weise, unter denselben Bedingungen, vielleicht sogar in denselben Organen entstanden sein kann. Diese Bedingungen eingehend zu untersuchen, war die erste Aufgabe dieser Arbeit. Das Ergebnis dieses Teils der vorgenommenen Experimente kann folgendermaßen formuliert werden, wobei betont wird, daß es sich lediglich um den Stoffwechsel der Blätter handelt:

1. Amide bilden sich in den Blättern verdunkelter Pflanzen und in abgeschnittenen verdunkelten Blättern (Tabelle 8—10).
2. Diese Amidbildung wird durch Erhöhung der Temperatur gefördert (Tabelle 11).
3. In Blättern, die durch längere Verdunkelung sehr kohlehydratarm geworden sind, geht statt einer weiteren Vermehrung der Amide eine Bildung von Ammoniak vor sich (Tabelle 10, 1 u. 4).
4. Werden abgeschnittene Blätter nicht zu hohen Alters dem Tageslicht ausgesetzt oder im Dunkeln mit Glucose ernährt, so treten keine Amide auf, vorhandene verschwinden und werden zur Eiweißsynthese verwendet (Tabelle 12).
5. Eine zahlenmäßige Betrachtung ergibt, daß die Amide bzw. der Ammoniak lediglich aus Eiweißen oder deren Spaltungsprodukten entstanden sein können.
6. Sauerstoff ist ein begrenzender Faktor der Amidbildung. Seine völlige Abwesenheit verhindert auch in kohlehydratarmen Blättern eine Entstehung von Amid. Es tritt auch keine Ammoniakvermehrung ein. An ihrer Stelle beobachten wir eine Anhäufung des Rest-N, der Aminosäuren bzw. der organischen Basen (Tab. 14)
7. In narkotisierten kohlehydratarmen Blättern, in denen also synthetische Prozesse weitgehend verhindert sind, treten keine Amide auf. Wir beobachten aber reichlich Ammoniak und Rest-N (Tabelle 13 u. 14).
8. In nicht zu alten narkotisierten kohlehydratreichen Blättern treten weder Amide noch Ammoniak auf. Die Bildung des Rest-N geht ungehindert vor sich (Tabelle 19).

9. In autolytischen Versuchen treten ebenfalls keine Amide auf, aber reichlich Rest-N und Ammoniak (Tabelle 30).
10. In nicht zu alten Blättern wird von außen dargebotener Ammoniak bei Kohlehydratreichtum schnell zu Eiweiß verarbeitet, bei Mangel an N-freien Stoffen in Form von Asparagin gespeichert, bei Kohlehydrathunger unverändert in den Zellen deponiert, bis eine Ammoniakvergiftung der Lebenstätigkeit der Blätter ein Ende bereitet (Tabelle 15).
11. In gleichem Material wird von außen dargebotenes Asparagin bei Kohlehydratreichtum zur Eiweißsynthese verwendet, bei Mangel an N-freien Stoffen als solches gespeichert (Tabelle 16).

Diese Ergebnisse stimmen weitgehend überein mit den Beobachtungen DELEANOS (1912), die er bei der Untersuchung des Atmungsstoffwechsels abgeschnittener, verdunkelter *Vitis*-Blätter machte. Er stellte dabei fest, daß die Atmung in den ersten 3 Tagen nur auf Kosten von Kohlehydraten vor sich ging. Nach dieser Zeit, als ein großer Teil der Kohlehydrate aufgebraucht und vor allem die Stärke annähernd verschwunden war, setzte plötzlich ein Eiweißabbau ein, dem nach weiterer mehrtägiger Verdunkelung eine beträchtliche Steigerung des Ammoniakgehaltes parallel lief. DELEANO kam deshalb zu dem Schluß, daß normalerweise Eiweiße nicht im Atmungsstoffwechsel verbraucht werden. Diese Ansicht hat neuerdings auch KOSTYTSCHEW (1924) verfochten.

PRJANISCHNIKOW und seine Schüler sind in ihren sehr ausgedehnten und systematisch angelegten Studien über die Rolle der Ammoniumsalze im Stoffwechsel der Keimlinge und über die Bedingungen der Amidbildung zu Schlüssen gelangt, mit denen meine Ergebnisse prinzipiell übereinstimmen.

1899 wies PRJANISCHNIKOW nach, daß der Eiweißzerfall in Keimlingen eine „große Periode“ besitzt und durch eine „große Kurve“ charakterisiert ist, daß die Asparaginhäufung sich ebenfalls durch eine solche große Kurve ausdrücken läßt, die im wesentlichen der Eiweißzerfallskurve parallel läuft, gegen Ende der Keimung sie aber überschneidet. Der Eiweißzerfall geht dann also langsamer vor sich als die Asparaginbildung, als deren Quelle Nichteiweiße angesehen werden müssen. Auf Grund dieser Ergebnisse und von der Tatsache ausgehend, daß eine Regeneration von Eiweißen noch nicht eindeutig auf Kosten des Asparagins beobachtet worden war, gelangte PRJANISCHNIKOW zu dem Schluß, daß die Bildung der Amide ein sekundärer Prozeß sei, dem eine Hydratation der Eiweiße vorausginge. Er vereinigte die ältere Hypothese SCHULZES (1880), der sich für eine hydrolytische Eiweißspaltung eingesetzt hatte, mit der von LOEW (1896) und PAL-

LADIN (1888), die eine Oxydation des Eiweißes als Ursache der Asparaginbildung sehen wollten, indem er im sekundären Prozeß dem Sauerstoff eine entscheidende Bedeutung zusprach. Meine Untersuchungen haben diese ersten Arbeiten PRJANISCHNIKOWS voll bestätigen können. Ich habe festgestellt, daß auch in verdunkelten Blättern der Eiweißabbau eine große Periode besitzt und seine Geschwindigkeit verringert wird, je weiter sich die Eiweißmenge einem bestimmten, den Lebensprozeß begrenzenden Minimum nähert. Trotz der Verlangsamung des Eiweißabbaues geht die Amidbildung auf Kosten des Rest-N weiter.

Eine Eiweißregeneration auf Kosten des Asparagins nachzuweisen, ist PRJANISCHNIKOW im Jahre 1899 eindeutig gelungen. Er deutete bereits in dieser Publikation an, daß die Stätten stärkster Eiweißbildung aus Amidin die Blätter seien. Ich habe auch diese Befunde voll bestätigen können durch die Untersuchung des Verhaltens von außen aufgenommenen oder in den Blättern selbst gebildeten Asparagins bei Kohlehydratzufuhr.

In den Arbeiten von 1910 und 1912 hat PRJANISCHNIKOW eingehend die Asparaginbildung auf Kosten von Ammoniak und ihre Abhängigkeit vom Kohlehydratgehalt in Keimlingen untersucht und kam zu dem Schluß, daß die höhere Pflanze bei Gegenwart von Kohlehydraten Ammoniak in Asparagin verwandelt und in dieser „entgifteten“ Form speichert, sofern die Bedingungen einer Eiweißsynthese nicht gegeben sind. Auch beobachtete er, daß Kohlehydratmangel eine der wesentlichsten Bedingungen der Amidbildung ist und daß bei Kohlehydrat-hunger selbst diese nicht mehr vor sich geht, sondern Ammoniak anreichert wird.

Auch diese Befunde habe ich bei Blättern sowohl im abbauenden Stoffwechsel als auch bei Ammoniakernährung bestätigen können.

Nachdem es mir weiterhin gelungen ist, Parallelen zu BUTKEWITSCHS Versuchen an narkotisierten Keimlingen zu geben, können grundsätzliche Unterschiede zwischen der Amidbildung in Keimlingen und Blättern nicht gesehen werden. Die bei der Amidbildung ablaufenden Prozesse stellen sich folgendermaßen dar:

1. *Eine hydrolytische Eiweißspaltung kann immer stattfinden und ist unabhängig vom Kohlehydratgehalt, aber beeinflussbar durch die Wärme. Sie wird leicht verdeckt durch den Ablauf entgegengesetzter Prozesse (siehe Narkoseversuche).*
2. *Eine Oxydation dieser Spaltungsprodukte findet nur bei Kohlehydratmangel statt. Es handelt sich offenbar um Prozesse zur Energiegewinnung. Die Spaltungsprodukte des Eiweißes sind deshalb in diesem Falle als Atmungsmaterial anzusehen. Die Oxydation verläuft unter Abspaltung von Ammoniak.*

3. *Bei Gegenwart von Kohlehydraten wird dieses Ammoniak als Asparagin „gespeichert“ und dadurch „entgiftet“.*
4. *Von außen aufgenommenener Ammoniak verhält sich analog dem in der Pflanze entstandenen.*

Nachdem IWANOFF (1923, 1924, 1925) für die höheren Pilze, BUTKEWITSCH (1903) für die niederen ein analoges Verhalten beschrieben haben, ist anzunehmen, daß es sich hier um allgemeingültige Vorgänge im Pflanzenreiche handelt, die auch mit dem tierischen Stoffwechsel durch bemerkenswerte Parallelismen (PRJANISCHNIKOW 1924) verbunden sind. Der Satz PRJANISCHNIKOWS (1922) „*Das Ammoniak ist die erste und die letzte Stufe in den Umwandlungen der stickstoffhaltigen Stoffe in den Pflanzen, Alpha und Omega dieses Prozesses*“ besteht zu Recht. Es muß in diesem Zusammenhang unwesentlich erscheinen, ob in dem einen Fall Asparagin oder Glutamin, in dem anderen Harnstoff oder in einem dritten Ammoniumsalze organischer Säuren die Funktionen ausfüllen, die PRJANISCHNIKOW als Entgiftung und Speicherung des Ammoniaks gedeutet hat.

Soweit PFEFFER sich mit der Frage der Bildung der Amide beschäftigt hat, muß heute seine Hypothese als nicht mehr aufrechterhaltbar angesehen werden. Noch 1897 sprach PFEFFER sich für eine direkte Entstehung des Asparagins aus dem Eiweiß aus, obgleich SCHULZE seit Jahren die Forderung erhoben hatte, daß die Eiweißspaltung in der Pflanze analog der Hydrolyse *in vitro* verlaufen müßte. PFEFFERS Hypothese ist in einer Zeit entstanden, wo die Eiweißchemie vor einer Revolution stand. Unter anderen hatte LOEW (1896) es wahrscheinlich machen wollen, daß die Eiweißbausteine bzw. Spaltungsprodukte nicht in ihm präformiert wären, ein Gedanke, der heute keine Berechtigung mehr hat. Es bleibt PFEFFERS Verdienst, die Abhängigkeit der Asparaginbildung bzw. der Eiweißregeneration vom Kohlehydratgehalt als erster ausgesprochen zu haben. Seine Stellung zur Frage der Beteiligung der Amide am Stofftransport wird später noch zu diskutieren sein.

2.

Ich habe in den voranstehenden Zeilen die Bildung der Amide in ausgewachsenen Blättern behandelt und dabei eine Anzahl Beobachtungen als „typische“ in den Vordergrund gestellt. Nun muß weiter untersucht werden, ob auch nichttypische Fälle sich den Folgerungen des ersten Abschnittes dieses Kapitels unterordnen.

Hierunter fallen zunächst alle Vorkommen von Amididen in Pflanzenteilen, die reich an Kohlehydraten sind; dabei sind am leichtesten alle jene Fälle in die SCHULZE-PRJANISCHNIKOWSche Erklärung, der ich ja zustimme, einzuordnen, wo die Amide nicht in den betreffenden Organen

entstanden sind, sondern ihnen gewissermaßen als Reservestoffe zugeleitet wurden. Es entspricht völlig unseren allgemeinen Vorstellungen vom regulatorischen Wirken der Zellen, wenn wir den Pflanzen die Fähigkeit zusprechen, die Bildung von Eiweiß aus den Amid- und N-freien Stoffen nur dann vorzunehmen, wenn eine Notwendigkeit besteht, wenn es zweckmäßig ist. Daß eine weitere Klärung dieses regulatorischen Waltens in den meisten Fällen bisher unmöglich schien, ist lediglich ein Beweis für die Mangelhaftigkeit der Methoden. Wenn wir aber auf Schritt und Tritt dieser Fähigkeit des pflanzlichen Organismus begegnen, kann an ihr nicht mehr gezweifelt werden. Nun handelt es sich im vorliegenden Fall um Tatsachen, die auf verschiedenen Wegen experimentell erhärtet werden konnten. So hat IWANOFF (1924) darauf hingewiesen, daß in alten Pilzen Harnstoff auch bei Glucosefütterung nicht verschwindet und in diesem Falle als Abfallsstoff zu betrachten ist, während in jüngeren Pilzen dieses Nebeneinander der beiden Stoffe zur Eiweißsynthese führt. Auch ist durch HANSTEEENS Arbeiten (1896, 1899) wahrscheinlich gemacht worden, daß nicht schlechthin Kohlehydrate für die Eiweißsynthese aus Amid- nützlich sind, sondern ganz bestimmte (vgl. auch BORODIN 1878). Die für die vorliegende Arbeit wichtigen Vorkommen von Amid- und Kohlehydraten in demselben Gewebe sind in unterirdischen Reservestoffbehältern, jungen Blättern und in reifenden Früchten beobachtet worden. Soweit Asparagin und Glutamin in diese Organe eingewandert ist, können wir ihm die Bedeutung eines Speicherstoffes zusprechen.

Daß Amide tatsächlich die Eigenschaft von Speicherstoffen besitzen können, ist meines Erachtens durch die Untersuchungen von PRJANISCHNIKOW (1924) und seinen Schülern und von IWANOFF (1924) erwiesen. Durch meine eigenen Experimente habe ich nachweisen können, daß bei Kohlehydratmangel das in abgeschnittene Blätter aufgenommene Ammoniak so lange als Asparagin gespeichert wird, bis eine Eiweißsynthese auf Grund des Auftretens von Kohlehydraten ermöglicht wird. Zeigen doch auch abgeschnittene junge Blätter bei Glucoseernährung oder CO₂-Assimilation eine langsame Verwendung der Amide zur Eiweißsynthese. Daß auch in diesen Organen Amide und reduzierende Zucker nebeneinander beobachtet worden sind, hängt wahrscheinlich mit dem N-Reichtum zusammen. Die Amide werden im Laufe der Neubildung von Plasma verbraucht.

3.

Ein weiterer atypischer Fall ist das Amidvorkommen in *älteren Blättern*. Die Versuche in Kapitel VII haben eindeutig gezeigt, daß im Gegensatz zu jungen Blättern in alten eine Bildung der Amide völlig unabhängig ist vom Kohlehydratgehalt. Dieses Verhalten scheint im engem Zusammenhang mit Beobachtungen anderer Autoren zu stehen

und Feststellungen in verschiedenen Kapiteln meiner Arbeit zu bestätigen. Deswegen sei etwas ausführlicher darauf eingegangen.

Im ersten Abschnitt des experimentellen Teils hat sich gezeigt, daß Blätter im Laufe einer Entwicklungsperiode immer ärmer an Eiweiß-N werden. Dieser Eiweißverminderung geht bei Blättern an der Pflanze eine Abnahme des Total-N-Gehaltes parallel. Die Produkte, die bei diesem Eiweißabbau auftreten — denn es erscheint sehr unwahrscheinlich auf Grund der Versuche über den Nachtstoffwechsel usw., daß die Eiweiße als solche das Blatt verlassen —, sind sowohl Amide als auch andere lösliche Verbindungen. Ammoniak tritt unter natürlichen Bedingungen nicht auf, da die Gegenwart der Kohlehydrate eine Amidbildung ermöglicht. Bei abgeschnittenen alten Blättern ist diese Abwanderung der Spaltungsprodukte verhindert. Sie sammeln sich an und können analytisch leichter gefaßt werden. Wie nun Blätter, die noch im Zusammenhang mit der Pflanze stehen, bei einem bestimmten Eiweißgehalt zu vergilben beginnen, so geschieht es auch bei abgeschnittenen trotz der Gegenwart von anderen N-Verbindungen. *Das Vergilben ist in diesem Lebensstadium des Blattes nicht mehr aufzuhalten. Es muß zum Tode führen.* Damit ist aber eine interessante Parallele zu den Versuchsergebnissen von H. ULLRICH (1924) gefunden, der, die Beobachtungen früherer Autoren ergänzend, zeigen konnte, daß zwischen der Größe der Chloroplasten, der Farbe des Blattes und dem Eiweißgehalt ein enger Zusammenhang besteht. Obgleich diese Untersuchungen, wenigstens soweit sie den Eiweißgehalt betreffen, mehr qualitativer Art sind, so kann ich sie doch voll bestätigen. Auch möchte ich mich der Meinung anschließen, daß nicht alles in den Chloroplasten enthaltene Eiweiß Reserveeiweiß ist. — Ich habe nun noch nicht zeigen können, ob auch junge Blätter, zum Vergilben gebracht, nicht mehr imstande sind, ihre grüne Farbe zu regenerieren. Das wäre um so bedeutsamer, als auch nach meinen Untersuchungen ein enger Zusammenhang zwischen Eiweißsynthese und Tätigkeit der Chloroplasten besteht, der direkt kaum etwas mit der CO₂-Assimilation zu tun haben kann, dessen causales Verhältnis mir aber völlig ungeklärt erscheint. Interessante Parallelen hierzu finden wir in mannigfachen Studien über den Stoffwechsel der Panaschüren (siehe besonders PANTANELLI) und bei A. MEYER (1918).

Die alten Blätter unterscheiden sich also von den jüngeren fundamental durch die Unfähigkeit, selbst bei Kohlehydratreichtum aus den Spaltungsprodukten ihrer Eiweiße diese zu regenerieren. Beim Experiment mit abgeschnittenen Blättern werden diese Verhältnisse nur quantitativ verschoben. Prinzipiell ist unter natürlichen und künstlichen Verhältnissen kein Unterschied zu finden. So ist es leicht zu beobachten, daß an vielen krautigen Pflanzen die untersten Blätter

auch bei großer N-Zufuhr unter den Erscheinungen des Eiweißhungers absterben; in besonderem Maße zeigen diese Eigenschaft die Primärblätter der Bohne, deren Funktion bald erschöpft erscheint und die überhaupt den Eindruck machen, als wären sie nur eine Art Durchgangsstation für N-Verbindungen in jungen Pflanzen. Deshalb stellen sie auch ein sehr gutes Versuchsmaterial für den vorliegenden Zweck dar.

Wenn ich die hier beschriebenen Eigenschaften älterer Blätter kurz als Alterserscheinung bezeichne, so soll mit diesem Begriff weder eine Aufklärung der Ursachen versucht noch behauptet werden, daß diese Veränderungen im Blatt mit dem Absterben in direktem Zusammenhange stehen. Vielmehr liegen der Beginn dieses Prozesses und das Absterben oder Abfallen der Blätter unter natürlichen Bedingungen weit auseinander. Auffällig aber ist, daß abgeschnittene Blätter dieses Altersstadium bis zum Tod schneller durchlaufen als die an der Pflanze befindlichen. Aber nichts deutet darauf hin, daß unter natürlichen Bedingungen etwa dem raschen Eiweißabbau ein fast gleichgroßer Eiweißaufbau parallel ginge. Dann müßte es nämlich gelingen, unter den für die Synthese günstigsten Bedingungen einmal eine positive Eiweißbilanz zu erzielen. Das ist aber kaum als gelungen zu bezeichnen. Ich möchte trotzdem auf Grund der bisher vorliegenden Ergebnisse nicht soweit gehen, daß ich den alten Blättern jede Fähigkeit zur Eiweißsynthese abspreche. Mindestens ist sie stark gehemmt, wofür auch spricht, daß von den jungen zu den alten Blättern alle Zwischenformen vorhanden sind. *Das Altern der Blätter ist also charakterisiert durch ein immer stärkeres Überwiegen des Abbaues.* Und daß dies — wie bewiesen werden konnte — nicht auf eine absolute Steigerung des Abbaues zurückzuführen ist, ist eines der wesentlichsten Beweismittel der hier geäußerten Ansicht. *Denn es konnte mehrfach gezeigt werden, daß bei Ausschaltung der Synthese junge Blätter eine stärkere dissimilatorische Tätigkeit zeigen als alte.* Dies stimmt auch mit manchen von anderen Autoren gemachten Beobachtungen überein.

Unterstützt wird das hier Gesagte durch die Beobachtungen CHIBNALLS (1924, VI), die mit den meinigen weitgehend übereinstimmen. Er brachte abgeschnittene Fiederblätter der Bohne mit den Stielen in Wasser ins Dunkle und ins Tageslicht, und in beiden Fällen zeigte sich ein bedeutender Eiweißabbau. Jedoch schloß er aus seinen Versuchen, daß die translokatorische Bedeutung der Amide außer Zweifel gesetzt sei. Ich kann mich dieser Ansicht nicht ohne weiteres anschließen, wie ich im nächsten Abschnitt ausführen werde, vor allem auch deshalb nicht, weil es nicht angeht, einmal Gleichgewichtszustände zur Beurteilung heranzuziehen und im anderen Fall diese zu ignorieren. Solange nicht das Gegenteil experimentell festgestellt ist, bin ich zu der Anschauung geneigt, daß in abgeschnittenen Blättern aus Gründen der Zweckmäßigkeit

keit und unter Berücksichtigung von Gleichgewichtsverhältnissen *die* Prozesse unterbleiben, die, final betrachtet, der Translokation dienen; ebenso wie ja auch die Stärke im abgeschnittenen Blatt nicht allmählich in die Form von reduzierenden Zuckern verwandelt wird, in der sie zu wandern pflegt, soweit nicht die Unterhaltung der Atmung diese Umwandlung erfordert. Aber zu Ansammlungen von Glucose führt diese Umwandlung nie. Auch hat CHIBNALL nicht den Widerspruch seiner Ergebnisse zu denen DELEANOS (1912) bemerkt, der generell in Blättern einen Eiweißabbau nur dann konstatierte, wenn Kohlehydratmangel eintrat. Durch die oben dargelegten Ansichten ist aber klar geworden, daß all diese Versuche mehr oder weniger vom Zufall abhängig waren, dieses oder jenes Blattmaterial zu finden.

Ob nun Blätter aller höheren Pflanzen diese Eigenschaften zeigen? Dies ist sehr wahrscheinlich, bedarf aber der Prüfung. Doch weist die Literatur manchen beachtenswerten Parallelismus auf. So ist die Bildung von Eiweißen in Blättern experimentell nicht immer gelungen. Nur ist es zwecklos darüber zu diskutieren, weil alle Angaben über das Blattalter fehlen. Aber ich möchte nicht verfehlen, auf die Beobachtung IWANOFFS an alten Champignons hinzuweisen (1924). Er schreibt (S. 386): „Charakteristisch ist, daß der Prozeß der Harnstoffassimilation besonders deutlich bei jungen Exemplaren verläuft. In alten Fruchtkörpern wird diese Erscheinung nicht beobachtet; das hängt damit zusammen, daß nach der Sporenbildung die synthetischen Prozesse, welche durch Abnahme des Harnstoffes und eine Zunahme des in Wasser unlöslichen Stickstoffes gekennzeichnet sind, aufhören“. Nach der Schilderung fehlgeschlagener Versuche, alte harnstoffreiche Fruchtkörper von *Tricholoma sordidum* durch Glucosefütterung zur Eiweißsynthese zu bringen, sagt er: „Hieraus ist deutlich zu ersehen, daß es nicht genügt, einfach Glucose zu verabreichen, sondern man muß diese der Pflanze in einer bestimmten Lebensperiode des Pilzes, nämlich zur Zeit der Sporenbildung zusetzen“

Die starke Hemmung synthetischer Prozesse ist freilich nicht allgemein. So wie die CO_2 -Assimilation fortgeht, so geht auch die Bildung des Asparagins auf Kosten von Ammoniak ungestört vor sich. Dies erscheint im Sinne der SCHULZE-PRJANISCHENIKOWSchen Theorie sehr zweckmäßig. Aber die Versuche zeigten auch eine starke Anreicherung des Rest-N auf Kosten zugeführten Ammoniaks oder Asparagins. Die weitere Untersuchung muß sich nun auch auf diesen Rest-N erstrecken; denn falls es sich hier um die Bildung von Eiweißbausteinen handelt, dann würde ja eigentlich nur die Formung des Eiweißmoleküls selbst verhindert sein. Vielleicht aber sind es ganz andere Produkte, die zu dem Asparagin in näherer Beziehung stehen. Denn so wie in den Pilzen der Harnstoff, in anderen Ammoniumsalze organischer Säuren die Rolle

des Asparagins spielen, so könnten auch in den höheren Pflanzen neue Verbindungen mit ähnlichen physiologischen Eigenschaften gefunden werden¹⁾.

Eine Erscheinung, die in allen Versuchen wiederkehrt, blieb bisher noch ungeklärt. Ich habe gezeigt, daß der Abbau in abgeschnittenen alten Blättern schneller vor sich geht als in solchen, die noch in natürlichem Zusammenhang mit der Pflanze stehen. Abgeschnittene Blätter eilen gewissermaßen ihrem Tod — der Zeit des Abfallens — schneller zu als unabgeschnittene. Es würde unnützem Spekulieren gleichkommen, jetzt schon an die Lösung dieses Problems theoretisch zu gehen. Nachdem aber bewiesen ist, daß diese schnellere Eiweißverminderung nicht durch das Fehlen entgegengesetzt verlaufender Prozesse vorgetäuscht wird, weil diese nämlich in abgeschnittenen und unabgeschnittenen gleichermaßen gehemmt sind, mögen zwei Möglichkeiten aufgezeichnet sein, die der weiteren Forschung als Arbeitshypothesen Nutzen bringen könnten. Erstens kann es sich bei abgeschnittenen Blättern um die Ansammlung von Stoffen handeln, die den Eiweißabbau und damit das Altern katalytisch beeinflussen. Oder aber es können diese Stoffe die Spaltungsprodukte der Eiweiße selbst sein, die dann also autokatalytisch ihre weitere Bildung beeinflussen würden. Dies erscheint nicht so unwahrscheinlich, nachdem von verschiedenen Forschern über die mannigfache Stimulierung der Enzymtätigkeit durch Aminosäuren berichtet worden ist. Literatur darüber bringen SPOEHR und MCGEE, deren eigene Arbeit eine Beeinflussung der Atmungsintensität durch löslichen Stickstoff feststellen will. Wenn ich auch die Ergebnisse nicht anzweifle, sie vielmehr für wahrscheinlich halte, so muß doch gesagt werden, daß dieses mühsam zusammengestellte Versuchsmaterial ungeeignet ist, zu einem sicheren Schluß zu kommen. Abgesehen von der Vorsicht, die auf Grund meiner Untersuchungen über den physiologischen Wert verschieden alter Blätter geboten erscheint, ist das zu den einzelnen Versuchen von SPOEHR und MCGEE verwendete Material sehr wenig einheitlich, vor allem in der Atmungsintensität zu Beginn ihrer Versuche, in dem anfänglichen Kohlehydratgehalt und im Gehalt an Aminosäuren. Es ist sehr schade, daß den sehr zahlreichen Tabellen Angaben über den Eiweißgehalt fehlen, das hätte eine Überprüfung der Fehlerquellen erleichtert.

Zur näheren Erläuterung des hier Gesagten seien zwei Beispiele angeführt. Die folgende Tabelle gibt die Tabelle 18 der SPOEHRschen Arbeit wieder. Ihr liegt

¹⁾ Was übrigens den eigenartigen „Amid-N other than Asparagin-N“ betrifft, den CHIBNALL bei längerer Säurehydrolyse abzuspalten vermochte, so konnte ich trotz mehrfacher Stichproben ein derartiges Vorkommen nicht nachweisen. Es ist wohl verfrüht, Betrachtungen über die mögliche Konfiguration solcher „Amide“ anzustellen, da ja auch CHIBNALL seine Ansicht in diesem Punkt wesentlich im Laufe seiner Arbeiten geändert hat.

folgende Versuchsanordnung zugrunde: Blätter von *Helianthus* wurden zu gleichen Portionen a) analysiert, b) 12 Stunden ins Dunkle in eine N-freie Nährlösung gebracht, c) unter denselben Bedingungen außer mit Mineralsalzen noch mit 0,11 vH. Glykokoll ernährt. Die Verfasser schließen aus ihren Versuchen eine Beeinflussung des Kohlehydratverbrauches durch die geringe Mehraufnahme von Glykokoll. Doch sind nach meiner Ansicht unter Berücksichtigung des nie völlig einheitlichen Materials die Unterschiede viel zu gering, vor allem wenn man bedenkt, daß die geringe Vermehrung des Amino-N auf Glykokoll zurückgeführt werden kann, das sich noch in den Leitungsbahnen befindet.

Leaves in —	Dry weight	Amino nitrogen in dry material	Total sugars in dry material
	p. ct.	p. ct.	p. ct.
Original condition	14,36	0,089	11,48
Nutrient solution only	14,31	0,238	3,34
Nutrient solution plus glycocoll	11,35	0,293	2,75

In einem anderen Versuch werden mit Glucose gefütterte verdunkelte Blätter kurze Zeit ans Licht gebracht, dabei geht die CO_2 -Ausscheidung beträchtlich zurück. Da — auf Grund anderer Versuche — im Licht auch eine Verminderung der Aminosäuren beobachtet wurde, soll diese geringere CO_2 -Ausscheidung einer verringerten Atmungsintensität entsprechen, die ihre Ursache in dem Schwanken des Aminosäuregehaltes hat. Ganz abgesehen davon, daß Atmungskohlensäure im Licht zur Assimilation verwendet wird, erscheint es mir überhaupt unmöglich, daß geringe Aminosäureschwankungen solche Differenzen hervorrufen können.

Im Zusammenhang der in diesem Abschnitt verarbeiteten Versuchsergebnisse erscheint der Nachtstoffwechsel in ausgewachsenen Blättern nicht mehr unerklärlich. Junge Blätter mobilisieren nachts bei genügendem Kohlehydratgehalt kein Eiweiß. Ihr Stoffwechsel erscheint ausgeglichen, vermutlich weil ebensoviel löslicher N zuwandert wie zur Eiweißsynthese verbraucht wird. Abgeschnittene junge Blätter zeigen über Nacht deshalb Verminderung des löslichen N.

Alte Blätter zeigen ja immer einen Eiweißabbau. Ob dieser nachts stärker vor sich geht, ist zunächst kaum zu sagen. Sollte es aber doch der Fall sein, dann muß daran erinnert werden, daß zwischen „jungen“ und „alten“ Blättern Übergangszustände sehr zahlreich sind, und es kann Blätter geben, deren synthetisches Vermögen am Tag noch genügt, den Eiweißabbau zu balancieren, nachts aber dazu zu schwach ist. Doch genügt es zweifellos für die hier beobachteten Fälle, wenn wir die stärkere nächtliche Auswanderung mit der Verringerung des löslichen N dadurch erklären, daß nachts der Translokationsstrom stärker ist als am Tag, wie ja auch mancherlei andere Beobachtungen zeigen. Dies wird dadurch bekräftigt, daß abgeschnittene alte Blätter über Nacht ihren löslichen N vermehren. Doch erscheint es sehr wahrscheinlich, daß beträchtliche Mengen des nächtlich auswandernden N, besonders des

Amid-N nicht aus Eiweißen stammt, sondern aus mit dem Transpirationsstrom zugewanderten Ammoniak oder Nitrat. *In die Beobachtung der Aus- und Zuwanderung löslichen Stickstoffs aus alten in junge Blätter ordnet sich nunmehr deren verschiedenes physiologisches Verhalten zwanglos ein. Dort überwiegt der Abbau, hier die Synthese.*

4.

Einer Erklärung viel unzugänglicher hat sich in der vorliegenden Arbeit *die Ansammlung der Amide in den Leitungsbahnen* erwiesen.

Ich habe bereits gezeigt, daß in jungen Blättern eine dauernde Vermehrung des Stickstoffes zu beobachten ist, und daß diese Vermehrung vor allem auf einer Einwanderung von Amid- und anderen löslichen Stickstoffverbindungen beruht, denn abgeschnittene junge Blätter verringern ihren Gehalt an diesen Stoffen und bilden aus ihnen Eiweiß. Umgekehrt zeigen alte Blätter eine einwandfrei beobachtete Stickstoffauswanderung, an der lösliche Verbindungen, vor allem Amide einen wesentlichen Anteil haben. Es spricht viel dafür, konnte aber noch nicht eindeutig bewiesen werden, daß diese Auswanderung von Amid-N, der also eine dauernde Bildung parallel laufen muß, mit der im vorigen Abschnitt beschriebenen Total-N-Verringerung und dem Altern der Blätter aufs engste zusammenhängt.

Wie dem auch sei, so muß doch ein Zusammenhang des Amidgehaltes der Rippen und Achsenorgane mit dem der Blätter als bewiesen angesehen werden, vor allem da es nicht gelungen ist, eine besonders große Befähigung der Achsenorgane und der Blatttrippen zur Proteolyse und Amidbildung nachzuweisen. *Vielmehr zeigen die Blattstiele eine geringere Tendenz zur Bildung von löslichem Stickstoff auf Kosten der Eiweiße als die Blätter.*

Es sprechen also die Versuche dafür, daß die Bildung der Amide nicht in den Achsenorganen selbst, sondern in den Blättern erfolgt, wofür auch die Rückwirkungen von Schwankungen im Stoffwechsel der Blätter auf den der Blattstiele sprechen. Um so wesentlicher wird die Bedeutung der Amide für den Stofftransport, wofür sich ja vor allem PFEFFER (1872, 1897) eingesetzt hat. Seine Untersuchungen beruhten alle auf dem mikroskopischen Nachweise des Asparagins, und es ist bereits im experimentellen Teil eingehend diskutiert worden, warum der absolute Gehalt an Amid- für die Entscheidung dieser Frage nur von geringer Bedeutung sein kann. Noch weniger aber läßt sich aus Stoffwechseluntersuchungen an Keimlingen der Schluß ziehen, daß dem Asparagin eine spezifische Funktion als translokatorische Substanz zukommt. Endlich muß darauf verwiesen werden, daß PFEFFERS einseitige Betonung der Translokation der Reserveproteine der Samen heute keine Geltung mehr beanspruchen kann, da die Amide nicht nur in allen

Organen der Pflanze und während aller Stadien ihrer Entwicklung nachgewiesen sind, sondern auch ihre Auswanderung aus Blättern eindeutig feststeht.

Bevor ich in eine Diskussion der eigenen Versuche eintrete, möge ein kurzer Überblick über die vorliegende Literatur zur Frage der Translokation N-haltiger Substanz gegeben sein. Seit der Entdeckung der Siebröhren durch TH. HARTIG haben sich viele Forscher mit diesen auffällig gebauten Elementen der Leitbündel beschäftigt und ihnen eine große Bedeutung für den Transport der Eiweiße zugeschrieben. Dabei war ausschlaggebend, daß die Siebröhren im Vergleich zu den mit nichtperforierten Wänden versehenen Zellen des Geleitparenchyms vermöge ihrer Siebplatten die Möglichkeit eines schnelleren Strömens kolloidaler Flüssigkeiten gewährleisten. Auch der Reichtum des in den Siebröhren beobachteten Schleimes an Eiweiß (FISCHER 1884, 1885) festigte diese Deutung ihrer Funktion. Jedoch veranlaßte gerade dieses Vorkommen FRANK (1892) und BLASS (1891), in den Siebröhren einen Eiweißspeicher zu sehen. Sie sprachen auf Grund anatomischer und physiologischer Studien den Siebröhren jede Bedeutung für den Eiweißtransport ab.

CZAPEK (1897) sah in den Siebröhren auch die für die Translokation N-freier Stoffe wesentlichen Organe, und KRAUS (1884) fand, daß die Trockensubstanz des Siebröhreninhaltes sich zu 38 vH. aus löslichen Kohlehydraten zusammensetzte. Doch hatte bereits 1885 SCHIMPER wesentliche Einwände gegen eine Wanderung der Kohlehydrate in den Siebröhren vorgebracht, und DELEANO (1911) stellte die CZAPEKSchen Untersuchungen in ihren Schlußfolgerungen in Zweifel. Endlich sei noch auf die Arbeiten DIXONS verwiesen, der sich für eine stärkere Beteiligung des Holzteils am Transport organischer Substanz ausspricht und dem Phloem eine mehr regulatorische Funktion zuweist.

Quantitative Untersuchungen über die Beteiligung verschiedener N-Verbindungen an der Wanderung liegen nicht vor, wenn man nicht die oben erwähnte Arbeit von G. KRAUS in diesem Sinne bewerten will, der feststellte, daß 20 vH. der Trockensubstanz des Siebröhreninhaltes Proteine waren und 30 vH. „Amide“. Mit Hilfe der eingehend beschriebenen Methode habe ich nun mit Erfolg eine Analysierung anatomisch differenzierter Teile der Achsenorgane vornehmen können. Was die Versuche anbetrifft, in denen eine rohe Präparierung verschiedener Zonen der Achsenorgane vorgenommen wurde, so kann ihnen *allein* nur eine relative Bedeutung beigemessen werden. Da aber die bei *Linosyris* sauber und rasch ermöglichte Präparation der Leitbündel bzw. ihre Analyse mit den ersterwähnten Versuchen übereinstimmen, können die Befunde aller Fälle zur Beurteilung herangezogen werden. Dabei ergibt sich als wesentlichstes Ergebnis, daß die Bündel, deren

Masse allerdings relativ gering ist, bedeutend reicher an Gesamt-N und Eiweiß-N sind, als das Grundgewebe. Sie sind ärmer an Amidn als dieses und enthalten bei *Limosyris* gar keine Amide.

Wenn also eine summarische Analyse der Achsenorgane ein Überwiegen des löslichen Stickstoffes im Vergleich zu den Blättern ergibt und so zu dem Schlusse Anlaß geben könnte, daß die löslichen N-Verbindungen in besonderem Maße am Stofftransport beteiligt sind, so ergibt eine fraktionierte Analyse, daß der Inhalt der besonders für die Leitung geeigneten Elemente eiweißreich ist und zwingt deshalb zu dem Schluß, daß die Eiweiße bei der Translokation N-haltiger Substanz doch eine Rolle spielen.

Es ist damit nun keineswegs gesagt, daß nicht auch löslicher Stickstoff wandert. Daß aber die Amide in den Leitbündeln in geringerer Menge enthalten sind als im Grundgewebe oder daß sie ganz fehlen wie bei *Limosyris*, ist doch eine so auffällige Tatsache, daß gegenüber einer wesentlichen Mitwirkung der Amide an der Translokation eine gewisse Skepsis am Platze ist. Was spricht eigentlich für eine solche Mitwirkung? Da ist zunächst der N-Reichtum des Amidmoleküls und seine Wasserlöslichkeit. Dann aber die leichte Verwendung zur Eiweißsynthese in jungen Blättern, die nach unseren chemischen Vorstellungen im allgemeinen beim Ammoniak anfangen wird. Denn es ist außer allem Zweifel, daß zwischen den Reserveproteinen ausgewachsener Blätter und den plastischen Stoffen der jungen weitgehende chemische Differenzen qualitativer und quantitativer Art bestehen, die es unmöglich machen, die hydrolytischen Spaltungsprodukte der Reserveproteine ohne weiteres zur Neubildung von Eiweißen zu verkoppeln. Der Weg über Ammoniak bzw. über die Amide erscheint deshalb unerläßlich. Werden doch auch in jungen Blättern bei Kohlehydratreichtum die Amide schneller verbraucht als der Rest-N.

Wenn also auf Grund dieser zwei allerdings wesentlichen Momente eine Mitwirkung des Asparagins oder Glutamins an der Translokation zweckmäßig erscheint und ihre beobachtete nächtliche Auswanderung aus den Blättern sie wahrscheinlich macht, so muß doch das quantitative Zurücktreten dieser Stoffe in den Leitungsbahnen sehr befremden. Ihre Wanderung müßte im wesentlichen im parenchymatischen Grundgewebe stattfinden, wofür ja bereits PFEFFERS mikrochemische Befunde sprachen.

Doch reichen die bisherigen Untersuchungen nicht aus, dieses Problem endgültig zu lösen, vor allem auch mit Rücksicht darauf, daß den Amidn in den Achsenorganen auch die Eigenschaften von Speicherstoffen zugesprochen werden können, was vorläufig ebenso wenig zu beweisen ist wie ihre translokatorische Bedeutung.

Wie bereits in anderen Dingen die Geschichte des Amidproblems

einen Mittelweg zwischen zwei herrschenden Hypothesen einschlug, so erscheint es auch nicht ausgeschlossen, daß die PFEFFERSche Ansicht über die Funktionen der Amide noch manche experimentelle Stütze erhält. *Doch bin ich auf Grund meiner Untersuchungen und der geprüften Literatur der Meinung, daß primär die Bedeutung der Amide nicht die eines Translokationsmittels sein kann, sondern daß nur dann Amide wandern, wenn sie durch Ansammlung das Gleichgewicht in ihrer Bildungsstätte stören oder wenn sie in jungen Blättern zur Eiweißsynthese verbraucht werden. Es ist aber in beiden Fällen kein Grund vorhanden, in den Amidien einen anderen Stoff sehen zu wollen, als jenes entgiftete Ammoniak, von dessen Bildung zu Beginn dieser Betrachtung eingehend gesprochen wurde.*

Die vorliegende Arbeit wurde in den Jahren 1924 und 1925 im Botanischen Institut der Universität Leipzig ausgeführt. Die Anregung dazu gab mein hochverehrter Lehrer, Herr Prof. Dr. RUHLAND. Dafür und für die dauernde Förderung, die er meinen Untersuchungen und meiner Ausbildung zuteil werden ließ, sage ich ihm auch an dieser Stelle meinen aufrichtigen Dank. Auch bin ich Fräulein stud. phil. ERNA HÜHN für die bereitwillige Hilfe bei der Übersetzung russischer Arbeiten sehr zu Dank verpflichtet.

E. Zusammenfassung.

1. Mit quantitativen mikrochemischen Methoden wurde der N-Stoffwechsel von Blättern und Achsenorganen untersucht unter besonderer Berücksichtigung der Amide.

2. Im Laufe einer Entwicklungsperiode zeigen ausgewachsene Blätter nach Erreichung eines Maximalgehaltes an Total-N eine stetige Stickstoffauswanderung vor allem auf Kosten des Eiweißes. Die Amide und auch die übrigen löslichen N-Verbindungen zeigen nur unregelmäßige Unterschiede ihres absoluten Gehaltes. Relativ nehmen sie an Menge zu.

3. Im Laufe der Nacht findet in ausgewachsenen Blättern eine N-Auswanderung statt, an der die Amide wesentlich beteiligt sind. Abgeschnittene junge Blätter zeigen nachts eine Eiweißsynthese, alte einen Eiweißabbau.

4. Der Gehalt der Blätter an löslichem Stickstoff, insbesondere an Amidien, hängt sowohl vom Alter der Blätter als auch von äußeren Bedingungen ab, von denen die Temperatur und der Kohlehydratgehalt die wesentlichsten sind.

5. Normalerweise findet in Blättern keine Amidbildung auf Kosten von Eiweißen statt. Kohlehydratmangel veranlaßt ihre Entstehung, Kohlehydratmangel das Auftreten von Ammoniak.

Eine hydrolytische Spaltung der Eiweiße ist unabhängig vom Kohle-

hydratgehalt. Unter diesen Spaltungsprodukten sind die Amide von geringerer Bedeutung.

6. In völliger Übereinstimmung mit SCHULZE und PRJANISCHNIKOW konnte bewiesen werden, daß auch in ausgewachsenen Blättern die Bildung der Amide ein sekundärer Prozeß ist, eine Oxydation der hydrolytischen Spaltungsprodukte des Eiweißes. Die Amide sind auch in ausgewachsenen Blättern als Entgifter von Ammoniak zu betrachten.

7. Eine Bestätigung dieser Sätze konnte durch Versuche in Narkose und Anaerobiose und durch künstliche Ernährung mit Ammoniumsalzen und Asparagin erbracht werden. Dabei zeigte sich, daß im Gegensatz zu älteren Blättern die jüngeren die Fähigkeit haben, bei Gegenwart von Kohlehydraten aus diesen Substanzen Eiweiß zu synthetisieren. Übereinstimmend mit SPOEHR wurde gefunden, daß Asparagin den Verbrauch von Kohlehydraten steigert.

8. Ältere ausgewachsene Blätter verlieren allmählich die Fähigkeit der Eiweißregeneration aus den Spaltprodukten. Sie zeigen auch bei reichem Kohlehydratgehalt einen Eiweißabbau unter sekundärer Amidbildung, der bis zum Vergilben und Absterben des Blattes führt. Dieses Vergilben, das in keinem Zusammenhang mit der Menge der in den Blättern enthaltenen löslichen N-Verbindungen steht, entspricht allgemein einem Minimum des Eiweißgehaltes und läßt sich bei diesen Blättern weder verhindern noch aufhalten.

9. Dieses eigenartige Verhalten scheint im direkten Zusammenhang mit dem Amid- und Rest-N-Gehalt der Achsenorgane zu stehen, denen eine besondere Fähigkeit zur Amidbildung oder zur hydrolytischen Eiweißspaltung abzusprechen ist.

10. Analysen anatomisch differenzierter Teile der Achsenorgane zeigten nur geringe Unterschiede in ihrer N-Verteilung. Die Leitbündel waren reicher an Total-N und Eiweiß und ärmer an Amid. Trotz des hohen Gesamtgehaltes der Achsenorgane an löslichem N muß deshalb den Eiweißen eine gewisse Bedeutung im Stofftransport zugesprochen werden. So weit eine Translokation N-haltiger Substanz in Form von Amid. n stattfindet, was trotz mancher dafürsprechender Beobachtungen nicht eindeutig bewiesen werden konnte, so kann diese nur im parenchymatischen Grundgewebe vor sich gehen.

Literaturverzeichnis.

- Balicka-Iwanowska**: Bull. acad. Cracovie, Mathem.-naturw. Kl. 1913. — **Bang, Iwar**: Mikromethoden zur Blutuntersuchung (München: Bergmann). 1922. — **Bernard, Cl.**: Leçons sur les phénomènes de la vie (Paris) 1, 267 ff.: Anesthésie de la germination. 1878. — **Beyer, A.**: Über die Keimung der gelben Lupine. Arch. d. Pharm. 201. 1867. — **Blass**: Untersuchungen über die physiologische Bedeutung des Siebteils der Gefäßbündel. Jahrb. f. wiss. Botanik 22. 1891. — **Borodin, I. P.**: Über die physiologische Rolle und die Verbreitung des Asparagins

im Pflanzenreiche. Bot. Zeitg. **36**, 801. 1878. — Ders.: Die Bedingungen der Ansammlung von Leucin in Pflanzen. (Russ.) Petersb. naturforsch. Ges. **16**. 1885. — **Bousingault, M.**: De la végétation dans l'obscurité. Compt. rend. Paris **58**, 881, 917. 1864. — **Burri, R.**: Die Bakterienvegetation auf der Oberfläche normal entwickelter Pflanzen. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. II, **10**, 756. 1903. — **Butkewitsch**: Über das Vorkommen proteolytischer Enzyme in gekeimten Samen und über ihre Wirkung. Ber. d. bot. Ges. **18**, 185, 358. 1900. — Ders.: Über das Vorkommen eines proteolytischen Enzyms in gekeimten Samen und über seine Wirkung. Zeitschr. f. physiol. Chem. **32**, 1. 1901. — Ders.: Umwandlung der Eiweißstoffe durch die niederen Pilze im Zusammenhange mit einigen Bedingungen ihrer Entwicklung. Jahrb. f. wiss. Botanik **38**, 147. 1903. — Ders.: Regressive Metamorphose der Eiweißstoffe in höheren Pflanzen und die Rolle der proteolytischen Enzyme. Moskau 1904. (Russ.) — Ders.: Das Ammoniak als Umwandlungsprodukt stickstoffhalt. Stoffe in höheren Pflanzen. Biochem. Zeitg. **16**, 411. 1909. — **Chibnall, A. C.**: Investigations on the Nitrogenous Metabolism of the Higher Plants. II. The distribution of Nitrogen in the leaves of the Runner Bean. Biochem. Journ. **16**, 344. 1922. — Ders.: Investigations III. The effect of low temperature drying on the distribution of Nitrogen in the leaves of the Runner Bean. Ibid. **16**, 599. 1922. — Ders.: Investigations IV. Distribution of Nitrogen in the dead leaves of the Runner Bean. Ibid. **16**, 608. 1922. — Ders.: Diurnall variations in the Total Nitrogen Content of foliage leaves. Ann. of Bot. **37**, 511. 1923. — Ders.: Investigations V. Diurnall variations in the protein nitrogen of runner bean leaves. Biochem. Journ. **18**, 386. 1924. — Ders.: Investigations VI. The rôle of asparagine in the metabolism of the mature plant. Ibid. **18**. 1924. — Ders.: Investigations VII. Leaf protein metabolism in normal and abnormal runner bean plants. Ibid. **18**. 1925. — **Clausen, H.**: Beiträge zur Kenntnis der Atmung der Gewächse und des pflanzl. Stoffwechsels. Landwirtschaftl. Jahrb. **19**, 893. 1890. — **Czapek**: Biochemie der Pflanzen. II. Auflage. **2**. 1920. — Ders.: Über die Leitungswege der organischen Baustoffe im Pflanzenkörper. Sitzungsber. d. Akad. d. Wiss. Wien, Mathem.-naturw. Kl. **106**. 1897. — **Dakin, H. D.**: The oxydation of leucin, α -amido-isovalerie acid and of α -amido-n-valerie acid with H_2O_2 . Journ. of biol. chem. **4**, 63. 1908. — **Deleano, Nik. T.**: Über die Ableitung der Assimilate durch die intakten, die chloroformierten und die plasmolysierten Blattstiele der Laubblätter. Jahrb. f. wiss. Botanik **49**, 129. 1911. — Ders.: Studien über den Atmungsstoffwechsel abgeschnittener Laubblätter. Ebenda **51**. 1912. — **Dixon, H.**: Transport of organic substances in plants. Not. of botan. school Dublin **3**, 207. 1923. — Ders.: The transpiration stream. London 1924. — **Emmerling, E.**: Studien über die Eiweißbildung in der Pflanze I. Landwirtschaftl. Versuchs-Stationen **24**, 113. 1880. — Ders.: Studien über die Eiweißbildung in der Pflanze, II. Ebenda **34**, 1. 1887. — Ders.: Studien über die Eiweißbildung in der Pflanze, III. Ebenda **54**, 228. 1900. — **Fischer, A.**: Untersuchungen über das Siebröhrensystem der Cucurbitaceen. Berlin 1884. — Ders.: Studien über die Siebröhren der Dikotylenblätter. Leipzig 1885. — Ders.: Über den Inhalt der Siebröhren in der unverletzten Pflanze. Ber. d. bot. Ges. **3**. 1885. — **Frank**: Lehrbuch der Botanik. I. 1892. — **Godlewski, E.**: Ein weiterer Beitrag zur Kenntnis der intramolekularen Atmung der Pflanzen. Bull. acad. Cracovie, Mathem.-naturw. Kl. **115**. 1904. — Ders.: Über anaerobe Eiweißzersetzung und intramolekulare Atmung in den Pflanzen. Ebenda, B. biol. Abt. 1911. — **Hansteen**: Beiträge zur Kenntnis der Eiweißbildung und der Bedingungen der Realisierung dieser Prozesse im phanerogamen Pflanzenkörper. Ber. d. bot. Ges. **14**, 362. 1896. — Ders.: Über Eiweißsynthese in grünen Phanerogamen. Jahrb. f. wiss. Botanik **33**, 417.

1899. — **Hartig, Th.:** Die Entwicklungsgeschichte des Pflanzenkeimes, dessen Stoffbildung und Stoffwanderung während des Reifens und Keimens. Leipzig 1858. — **Hornberger:** Chemische Untersuchungen über das Wachstum der Maispflanze. Landwirtschaftl. Jahrb. 11, 369. 1882. — **Iwanoff, N. N.:** Über den Harnstoffgehalt der Pilze. Biochem. Zeitschr. 136, 1—8. 1923. — Ders.: Über die Anhäufung und Bildung des Harnstoffes im Champignon. Ebenda 143, 62—74. 1923. — Ders.: Über die Bildung des Harnstoffes in Pilzen. Ebenda 136, 9—19. 1923. — Ders.: Der Pilzharnstoff als Ersatzmittel des Asparagins. Ebenda 154, 376. 1924. — Ders.: Über die Ausscheidung des Harnstoffes bei Pilzen. Ebenda 157, 229. 1925. — **Irving, A. A.:** Ann. of bot. 25, II., 1077. 1911. — **Kinoshita, I.:** On the assimilation of nitrogen from nitrates and NH_4 -salts. Bull. coll. agric. Univ. Tokyo 2, 200—203. 1895. — **Klein u. Kisser:** Die sterile Kultur der höheren Pflanzen. Bot. Abhandl. H. 2. 1924. — **Komm:** Eiweißbildung bei Tier u. Pflanze. Freising-München 1925. 62 S. — **Kostytshew:** Die Pflanzenatmung. Berlin: Julius Springer. 1924. — **Kosutany, T.:** Untersuchungen über die Entstehung des Pflanzeneiweißes. Landwirtschaftl. Versuchs-Stationen 48, 13—32. 1897. — **Kraus, G.:** Über den Siebröhreninhalt von *Cucurbita*. Sitzungsber. d. naturforsch. Ges. zu Halle. 1884. — **Loew, O.:** The energy of living Protoplasm. London 1896. — Ders.: Die chemische Energie der lebenden Zellen. Stuttgart 1899. — Ders.: Dasselbe II. Auflage. 1906. — **Mayer, P.:** Über das Verhalten der Diaminopropionsäure im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chem. 42, 59. 1904. — **Meyer, A.:** Eiweißstoffwechsel und Vergilben der Laubblätter von *Trop. maj.* Flora 111, 85. 1918. — **Myachi, T.:** Can old Leaves of Plants produce Asparagine by Starvation? Bull. coll. agric. Univ. Tokyo 2, 458—64. 1896/97. — **Mothes, Kurt:** Die Bedeutung der Säureamide für den Stickstoffwechsel der höheren Pflanze. Planta, 1, 317. 1925. — **Müller, Karl O.:** Ein Beitrag zur Kenntnis der Eiweißbildung in der Pflanze. Landwirtschaftl. Versuchs-Stationen 33, 311. 1887. — **Otto u. Kooper:** Beiträge zur Abnahme bzw. Rückwanderung der N-Verbindungen aus den Blättern während der Nacht sowie zur herbstlichen Rückwanderung von N-Verbindungen aus den Blättern. Landwirtschaftl. Jahrb. 39, 167. 1910. — **Palladin, W.:** Die Eiweißzersetzung in den Pflanzen bei Abwesenheit von freiem Sauerstoff. Ber. d. bot. Ges. 6, 205. 1888. — Ders.: Über Zersetzungsprodukte der Eiweißstoffe in den Pflanzen bei Abwesenheit von freiem O_2 . Ber. d. bot. Ges. 6, 296. 1888. — **Pantanelli, F.:** Malpighia. 15, 1. 1901—1905. — **Pfeffer, W.:** Über geformte Eiweißkörper und die Wanderung der Eiweißstoffe beim Keimen der Samen. Sitzungsber. d. Ges. z. Befördg. d. ges. Naturwiss. Marburg 1871. — Ders.: Untersuchungen über die Proteinkörner und die Bedeutung des Asparagins beim Keimen der Samen. Jahrb. f. wiss. Botanik 8, 429. 1872. — Ders.: Über die Beziehung des Lichtes zur Regeneration von Eiweißstoffen aus dem beim Keimungsprozeß gebildeten Asparagin. Akad. d. Wiss. Berlin 1873. — Ders.: De l'influence de la lumière sur la régénération des Matières albuminoïdes. Ann. des scienc. natur. 5. sér. 19, 391. 1874. — Ders.: Die Wanderung der organischen Baustoffe in der Pflanze. Landwirtschaftl. Jahrb. 5, 87. 1876. — Ders.: Pflanzenphysiologie. I. Auflage, 1. 1881. — Ders.: Pflanzenphysiologie. II. Auflage, 1. 1897. — **Pregl, Fritz:** Die quantitative organische Mikroanalyse. Berlin: Julius Springer. 1923. — **Prjanischnikow:** Eiweißzerfall und Atmung in ihren gegenseitigen Verhältnissen. Landwirtschaftl. Versuchs-Stationen 137. 1899. — Ders.: Eiweißzerfall und Eiweißrückbildung in den Pflanzen. Ber. d. bot. Ges. 17, 151. 1899. — Ders.: Die Rückbildung der Eiweißstoffe aus deren Zerfallsprodukten. Landwirtschaftl. Versuchs-Stationen 344. 1899. — Ders.: Die Eiweißstoffe und deren Umsatz im Pflanzenorganismus. Moskau 1899. (Russ.) — Ders.: Zur Frage

der Asparaginbildung. Ber. d. bot. Ges. **22**, 35. 1904. — Ders. u. **Schulow**: Über die synthetische Asparaginbildung in den Pflanzen. Ber. d. bot. Ges. **28**, 253. 1910. — Ders.: La synthèse des corps amides aux dépends de l'ammoniaque absorbée par les racines. Rev. génér. de Bot. **25**. 1913. — Ders.: Über den Aufbau und Abbau des Asparagins in den Pflanzen. Ber. d. bot. Ges. **40**, 242. 1922. — Ders.: Das NH_3 als Anfangs- und Endprodukt des N-Umsatzes in den Pflanzen. Landwirtschaftl. Versuchs-Stationen **99**, 267. 1922. — Ders.: Sur le rôle de l'asparagine dans les transformations des matières azotées chez les plantes. Rev. gén. bot. **36**. 1924. — Ders.: Asparagin und Harnstoff. Biochem. Zeitschr. **150**, 405. 1924. — **Saposechnikow**: Eiweißstoffe und Kohlehydrate der grünen Blätter als Assimilationsprodukte. Tomsk 1894. Ref.: Bot. Zentralbl. **63**, 246. Just. Jahresber. **1**, 297 (1895). — **Schimper**: Über Bildung und Wanderung der Kohlehydrate in den Laubblättern. Botan. Ztg. **43**, 737. 1895. — **Schulze, B.** u. **Schütz**: Die Stoffwandlungen in den Laubblättern des Baumes, insbes. in ihren Beziehungen zum herbstl. Blattfall. Landwirtschaftl. Versuchs-Stationen **71**, 299. 1909. — **Schulze, E.**: Über den Eiweißumsatz im Pflanzenorganismus. Landwirtschaftl. Jahrb. **9**, 689. 1880. — Ders.: Über die Bildungsweise des Asparagins und über die Beziehungen der N-freien Stoffe zum Eiweißumsatz im Pflanzenorganismus. Ebenda **17**, 683. 1888. — Ders.: Über den Umsatz der Eiweißstoffe in lebenden Pflanzen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **24**, 18. 1898. — Ders. u. **Castoro, H.**: Beiträge zur Kenntnis der Zusammensetzung und des Stoffwechsels der Keimpflanzen. Ebenda **38**, 199. 1903. — Ders.: Über den Abbau und den Aufbau organischer N-Verbindungen in den Pflanzen. Landwirtschaftl. Jahrb. **35**, 621. 1906. — Ders. u. **Winterstein**: Quantitative Bestimmung des Asparagins und Glutamins. Abderh. Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. II. 513. 1910. — Dies.: Quantitative Bestimmung des Ammoniaks in pflanzl. Organen. Ebenda II. 528. 1910. — Dies.: Studien über die Proteinbildung in reifen Pflanzensamen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **65**, 431. 1910. — Ders.: Studien über die Proteinbildung in reifenden Pflanzensamen. Ebenda **71**, 31. 1911. — **Smirnow, A.**: Über die Synthese der Säureamide in der Pflanze. Ber. d. landwirtschaftl. Akad. Petrowskoje 161. 1920. — Ders.: Über die Synthese der Säureamide in den Pflanzen bei Ernährung mit NH_4 -Salzen. Biochem. Zeitschr. **137**. 1923. — Ders.: Die Eigentümlichkeiten des Stoffwechsels bei den Lupinenkeimlingen in Gegenwart von NH_4 - und Ca-Salzen. Zeitschr. f. Pflanzenernährung. A. **3**, 30. 1924. — **Spoehr, H. A.** u. **Mc.Gee**: Studies in plant respiration and photosynthesis. Carnegie Instit. Publicat. **325**. 1923. — **Stieger, A.**: Untersuchungen über die Verbreitung des Asparagins, Glutamins, Arginins, Allantoinen in den Pflanzen. Zeitschr. f. physiol. Chem. **86**. 1913. — Ders.: Untersuchungen über die Verbreitung des Asparagins, des Arginins, des Glutamins, des Allantoinen und der Hemizellulosen in den Pflanzen. Zürich 1924. — **Suzuki, U.**: On the formation of Asparagine in plants under different conditions. Bull. of agric. Univers. Tokyo II, 409. 1896/97. — Ders.: On a important function of leaves. Ebenda III, 241. 1897/98. — Ders.: On the formation of Asparagine in the metabolism of shoots. Ebenda. IV, 351. 1900/02. — **Takabayashi, S.**: On the poisonous action of Ammonium salts upon plants. Agric. Bull. Tokyo **3**, 265. 1897/98. — **Thoday, D.**: On the effect of chloroform on the respiratory exchanges of leaves. Ann. of bot. **27**, 699. 1913. — **Ulrich, Herm.**: Die Rolle der Chloroplasten bei der Eiweißbildung in den grünen Pflanzen. Zeitschr. f. Botanik **16**, 513. 1924. — **Zalewski**: Zur Kenntnis der Eiweißbildung in der Pflanze. Ber. d. dtsh. bot. Ges. **15**, 536. 1897.