

ZUR PHYSIOLOGISCHEN  
BEDEUTUNG DER BLAUSÄUREGLUKOSIDE  
IM PFLANZENSTOFFWECHSEL

von

N. J. STEKELENBURG.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S .

I. ABSCHNITT.

Einleitung .....	299
------------------	-----

II. ABSCHNITT.

Ueber das Vorkommen der Blausäure in den Pflanzen.

§ 1. Die Blausäureglukoside und ihre Spaltungsprodukte.....	303
§ 2. Die nichtglukosidische Blausäure .....	306

III. ABSCHNITT.

Chemische Methoden.

§ 1. Wahl einer Bestimmungsmethode für die Blausäure .....	309
§ 2. Diskussion der Methode .....	315
§ 3. Die Eiweiszbestimmung .....	320

IV. ABSCHNITT.

Beobachtungen früherer Autoren über die physiologische Bedeutung der Blausäureverbindungen.

§ 1. Die Blausäureverbindungen im Stickstoffwechsel der Blätter; die Hypothese Treubs .....	322
§ 2. Beobachtungen an austreibenden Knospen und an keimenden Samen .....	333

## V. ABSCHNITT.

### Das Verhalten der Blausäure bei der Keimung im Dunkeln.

§ 1. Einleitung und Technisches .....	335
§ 2. Die Versuche .....	337
A. <i>Phaseolus lunatus L.</i> .....	337
B. <i>Prunus Amygdalus Stokes</i> var. <i>amara</i> ..	338

## VI. ABSCHNITT.

### Das Verhalten der Blausäure beim Austreiben.

§ 1. Einleitung und Technisches .....	342
§ 2. Die Versuche .....	345
A. <i>Prunus Padus L.</i> .....	345
B. <i>Prunus Laurocerasus L.</i> var. <i>Schipkaensis</i> Späth. .....	349
§ 3. Zusammenfassung der Austreibungsversuche	354

## VII. ABSCHNITT.

### Das Verhalten der Blausäure in den Blättern.

§ 1. Technisches .....	358
§ 2. Einreihung der Versuchsergebnisse .....	364
A. Der Einflusz des Lichtes .....	364
B. Der Einflusz der Kohlenhydrate .....	371
C. Der Einflusz der Nitrate .....	376
D. Beziehungen zwischen Blausäure und Eiweisz .....	381
§ 3. Zusammenfassung der Blattversuche .....	385

## VIII. ABSCHNITT.

Diskussion der Ergebnisse .....	386
Schlussfolgerungen.....	394
Literatur .....	396

## I. ABSCHNITT.

### EINLEITUNG.

Die Frage nach der physiologischen Bedeutung der Blausäureverbindungen ist seit den Arbeiten Treubs in den Vordergrund des Interesses gerückt worden. Dieser Forscher schrieb der Blausäure eine wichtige Funktion im Pflanzenchemismus zu, denn in seiner bekannten Hypothese betrachtet er diese Verbindung als das erste erkennbare Assimilationsprodukt des Stickstoffes. Treub wurde zu dieser Annahme veranlaszt durch die Ergebnisse, welche von ihm auf qualitativem Wege an *Pangium edule* und mit quantitativen Methoden an *Phaseolus lunatus* erzielt worden waren. In seinen Untersuchungen hat Treub zu beweisen gesucht, dasz die Nitrate einerseits, die Kohlenhydrate anderseits, unbedingt notwendig für die Blausäuresynthese seien. Den Beweis hat er für *Pangium* jedenfalls nicht erbringen können, bei *Phaseolus lunatus* ergab sich aber, dasz die gleichzeitige Anwesenheit von Nitraten und Kohlenhydraten tatsächlich eine Steigerung der Blausäuremenge in den Blättern herbeiführt.

Selbstverständlich haben viele Forscher versucht, diese Hypothese zu prüfen, da sie schwer mit den heutigen Anschauungen über den Stickstoffstoffwechsel zu vereinbaren ist. Diese Forscher verfügten in den meisten Fällen nur über in Europa einheimische Pflanzen. Zumal der Kirschchlorbeer wurde vielfach bei den Untersuchungen verwendet; daneben die Kaffernhirse, *Sorghum vulgare*, welche von Dunstan und Henry als blausäureführend anerkannt worden war.

Viele Autoren, wie Greshoff, Dunstan und Henry, Ravenna, welcher letzte Forscher mit *Sorghum* arbeitete, traten Treub in seinen Anschauungen bei. Andere, wie

Seiler und Rosenthaler, welche den Kirschlorbeer als Versuchspflanze benutzten, sind einer anderen Meinung; letzterer verwirft die Hypothese Treubs; ersterer bleibt neutral, weil er weder Beweise zu Gunsten der Hypothese, noch solche dagegen bringen kann. Das neutrale Ergebnis Seilers vertritt vielleicht den Stand unserer Kenntnisse des Blausäureproblems am besten. Denn, obwohl manche Autoren zu gleichen Ergebnissen kamen wie Treub, so hat doch keiner die Hypothese beweisen können.

Es ist ebenfalls noch nicht bewiesen worden, ob die Blausäure überhaupt ein Assimilationsprodukt ist.

Treub trägt in seiner Arbeit kaum mit einer anderen Möglichkeit Rechnung. Und doch wären seine eigenen Ergebnisse leicht in anderen Weisen zu deuten, welche nicht weniger plausibel erscheinen. Wenn Treub findet, dasz Zugabe von Nitraten und von Kohlenhydraten eine Steigerung des Blausäurebestandes der Blätter herbeiführt, so sagt diese Beobachtung noch nichts aus über den *direkten* Zusammenhang der genannten Stoffe und der Blausäure; ebensowenig reicht sie aus zur Anerkennung der Blausäure als Assimilationsprodukt.

Peché hat zwar auf mikrochemischem Wege zu zeigen versucht, dasz die Bildung der Blausäure an die Chlorophyllkörner gebunden sei, also mit der Kohlensäureassimilation zusammenhänge, doch berechtigen seine Versuchsmethoden nicht zu dieser Schlussfolgerung.

Rosenthaler beobachtet eine grosze Zunahme der Blausäuremenge in Sorghumpflanzen, wenn diese mit Tyrosinlösung eingespritzt werden. Der Autor schlieszt aus diesen Ergebnissen, dasz das Blausäureglukosid hier aus der Aminosäure entsteht. Leider wurden diese Versuche in ungenügender Anzahl angestellt. Wenn das Resultat sich späterhin bestätigen würde, so wird jedenfalls das Monopol der Blausäurebildung, welches Treub den Nitraten zugeschrieben hat, aufgehoben.

Mit der Möglichkeit, dasz die Blausäure in den Blättern ein Dissimilationsprodukt oder ein Abfallprodukt sein könne, wird bei den experimentellen Untersuchungen der verschiedenen Autoren nie ernsthaft Rechnung getragen.

Wir kommen zum Ergebnis, dasz zwar der Blausäure als erstes erkennbares Assimilationsprodukt des Stickstoffes im allgemeinen eine grosze Skepsis entgegengebracht wird, dasz aber, trotz vieler Untersuchungen, die Hypothese Treubs weder als bewiesen, noch endgültig als unrichtig anerkannt worden ist.

Doch ist es für einen guten Begriff der physiologischen Bedeutung der Blausäureglukoside notwendig, sich über die Funktion der Blausäure entschieden zu haben.

Der Zweck der vorliegenden Arbeit war deshalb in erster Linie die Hypothese Treubs durchzuprüfen und zwar mit seinen eigenen Versuchspflanzen, jedoch mit empfindlicheren technischen und chemischen Methoden. Die Verwendung der Versuchspflanzen Treubs, *Pangium edule* und *Phaseolus lunatus*, war empfehlenswert, weil es durchaus nicht ausgeschlossen ist, dasz andere blausäure-führenden Pflanzen zu verschiedenen Ergebnissen führen würden. Aus demselben Grunde wurde der vielfach in Europa studierte *Prunus Laurocerasus* zu den Untersuchungen herangezogen. Diese Maßnahme ermöglicht es, eine Vergleichung mit den tropischen Versuchspflanzen durchzuführen und ausßerdem wird dadurch die Gefahr vermieden, dasz die an einer Versuchspflanze erzielten Resultate verallgemeinert werden.

Daneben wurde versucht die Funktion der Blausäureglukoside und der Blausäure bei anderen Lebenserscheinungen zu erforschen. Treub berichtet uns darüber nicht; dieser beschränkt sich nur auf die Funktion der Blausäure in den Blättern und vom Glukoside ist nicht oder nur beiläufig die Rede.

Als wichtige Vorgänge in dieser Hinsicht kommen die

Keimung von Samen und das Austreiben der Knospen in Betracht. Beide können wertvolle Ergebnisse liefern bezüglich des Wertes der Glukoside, näml. ob diese Körper als Reservestoffe betrachtet werden müssen und, wenn dieses zutrifft, ob von einer Stickstoffreserve oder von einer Kohlenhydratreserve die Rede ist. Ebenfalls sind Angaben zu erwarten über die Frage nach einem etwaigen Transport der Blausäure oder des Glukosides.

Zwar sind wir einigermaßen über diese Fragepunkte unterrichtet, die dabei erhaltenen Ergebnisse sind leider keineswegs mit einander im Einklang.

Bei der Keimung von Samen blausäureführender Pflanzen z.B. wurde oft eine Zunahme der Blausäure beobachtet (Soave, Jorissen u.a.), bisweilen jedoch eine Abnahme (Lehmann), während nach Ravenna zuerst Zunahme, später Abnahme stattfindet. Weitere Ergebnisse sind in dieser Hinsicht deshalb wünschenswert.

Dieselbe Bemerkung gilt für das Verhalten der Blausäure beim Austreiben. Obwohl schon oft gefunden worden ist, dassz beim Austreiben der Blausäuregehalt der Knospen beträchtlich ansteigt (Tuma, Verschaffelt u.a.), wissen wir fast nichts von der Herkunft dieser Blausäure.

Verschaffelt und Rosenthaler, welche mit dem Kirschchlorbeer arbeiteten, kamen zum Ergebnis, dassz von einem Transport der Blausäure nach den jungen Knospen aus den Stengelteilen bzw. aus den vorjährigen Blättern nicht die Rede ist.

Diese spärlichen, zum Teil mangelhaften Angaben veranlaszten mich, das Studium des Austreibens in gröszerem Maßstabe und unter verschiedenen Bedingungen anzufassen. Bei diesen Versuchen wurde ebenfalls auf die Schwankungen der Blausäuremenge in den Zweigen Rücksicht genommen. Als Versuchspflanzen wurden Prunus Padus und Prunus Laurocerasus gewählt. Keimungsversuche sind angestellt

worden mit bitteren Mandeln und mit den Samen von *Phaseolus lunatus*.

---

## II. A B S C H N I T T.

### ÜBER DAS VORKOMMEN DER BLAUSÄURE IN DEN PFLANZEN.

#### §. 1. Die Blausäureglukoside und ihre Spaltungsprodukte.

Dieser Abschnitt beabsichtigt nicht einen vollständigen historischen Ueberblick der im Laufe der Jahre entdeckten blausäureführenden Pflanzen und Blausäureglukoside zu geben. Das wird von der vorliegenden Arbeit nach meiner Meinung auch nicht gefordert. Ich werde nur die verschiedenen Typen der Blausäureglukoside erwähnen und die in Frage kommenden Glukoside eingehender besprechen.\*)

Es sind mit Greshoff<sup>20)</sup> folgende Typen zu unterscheiden:

##### 1. *Benzaldehydcyanhydringlukoside*.

Diese Glukoside geben bei der enzymatischen Spaltung einerseits ein oder zwei Moleküle Monose, in den meisten Fällen Glukose, anderseits das Cyanhydrin des Benzaldehyds oder ein seiner Derivate.

Zu dieser Gruppe gehören: Amygdalin, Prulaurasin, Sambunigrin, Prunasin, Vicianin, Dhurrin u.a.

##### 2. *Azetoncyanhydringlukoside*.

Ein richtigerer Namen wäre vielleicht Ketoncyanhydringlukoside. Hierzu gehören das Linamarin und das Gynocardin. Statt Benzaldehyd spalten sie ein Keton ab.

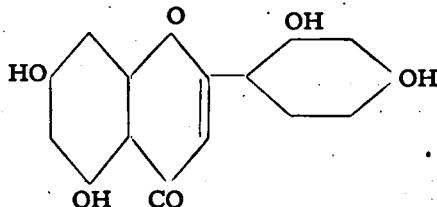
##### 3. *Lotoflavincyanhydringlukoside*.

Das Aglykon ist mit den Flavonen verwandt. Das hier-

---

\* ) Ausführliche Literatur bei Czapek 6), van Rijn 43) und Oppenheimer 33).

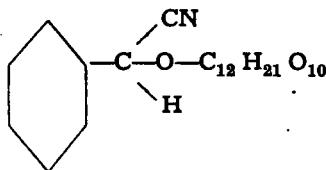
zugehörige Lotusin <sup>9, 10)</sup> spaltet neben 2 Mol. Glukose und 1 Mol. HCN, 1 Mol. Lotoflavin ab:



Neben diesen drei Gruppen gibt es zahlreiche Blausäureglukoside mit unbekannter Struktur und unbekannten Spaltungsprodukten.

Die wichtigsten Glukoside, ebenfalls in bezug auf diese Arbeit, gehören den ersten zwei Kategorien an.

Das 1830 von Robiquet <sup>44)</sup> in der Mandel entdeckte *Amygdalin* ist das ältest bekannte Blausäureglukosid. Emulsin spaltet das Glukosid auf in HCN, Benzaldehyd und 2 Mol. Glukose. Diese Spaltung geht in drei Etappen vor sich:



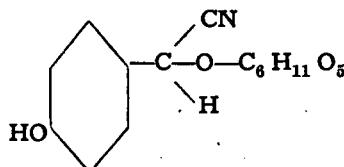
Zuerst wird das endständige Molekül Glukose abgespalten, sodann das zweite Zuckermolekül und schliesslich wird das Oxynitritil in Aldehyd und HCN zerlegt. Das Emulsin ist somit kein einheitliches Enzym; man ist im Stande eine Amygdalase-, eine Prunase- und eine Oxy-nitrilasewirkung daran zu unterscheiden, welche in dieser Reihenfolge die erwähnten Spaltungen herbeiführen. Im übrigen weist das Emulsin noch andere Wirkungen auf, welche hier aber nicht in Betracht kommen.

Das bei der Amygdalasewirkung auf Amygdalin entstandene Glukosid, das *Mandelnitrilglukosid* oder *Prunasin*,

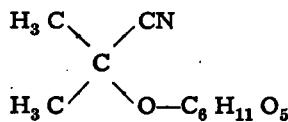
wird u.a. in *Prunus Padus* gefunden (Hérissey 1905).<sup>26)</sup>

*Prulaurasin*,<sup>25)</sup> in *P. Laurocerasus* und in anderen Rosaeaeen, und *Sambunigrin*,<sup>2)</sup> in *Sambucus nigra*, sind mit Prunasin isomer, und zwar in dieser Weise, dasz Prunasin 1-Mandelnitrilglukosid ist, Sambunigrin die d-Form und Prulaurasin der racemische Körper.

Das *Dhurrin*, (Dunstan und Henry 1902)<sup>11)</sup>, C<sub>14</sub> H<sub>17</sub> NO<sub>2</sub>, findet sich in Sorghum-Arten, welche von Ravenna und Mitarbeitern bei ihren physiologischen Untersuchungen benutzt worden sind. Die enzymatische Spaltung liefert HCN, p-Oxybenzaldehyd und 1 Mol. Glukose:



*Phaseolunatin*, C<sub>10</sub> H<sub>17</sub> NO<sub>6</sub>, ist enthalten in Samen und Blättern von *Phaseolus lunatus*, der Rangoon- oder Kratokbohne. Das Glukosid wurde entdeckt von Dunstan und Henry (1903)<sup>12)</sup>; es hat sich als identisch gezeigt mit dem schon früher von Jorissen und Hairs (1891)<sup>30)</sup> gefundenen *Linamarin*, dem Blausäureglukosid in den Samen von *Linum usitatissimum*, und mit *Manihotoxin*, das in *Manihot utilissima* enthalten ist (Pekolt 1886). Diese Glukoside werden nicht von Emulsin gespaltet; das wirksame Enzym, die Phaseolunatase oder Linase, spaltet sie auf in Blausäure, Azeton und 1 Mol. Glukose:



*Gynocardin*, C<sub>13</sub> H<sub>19</sub> NO<sub>9</sub>, ist das Blausäureglukosid des *Pangium edule* (de Jong 1908)<sup>27)</sup>; es ist von Power und Lees<sup>38)</sup> entdeckt worden in *Gynocardia odorata* (1904). Es wird ebenfalls nicht von Emulsin gespaltet.

Die Gynocardase spaltet das Glukosid in HCN, ein noch unbekanntes Diketon  $C_6\ H_8\ O_4$  und 1 Mol. Glukose.

### § 2. Die nichtglukosidische Blausäure.

Es ist eine vielumstrittene Frage, ob in den Blausäurepflanzen sich neben dem Glukosid ebenfalls nichtglukosidische Blausäure vorfindet. Treub<sup>52)</sup> beantwortet diese Frage bejahend und er bestimmt bei seinen zahlreichen Versuchen diese lockergebundene Blausäure („acide cyanhydrique quasi-libre“) gesondert. Er glaubte sich dazu berechtigt, weil bei sofortigem Abtöten von Blättern des Phaseolus lunatus in siedendem Wasser oder Alkohol doch immer nicht unbedeutliche Mengen Blausäure frei werden. Bei Pangium entstehen auf diese Weise erhebliche Mengen, weshalb Treub hier sogar *freie* Blausäure annimmt.

De Jong<sup>27)</sup> ist ebenfalls dieser Meinung, zeigt aber zu gleicher Zeit in unzweideutiger Weise, dass beim Zusammentreffen von Glukosid und Enzym, sogar in alkoholischer Lösung, die Spaltung des Glukosides sehr rasch vor sich geht. Man ist also nicht im Stande, die beim Abtöten der Blätter entstandene Blausäure nur als nichtglukosidisch zu betrachten.

Anlässlich dieser Arbeit nimmt Treub seine Anschauungen bezüglich der lockergebundenen Blausäure zum Teil zurück. In einer späteren Veröffentlichung<sup>53)</sup> versucht er, in Anlehnung an de Jong, die rasche Enzymwirkung zu beseitigen. Indem de Jong das Material bei einer niedrigen Temperatur ( $-10^\circ$ ) abtötet, nimmt Treub dieses vor in siedenden Salzlösungen, in welchen die Temperatur also bis weit über  $100^\circ$  ansteigen kann. Zwar waren die freikommenden Blausäuremengen wesentlich geringer, einer Spaltung der Glukoside konnte jedoch nicht vollständig vorgebeugt werden.

Auch von mikrochemischer Seite ist die Anwesenheit lockergebundener Blausäure behauptet worden.

Bei der von Treub eingeführten Berliner Blauprobe in ganzen Blättern würde nach diesem Forscher die Reaktion von der nichtglukosidischen HCN herrühren.

Betrachten wir diese Probe aber eingehender. Sie wird von Treub auf Vorschlag Greshoffs folgendermassen ausgeführt <sup>61)</sup>:

Das Blatt wird mittels einer Bürste mit kurzen raschen Schlägen bewirkt, schnell in eine alkoholische Kalilösung untergetaucht und sofort darauf in eine Ferroferrisulfatlösung geworfen. Nach einem Aufenthalt, der bei den verschiedenen Objekten von 5 bis 15 Minuten wechselt, wird das Blatt in 20 prozentige Salzsäure gebracht, wo es 5 Minuten verweilt. Die von der Bürste verletzten Stellen sind jetzt blaugerändert, infolge der Bildung von Berliner Blau. Diese Reaktion ist nun m.E. vielmehr der enzymatischen Spaltung des Glukosides bei der Verletzung zu verdanken. Diese Annahme wird gestützt durch die Beobachtung, dasz die Dauer der Behandlung mit der Bürste die Intensität der Reaktion stark beeinfluszt.

Ich möchte weiter an dieser Stelle betonen, dasz die Blausäureprobe Treubs zu groszen Irrtümern führen kann. Eben bei strenger Innehaltung der Versuchsbedingungen, wie Treub sie angibt, sind die Resultate nicht zuverlässig. Zwei Hälften des selben Blattes, z.B. von Phaseolus lunatus, weisen nie dieselbe Reaktionsintensität auf. Zum Nachweis der HCN in blausäurereichen Blättern ist die Probe geeignet, für quantitative Vergleichungen ist sie unbrauchbar.

Wenn also Treub seine ganze Arbeit an Pangium auf diese Probe fuszt, so wird es klar, dasz die Ergebnisse beträchtlich an Bedeutung einbüsszen.

Peché <sup>34)</sup> hat die Blausäureprobe Treubs für Prunus Laurocerasus abgeändert, und ausserdem das Merkuronitratverfahren für Lokalisationszwecke empfohlen. Auch dieser Forscher glaubt dabei labile HCN nachzuweisen.

An den Anschauungen Treubs und Peches hat Bruns-wik<sup>3)</sup> später Kritik geübt. Dieser weist die Anwesenheit lockerer oder freier Blausäure durchaus von der Hand und ist der Meinung, dasz die beim Abtöten der Zelle entstandene Blausäure von einer raschen enzymatischen Spaltung herrühre.

Bei meinen Untersuchungen hat sich ebenfalls ergeben, dasz diese letzte Annahme wenigstens zum Teil zutrifft. Wie rasch auch das Material abgetötet wird, immer kommen Blausäuremengen frei, welche nicht zu vernachlässigen sind. Und diese Mengen sind nie konstant. Zum Beleg führe ich folgenden willkürlichen Versuch an:

30 Blatthälften des gewöhnlichen Kirschlorbeers wurden in siedendem Alkohol getötet und sofort destilliert; das Destillat forderte bei der Titration  $3.20 \text{ cm}^3 \frac{1}{100} \text{ n}$ . Silber-lösung. Die korrespondierenden Hälften in ganz gleicher Weise behandelt, lieferten ein Destillat, das mit  $4.75 \text{ cm}^3$  Silberlösung übereinstimmte.

Obwohl derartige Versuche eine Anwesenheit lockerer Blausäureverbindungen nicht wahrscheinlich machen, so bleibt jedoch m.E. diese Möglichkeit, jedenfalls für die Blätter, bestehen. Man könnte ja sehr gut annehmen, die Blausäure bliebe nach ihrer Bildung gewisse Zeit vorhanden als Cyanhydrin. Der Beweis dafür wäre aber nicht in einfacher Weise zu liefern da man auf ein Abtötungs-verfahren für das Enzym aus den erwähnten Gründen verzichten musz.

Im ruhenden Samen ist die nichtglukosidische Form der Blausäureverbindungen schwieriger anzunehmen. Ich habe versucht eine Stütze für diese Behauptung durch die Analyse eines Pangiumsamens beizubringen. In Samen findet sich, wie Czapek angibt, im allgemeinen keine Glukose. Eine bisweilen aufgefundene kleine Zuckermenge wäre einer geringen Stärkedesaggregation zu verdanken. Die Samen des Pangium edule sind aber ganz stärkefrei;

sie enthalten nur Eiweisz, Fett und Blausäureglukosid. Ich war also im Stande, die im Samen enthaltene Monose als glukosidische Glukose zu betrachten.

In einem Pangiumssamen, der von seiner harten Schale befreit worden war (Gewicht des Endosperms 14.2 g), war enthalten 69.1 mg Blausäure und 489 mg Glukose. Aus der Elementarformel des Gynocardins ( $C_{18} H_{19} NO_9$ ) lässt sich berechnen, dasz für 69.1 mg Blausäure 460 mg Glukose zur Glukosidbildung erforderlich sind. Die berechneten und die aufgefundenen Mengen reduzierenden Zuckers stimmen also befriedigend.

Dieses Ergebnis ist zwar nicht endgültig beweisend, macht jedoch die Anwesenheit irgendeiner nichtglukosidischen Blausäureverbindung im Pangiumssamen unwahrscheinlich. Es ist zu erwarten, dasz die Samen anderer blausäureführenden Pflanzen sich in gleicher Weise verhalten werden.

Da bezüglich des Vorkommens lockergebundener Blausäure die Verhältnisse noch zu wenig geklärt sind, habe ich mich deshalb bei meinen Untersuchungen auf die Bestimmung der Totalblausäure beschränkt.

### III. ABSCHNITT.

#### CHEMISCHE METHODEN.

##### § 1. Wahl einer Bestimmungsmethode für die Blausäure.

Eine Bestimmungsmethode für die Totalblausäure musste aufgefunden werden, welche für alle in Frage kommenden Versuchsobjekte mit ihren verschiedenen Glukosiden und Enzymen zu verwenden war. Eine Anzahl von im Laufe der Jahre benutzten und empfohlenen Methoden stand zur Verfügung, jedoch zeigten sich diese grösstenteils als entweder unrichtig oder nicht allgemein brauchbar.

Man kann an jedem Verfahren zur Bestimmung der Blausäure im Pflanzenmaterial drei Phasen unterscheiden:

1. Die Spaltung der Blausäureglukoside.
2. Die Isolierung der Blausäure.
3. Die Bestimmung der Blausäure.

Da der erste Punkt, die vollständige Spaltung des Glukosides, die meisten Schwierigkeiten bietet, wird es klar, dasz die verschiedenen benutzten Methoden in dieser Hinsicht die meisten Variationen aufweisen.

Treub<sup>52)</sup>, Ravenna<sup>37)</sup> und viele andere lassen die grob zerkleinerten Blätter mehrere Stunden in Wasser mazerieren, bevor diese der Destillation unterzogen werden. Die Forscher haben offenbar geglaubt, dasz bei der Mazeration, auf diese Weise vorgenommen, alles Glukosid gespalten wird. Diese Annahme musz jedoch stark angezweifelt werden, denn die bei der Zerkleinerung der Blätter nicht aufgelegten Zellen werden ihr Glukosid unverändert beibehalten. Zwar wird das Enzym im Anfang der Destillation, sobald das Protoplasma abgetötet wird, hier einwirken, die Zeit jedoch, welche verläuft zwischen Abtötung des Plasmas und Abtötung des Enzyms, wird in den meisten Fällen zu kurz sein, um eine völlige Spaltung des Glukosides zu gewährleisten. Es ist klar, dasz dieses Verfahren grobe Fehler zufolge haben kann und dasz die Blausäurewerte, welche Treub erhält und sogar genau auf 0.001 v.H. (des Frischgewichtes!) angibt, beträchtlich an Bedeutung einbüßen.

Eine andere Bestimmungsweise vertritt Rosenthaler<sup>46)</sup>, der mit Kirschchlorbeerblättern arbeitet. Seine Methode, welche er für nur ein Blatt oder eine Hälfte anwendet, besteht darin, dasz das feinzerschnittene Blatt sofort in kochendem Wasser abgetötet und sodann die Spaltung des Glukosides durch Mazeration mit Emulsin herbeigeführt wird.

Die Abtötung des Blattes wird vorgenommen in einem

Becherglase. Wie es jedoch de Jong dargetan hat, tritt bei einer möglichst raschen Abtötung doch nocheinde merkliche Spaltung des Glukosides auf, sodasz die auf diese Weise entstandene Blausäure und die etwaige nicht glukosidische Blausäure der Bestimmung entgehen. Dieser Fehler wäre zu beseitigen durch Abtötung in einem Kolben und sofortige Destillation.

Auch in anderer Hinsicht ist die Methode nicht einwandfrei. Die Blausäureglukoside ertragen ein fortgesetztes Kochen mit Wasser nicht; nach Bishop<sup>1)</sup> sind sogar Verluste bis 50 v.H. möglich. Obwohl diese Verluste mir ziemlich hoch erscheinen, ist eine merkliche Spaltung des Glukosides sehr gut anzunehmen. Mir scheint, dasz die Wasserstoffionenkonzentration hierauf einen groszen Einfluss haben wird. Bei einem  $p_H$  unterhalb 6 bis 7 ist vielleicht eine Hydrolyse des Glukosides zu befürchten, wobei neben Blausäure andere stickstoffhaltige Produkte entstehen; steigt dieser oberhalb 7, so musz mit einer Verseifung des Nitrils gerechnet werden.

Es wäre interessant, nachzuforschen, in wie weit die Stabilität der Blausäureglukoside in wässriger Lösung bei Siedehitze durch ziemlich geringe Abweichungen des  $p_H$  vom neutralen Punkte beeinträchtigt wird. Die Zeit fehlte mir leider es für diese Arbeit nachzuprüfen.

Die Methode Rosenthalers ist also in vielen Hinsichten zu verwerfen und eignet sich gewiss nicht als Präzisionsverfahren, wie es doch die Bestimmung in *einer* Blatthälften sein musz.

Es sei an dieser Stelle inzwischen hervorgehoben, dasz eine Blausäurebestimmung in *einer* Blatthälften, zumal beim Kirschchlorbeer, infolge der Versuchsfehler nicht so genau sein kann, dasz schon ziemlich grosse Schwankungen im Blausäurebestand festgestellt werden können.

Zum Beleg diene folgendes:

Eine normale Blatthälften des Kirschchlorbeers wiegt im

Mittel 0.80 g; unter Voraussetzung eines HCN-Gehaltes von 0.15 v.H. bezogen auf Frischgewicht, wird mittels der Liebigschen Titration etwa 2.2 cm<sup>3</sup> Silberlösung 1/100 n. titriert werden. Wie ich später zeigen werde, ist eine Angabe der Titrierzahlen genauer als auf 0.10 cm<sup>3</sup> unzulässig. Schon infolge der Titrierfehler wird also keine gröszere Genauigkeit als 4 bis 5 v.H. gewährleistet. Wenn noch andere, den Versuchsbedingungen entsprechenden Fehler hinzukommen, wird es klar, dasz eine derartige Methode unbrauchbar ist.

Wenn deshalb Rosenthaler nie Schwankungen im Blausäurebestand des normalen Kirschlorbeerblattes findet, so ist das meiner Meinung nach die Folge seiner unempfindlichen Methode.

Der Einwand der Unempfindlichkeit ist aus denselben Gründen, wie die oben angeführten, dem von Bishop<sup>1)</sup> benutzten Verfahren<sup>45)</sup> entgegenzubringen, da dieses ebenfalls für eine Blatthälfte empfohlen wird. Wenn wir diese Tatsache auszer Betracht lassen, so erscheint seine Methode weit besser als die vorhergenannte. In einem Kolben wird das feinzerschnittene Blatt mit Wasser in 15 bis 30 Minuten durch Erwärmung im Wasserbade auf 100° gebracht. Durch diese Maßnahme kommt schon ein groszer Teil der glukosidischen Blausäure frei, welche mittels Luftpübersättigung in 30-prozentige Kalilauge geleitet wird. Nach Abkühlung und unter fortwährender Luftpübersättigung wird durch 20-stündige Mazeration mit Emulsin die Spaltung zu Ende geführt. Die wichtigsten Bedenken gegen das vorhergehende Verfahren, näml. unvollständige Extraktion (Treub c.s.) und Kochen der wässerigen Glukosidlösung (Rosenthaler) werden deshalb aufgehoben.

Da diese Methode vielleicht in Betracht käme, so habe ich sie auf ihre Genauigkeit hin untersucht. Besonders musste ein Aufenthalt der Blausäure während 20 Stunden in 30-prozentiger Kalilauge als gefährlich betrachtet werden.

Es zeigt sich tatsächlich, dasz eine Zersetzung dabei auftritt, welche nicht zu vernachlässigen ist. Diese Zersetzung ist in erster Linie der Tatsache zuzuschreiben, dasz bei der Erwärmung der Blätter im Wasserbade die unmittelbar hintergeschaltete Kalilauge von der durchgeführten Luft recht heiss wird.

Vielleicht wäre das Bishopsche Verfahren für eine gröszere Anzahl Blätter unter Vermeidung der angeführten Fehlerquellen abzuändern. Es wäre jedoch nur geeignet für Objekte, wo Emulsin wirksam ist; in den anderen Fällen müssen ja immer Enzympräparate angefertigt werden, welcher Umstand grosze Schwierigkeiten mit sich bringt. Ich habe deshalb keinen weiteren Versuch gemacht, die Bishopsche Methode auszuarbeiten, besonders weil mir ein anderes Verfahren zur Verfügung stand, das in ganz einfacher Weise vor sich geht und nicht die Fehlerquellen der vorhergehenden Methoden aufweist.

Dieses, zuerst von Verschaffelt<sup>57)</sup> beschriebene Verfahren, ist offenbar wenig bekannt. Es stützt auf die Beobachtung, dasz bei der Temperatur, wo die Zelle, abstirbt, das Plasma also durchlässig wird, das spaltende Enzym noch wirksam ist.

Das Enzym kann somit in alle Teile des Gewebes hineindringen und seine spaltende Wirkung auf das Glukosid ausüben.

Zwecks Herbeiführung einer völligen Spaltung, empfiehlt Verschaffelt für Kirschchlorbeerblätter eine Erwärmung in Wasser auf 60° während einiger Minuten. Man lässt eine Nacht mazerieren und wiederholt die Erwärmung am nächsten Tage. Die Mazeration wird fortgesetzt und schlieszlich wird destilliert. Eine Blausäurebestimmung würde deshalb zwei Tage fordern. Bei meinen Versuchen ergab es sich jedoch, dasz mit strenger Innehaltung der Versuchsbedingungen eine einmalige Erwärmung genügt.

Uebrig blieb noch, festzustellen, ob 60° für alle in Frage

kommenden Objekte die geeignete Temperatur bildet. Darüber ist in einfacher Weise zu entscheiden.

Dazu erwärmt man das Objekt, z.B. ein Blatt, dessen Schnittfläche paraffiniert worden ist, in einem Erlenmeyer-kölbchen mit etwa 50 cm<sup>3</sup> Wasser während einer Viertelstunde auf 50° im Wasserbade. Das Kölbchen wird sodann mit einer Korke verschlossen, welche versehen ist mit einem Pikrin-Soda-Papierstreifen. Dieselbe Probe wird angestellt bei 55° und 60°. Bei 50° wird das Reagenzpapier durchweg gelb bleiben, Erwärmung auf 55° zeigt oft eine leichte Rosafärbung, während 60° immer deutlich eine Rotfärbung bewirkt. Für meine Versuchsobjekte hat sich die Erwärmung auf 60° in allen Fällen als geeignet erwiesen.

Die von mir angewandte Bestimmungsmethode der Blausäure gestaltet sich nun folgendermassen:

In einem 1.5 l fassenden Rundkolben wird 300 cm<sup>3</sup> Wasser auf 62 bis 63° gebracht durch Erwärmung im Wasserbade. Man entfernt den Kolben aus dem Wasserbade und wirft alles Material zugleich hinein, verschlieszt sofort mit einem Gummistopfen, schüttelt kräftig durch und stellt in ein zweites Wasserbad, das auf 62 bis 63° gehalten wird. Die Temperatur im Kolben schwankt dadurch um 60°. Nach 3 bis 4 Minuten schüttelt man aufs neue kräftig durch und stellt den Kolben 20 bis 22 Stunden zur Seite. Diese Mazeration wird bei Zimmertemperatur vorgenommen.

Die Blausäure wird destilliert bis ungefähr 75 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit im Destillationskolben zurückbleibt. Man fängt auf in etwa 3 cm<sup>3</sup> fünfprozentiger Kaliumhydroxydlösung, welche zuvor mit wenig Wasser verdünnt worden sind, und titriert mit 1/100 n. Silbernitratlösung nach Liebig.

Bei der Titration wird zweckmässig pro 100 cm<sup>3</sup> Destillat 1 cm<sup>3</sup> einer Jodkaliumlösung 20 % zugegeben, in den meisten Fällen also 3 cm<sup>3</sup> KJ-Lösung.

Die Vorteile dieser Methode sind:

1. Das Material braucht nicht zuvor zerkleinert zu werden. Blausäureverluste sind in dieser Hinsicht deshalb ausgeschlossen.
2. Die Glukoside werden nicht dem Aufenthalt in siedendem Wasser ausgesetzt.  
Eine andere als die normale enzymatische Spaltung ist dadurch nicht zu befürchten.
3. Da die Methode kein Abtötungsverfahren ist, braucht man keine Enzympräparate herzustellen, welche grosze Mengen Material fordern und nie ganz rein zu erhalten sind. Ueberdies gehen die Präparate rasch an Wirkung zurück, sodasz man immer aufs neue vor diese Arbeit gestellt wäre.

## § 2. Diskussion der Methode.

### A. Die Mazeration.

Die vollständige Spaltung des Glukosides wäre anzuzweifeln. In glukosidhaltigen Pflanzen ist immer ein Enzymüberschuss vorhanden; aus diesem Grunde kann deshalb von einer unvollständigen Spaltung nicht die Rede sein. Czapek<sup>6)</sup> befürchtet, die Erwärmung des Materials auf 60° werde eine Schädigung des Enzyms herbeiführen. Dies ist tatsächlich der Fall, wenn man die Erwärmungsdauer stark verlängert.

Wie es der Versuch zeigt, erleidet die enzymatische Tätigkeit jedoch keinen Schaden bei Innehaltung der angegebenen Versuchsbedingungen. Wird nach 20 bis 22-stündiger Mazeration von Kirschchlorbeerblättern destilliert, und der Rückstand mit Emulsin abermals mazeriert, so erfordert das zweite Destillat bei der Titration weniger als 0.10 cm<sup>3</sup> 1/100 n. Silberlösung, ein Zeichen, dasz alles Glukosid gespalten war.

In ähnlicher Weise lässt sich für Phaseolus lunatus und Pangium edule die quantitative Spaltung nach einer zweiten

Mazeration mit aus den Blättern extrahiertem Enzym nachweisen.

Aus diesen Tatsachen geht überdies hervor, dasz die zweite Mazeration bei der ursprünglichen Methode verschaffelt überflüssig ist.

Nur bei Zweigen und Samen beobachtet man in einigen Fällen eine unvollkommene Spaltung des Glukosides, offenbar infolge des gröszeren Widerstandes, welcher dem Eindringen des Enzyms entgegengesetzt wird. Für Bestimmungen in derartigem Material ist eine zweite Mazeration beibehalten. Die HCN-Ausbeute dabei ist immerhin sehr gering und in den meisten Fällen zu vernachlässigen.

Ein zweiter wichtiger Punkt ist die Frage, in wie weit eine Zersetzung der Blausäure während der Mazeration stattfindet, z.B. infolge Enzymtätigkeit oder Umsetzung mit im Material enthaltenen organischen und anorganischen Stoffen.

Dezani<sup>7,8)</sup> gibt an, im Pflanzensaft werde die Blausäure an Glukose gebunden und sodann verseift, sodass schlieszlich Ammoniak entstehe. Es ist klar, dasz eine derartige Umwandlung die obige Mazerationsmethode völlig unbrauchbar machen würde. Ich habe mich deshalb zuvor bemüht nachzuforschen, ob und in welchem Maße diese Umwandlung stattfindet.

Zunächst ergibt sich, dasz eine Reaktion zwischen Glukose und HCN in den, den Versuchsbedingungen entsprechenden Verdünnungen nicht auftritt. Es wurde für eine auf 300 cm<sup>3</sup> verdünnte HCN-Lösung, welche unter Zugabe von 100 mg Glukose 20 Stunden in einer Stöpselflasche gestanden hatte, bzw. titriert 22.35, 22.35 und 22.30 cm<sup>3</sup> Silberlösung 1/100 n., während die direkte Titration der HCN-Lösung 22.35 und 22.35 cm<sup>3</sup> Silberlösung erfordert.

Dasz auch im Mazerationsgemisch weder Glukose noch andere Einflüsse merkliche Verluste verursachen, geht hervor aus der folgenden Probe:

50 Kirschchlorbeerblätter werden mit 250 cm<sup>3</sup> Wasser auf 60° erwärmt, und sodann 3 Stunden stehen gelassen. 100 cm<sup>3</sup> des Mazerats werden verdünnt auf 300 cm<sup>3</sup> und destilliert; Titration 10.45 cm<sup>3</sup> Silberlösung. Ein gleiches Volum des Mazerats wird verdünnt auf 275 cm<sup>3</sup>, zugegeben wird 100 mg Glukose und 25 cm<sup>3</sup> einer HCN-Lösung, die übereinstimmten mit 21.50 cm<sup>3</sup> Silberlösung. Dieses Gemisch wird 20 Stunden stehen gelassen, und sodann destilliert; Titration 31.80 cm<sup>3</sup> Silberlösung, was für die zugegebene HCN eine Menge von 21.35 cm<sup>3</sup> Silbernitrat 1/100 n. entspricht. Derartige Versuche, mehrmals angestellt, hatten denselben Erfolg.

Ueberdies lieferten die zahlreichen, von mir ausgeführten Kontrollversuchen mit Blatthälften, innerhalb des zulässigen Fehlers, immer gleiche Titrierzahlen; dieser Befund wäre nicht zu erwarten, wenn tatsächlich Zersetzung auftreten.

Schlieszlich musz noch Rücksicht genommen werden auf die Wasserstoffionenkonzentration und die Temperatur, bei welcher die enzymatische Spaltung vor sich geht. Die blausäureglukosidspaltenden Enzyme behalten innerhalb ziemlich weiter p<sub>H</sub>-Grenzen eine genügend grosze Wirksamkeit. Das Optimum liegt aber immer unterhalb p<sub>H</sub> = 7; es ist deshalb darauf zu achten, dasz die Reaktion des Mazerats nicht über den neutralen Punkt ansteigt. Dieses ist jedoch nicht zu befürchten, da die Mazerate meiner Versuchsobjekte, wie es ja mit den Pflanzensaften durchweg der Fall ist, eine schwach saure Reaktion aufweisen, und diese auch nach der Destillation beibehalten. Die saure Reaktion des Mazerates ist also nicht nur dem Blausäuregehalte zuzuschreiben.

Aus diesen Gründen sind keine besonderen Massnahmen angesichts der Wasserstoffionenkonzentration erforderlich.

Wie es sich ergeben hat, kompensiert die Mazerationsdauer eine etwaige günstigere Mazerationstemperatur. Oft

ist nach 10 Stunden die enzymatische Spaltung des Glukosides schon beendet.

*B. Die Destillation.*

Nach der Mazeration liegt die Blausäure vor als Oxynitril, im Gleichgewicht mit freier HCN, wie für die Amygdalin-spaltung dargetan worden ist. Dieses Gleichgewicht wird für Benzaldehydcyanhydrin in rein wässriger Lösung bei 75 v.H. Nitril gefunden (Wirth).<sup>61)</sup>

Bei der Destillation wird die freie Blausäure abgeführt; das Gleichgewicht, welches überdies bei höherer Temperatur günstiger für die freie Säure wird, muss wieder hergestellt werden, sodass schliesslich alle HCN abdestilliert. Dazu ist ein ziemlich weites Einkochen erforderlich; es wurde deshalb destilliert bis auf einen Rückstand von etwa 75 cm<sup>3</sup>, was reichlich genügt.

Es hat sich gezeigt, dass schwaches Ansäuren vor der Destillation zwar nichts schadet, jedoch auch keine wesentlichen Vorteile bietet. Vorversuche belehrten, dass die Blausäure aus dem, an sich schon sauer reagierenden Mazerat, quantitativ abdestilliert, sodass ein Säurezusatz nicht angewendet worden ist.

Dieses gilt für die wässrige Destillation; bei der alkoholischen sind die Verhältnisse ganz verschieden. Im Alkohol ist eine kleine Menge Aldehyd enthalten, welches die Blausäure bindet und bei der Destillation nicht wieder abspaltet. De Jong<sup>27)</sup> gibt an, dieser Uebelstand bestehe nicht, wenn man mit wenig verdünnter Kalilauge alkaliniert und darauf am Siedepunkt schwach ansäuert mit verdünnter Schwefelsäure. Die Lauge spaltet das Nitril auf und der geringe Säureüberschuss verhindert die Blausäure daran, sich aufs neue an das Aldehyd zu binden.

Tatsächlich ist eine Blausäuredestillation aus alkoholischer Lösung nicht quantitativ; die Anwendung der beschriebenen Abänderung liefert befriedigende Resultate.

Die alkoholische Destillation ist nicht wünschenswert,

da die alkoholischen Destillate sich nicht so scharf als die wässerigen titrieren lassen; sie ist jedoch oft notwendig, wenn das Mazerat stark schäumt, wie es bei eiweiszreichen Samen der Fall ist.

Die Erhitzung wurde vorgenommen auf elektrischen, im hiesigen Laboratorium angefertigten Kochplatten, und zwar so, dasz der untere Teil des Rundkolbens genau in die Erwärmungsfläche einpaszt. Diese Apparate haben sich vorzüglich bewährt; die Destillation ist schon in 25 bis 30 Minuten beendet.

### C. Die Titration.

Diese wird vorgenommen nach Liebig, mit 1/100 n. Silbernitratlösung, unter Zusatz von Jodkalium, gegen einen schwarzen Hintergrund. Auf diese Weise ist der Endpunkt der Titration, d.h. eine Trübung von AgJ, nach wenigen Uebungen sehr scharf zu bestimmen. Das von Treadwell<sup>50)</sup> empfohlene geschwärzte Kästchen zur schärferen Erkennung des Endpunktes mittels eines durchfallenden Lichtbündels, bietet keine Vorteile.

Das Destillat ist meistens ganz klar, bisweilen aber leicht trübe; lässt man es zu lange stehen, so tritt immer eine Trübung auf. Es empfiehlt sich, Destillation und Titration so schnell wie möglich durchzuführen. Zumal Destillate von Phaseolus lunatus (Samen, Blätter) werden ziemlich rasch so trübe, dasz eine genaue Titration unmöglich ist. Die Trübung lässt sich nur zum Teil durch Alkohol beseitigen.

Es wurde eine gewöhnliche, 50 cm<sup>3</sup> fassende Bürette benutzt; diese gestattet noch 0.02 cm<sup>3</sup> abzuschätzen. Die erforderliche Menge Silberlösung zur deutlichen Erkennung einer Trübung beträgt 0.08 bis 0.10 cm<sup>3</sup>; da dieser Ueberschuss sich in jeder Titrierzahl vorfindet, wird also die relative Genauigkeit nicht beeinträchtigt.

Liegt eine leicht trübe Flüssigkeit vor, so ist dieser Ueberschuss etwas gröszer, im Mittel um 0.05 cm<sup>3</sup>. Die

bläulichgelbe Silberjodid-Trübung ist sehr gut von einer andersherrührenden zu unterscheiden, vorausgesetzt dasz diese letzte schwach sei.

Mit Rücksicht auf den Ablesefehler und den „Trübungsfehler“ ist man im Stande den maximalen Titrationsfehler auf 0.10 cm<sup>3</sup> Silberlösung zu stellen. Es geht hieraus hervor, dasz die feineren Ablesungen an der öfters von anderen Forschern benutzten Mikrobürette bei dieser Titration nicht zu rechtfertigen sind.

Damit der relative Versuchsfehler gering bleibe, ist bei meinen Untersuchungen immer danach gestrebt worden, wo möglich mindestens 10 cm<sup>3</sup> Silberlösung 1/100 n. zur Titration kommen zu lassen.

Die erhaltenen Titrierzahlen sind als solche in die Tabellen eingetragen und nicht in mg Blausäure ausgedrückt worden; im letzten Falle würde man ganz kleine Blausäurewerte erhalten, welche einer guten Uebersicht unzuträglich sind.

Es ist darauf zu achten, dasz die Titrierzahlen nach Liebig erhalten sind, deshalb zeigt jede cm<sup>3</sup> Silberlösung 1/100 n. 0.54 mg Blausäure an. Die Ergebnisse sind auf 0.05 cm<sup>3</sup> abgerundet worden.

### § 3. Die Eiweiszbestimmung.

Diese wird vorgenommen im Destillationsrückstand der Blausäurebestimmung. Bedingung für diese Masnahme ist, dasz bei der vorhergehenden Behandlung keine Zersetzung der Eiweisze stattgefunden habe. Eine solche Zersetzung ist tatsächlich möglich, infolge der Anwesenheit von proteolytischen Enzymen, welche während der Mazeration die Eiweisze derart angegriffen haben können, dasz die Spaltungsprodukte nicht mehr mit den üblichen Eiweiszfällungsmitteln niedergeschlagen werden und deshalb der Bestimmung entgehen. Es hat sich gezeigt, dasz eine Proteolyse bei der Mazeration merklich auftritt, jedoch die Eiweisz-

bestimmung nur um 1 bis 2 v.H. erniedrigt. Wenn wir ins Auge fassen, dasz dieser Fehler sich sowohl in den Kontrollbestimmungen als in den eigentlichen Probebestimmungen vorfindet, so geht daraus hervor, dasz der relative Fehler wesentlich kleiner ist und unterhalb eines Prozentes liegen wird. Wie es Frl. Gouwentak<sup>19)</sup> dargetan hat, gestatten überdies die Versuchsbedingungen und die Bestimmungsweise des Eiweiszes doch nicht die feinsten Unterschiede im Eiweiszbestand zu erkennen.

Mit Rücksicht auf diese Tatsachen sind die Eiweiszstickstoffzahlen auf 0.1 mg abgerundet worden.

Zur Ermittlung des Eiweiszstickstoffes in Blättern wird der Destillationsrückstand in einen Maszzyylinder gebracht. Man merkt sich das Volum der Flüssigkeit und gieszt über in ein Becherglas. Die Blätter werden im Mörser feinst zerrieben mit wenig ausgewaschenem und geglühtem Sand. Man wäscht Rundkolben und Maszzyylinder mit destilliertem Wasser und spült mit diesem das Blattzerreibsel ins Becherglas über. Man füllt die Flüssigkeit an bis auf 200 cm<sup>3</sup> und fällt in der Hitze mit einer Stutzerschen Kupferhydroxyd-Aufschwemmung. Nach Abkühlung wird abgenutscht, und der Rückstand ausgewaschen. In diesem Rückstand wird der Eiweiszstickstoff bestimmt nach Kjeldahl, also mittels Phosphorschwefelsäure-Destruktion und Ueberführung des entstandenen Ammoniaks in titrierte Schwefelsäure. Benutzt wurde zehntelnormal Schwefelsäure und die Titration wurde vorgenommen mit Methylrot als Indikator.

Die Eiweiszbestimmung in Samen geschah folgendermassen:

Der Destillationsrückstand der Blausäurebestimmung wird quantitativ in eine Porzellanschale gebracht und auf dem Wasserbade eingedampft zur Trockne. Man zerreibt den Rückstand möglichst fein und entfettet mittels Petroläther (bei den fettreichen Mandeln). Zur Herstellung eines gut gemischten und feinen Pulvers ist die Entfettung

durchaus notwendig. Das Pulver wird getrocknet, feinst zerrieben und dann bei 103 bis 105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Man bestimmt in einem Teil des Pulvers den Eiweisz-N, indem man nach Aufkochen mit 200 cm<sup>3</sup> Wasser und Fällung mittels Kupferhydroxyd, wie oben weiter verfährt. In einem anderen Teil kann der Total-N bestimmt werden, in welchem Falle das Pulver sofort mit Phosphorschwefelsäure unter Zugabe eines Kristalls Kupfersulfat destruiert wird.

#### IV. A B S C H N I T T.

##### BEOBACHTUNGEN FRÜHERER AUTOREN ÜBER DIE PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER BLAUSÄUREVERBINDUNGEN.

Ueberblicken wir die betreffende Literatur, so erfahren wir, dasz diese sich zweckmäsig in zwei gesonderten Teilen besprechen lässt. Die Ursache für diese Masnahme ist darin enthalten, dasz die Arbeit und die Hypothese Treubs sich lediglich auf die Funktion der Blausäure in den Blättern beziehen. Wir unterscheiden dadurch einerseits eine Kategorie Untersuchungen, bei welchen zur Prüfung der Treubschen Hypothese das Blatt als Gegenstand der Forschungen verwendet wird, anderseits eine Kategorie, wo das nicht der Fall ist. Die erstgenannten Untersuchungen sind den letzteren in Anzahl und Wichtigkeit weit überlegen, weshalb ich zuerst zur Besprechung der Treubschen und der damit verwandten Arbeiten schreite.

###### § 1. Die Blausäureverbindungen im Stickstoffstoffwechsel der Blätter; die Hypothese Treubs.

Es ist Treub<sup>51-54)</sup> gewesen, der auf Grund seiner zahlreichen Arbeiten an blausäureführenden Pflanzen, der

Blausäure eine wichtige Funktion im Stickstoffstoffwechsel beimasz, denn seine Hypothese besagt:

„Die Blausäure ist das erste erkennbare Assimilationsprodukt des Stickstoffes, und vielleicht sogar die erste organische stickstoffhaltige Verbindung, welche gebildet wird.“

Diese Hypothese war die Folge seiner Beobachtungen an *Pangium edule*; die späteren Untersuchungen an *Phaseolus lunatus* veranlaszten Treub sogar zu dieser Äusserung:

„Aussi n'est-ce plus guère émettre une hypothèse, mais plutôt résumer la présente investigation en entier que de dire que l'acide cyanhydrique *est* le premier produit reconnaissable de l'assimilation de l'azote, dans les feuilles du *Phaseolus lunatus*.“

Ein guter Begriff des Gegenstandes erfordert notwendig eine eingehende Besprechung der Untersuchungen Treubs an *Pangium edule* und *Phaseolus lunatus*.

Die Untersuchungen an *Pangium edule* Reinw.<sup>51)</sup> stützen alle auf die qualitative Berliner Blauprobe. Wie ich in einem vorhergehenden Abschnitt dargetan habe, ist diese Probe für Vergleichungen des Blausäurebestandes ungeeignet, und büszen deshalb die damit erhaltenen Resultate beträchtlich an Bedeutung ein.

Treub findet im jungen Mark und in der Rinde des *Pangium* spezielle Blausäurezellen („cellules spéciales“), welche ebenfalls Eiweisz enthalten. Die Blausäurezellen im Mark verlieren beim Altern allmählich Blausäure und Eiweisz, und zwar schwindet die Blausäure früher als das Eiweisz. Diese Beobachtung betrachtet Treub als einen Beweis dafür, dasz die Blausäure nicht als Dissimulationsprodukt angesehen werden kann, sonst würde das Eiweisz früher als die Blausäure verschwinden.

Wenn je, so gilt hier der Einwand der fehlerhaften Blausäureprobe, um so mehr, weil Treub Blausäure und

Eiweisz in einer Zelle mittels Farbenreaktionen nachweisen muszte.

Ringelungsversuche bewirken eine Anreicherung der HCN oberhalb des Ringwundes. Dieser Befund veranlaszt Treub zu der Annahme, in der normalen Pflanze finde ein Transport der Blausäure statt nach denjenigen Teilen, welche plastischer N-Verbindungen bedürfen.

Im Dunkeln nimmt der Blausäurebestand ab, im Lichte weist dieser eine Zunahme auf. Werden die Pflanzen aber im CO<sub>2</sub>-freien Raum dem Lichte ausgesetzt, so verlieren sie ihre Blausäure fast ebenso schnell wie im Dunkeln. Der fördernde Einfluss ist deshalb nicht dem Lichte, sondern der Anwesenheit von Kohlenstoffassimilaten zu verdanken. Diese Assimilate betrachtet Treub als unentbehrlich für die Blausäurebildung und er zieht sogar die Schlussfolgerung, diese Bildung finde statt *auf Kosten* der Kohlenstoffassimilate.

Diese letzte Behauptung findet m.E. keine reelle Stütze in den angeführten Versuchen und ist deshalb ebenfalls keine Hypothese.

Versuche, eine Steigerung des Blausäurebestandes in abgeschnittenen Blättern hervorzurufen, indem diese auf Zuckerlösungen gestellt wurden, schlugen vollständig fehl.

Anderseits versuchte Treub den Beweis für einen direkten Einfluss der Nitrate beizubringen.

Das ist ihm jedenfalls bei Pangium nicht gelungen. Abgeschnittene Blätter, welche auf Nitratlösungen gestellt werden, vermehren ihren Blausäurebestand nicht. Dieses Ergebnis hat aber nichts Fremdes, denn es hat sich gezeigt, dasz sich in den oberirdischen Teilen des Pangium kein Nitrat vorfindet. Treub glaubt diese Verhältnisse so erklären zu müssen, dasz die Nitrate in irgendeiner Form, in welcher sie nicht als solche nachzuweisen sind, nach den Blättern befördert werden. Er vergleicht diesen Vorgang mit der Jodspeicherung gewisser Algen, in welchen sich

das Jod mit den üblichen Reagenzien nicht nachweisen lässt.

Eine derartige Erklärung erscheint gezwungen und kann ohne weiteres nicht angenommen werden. Es muss vielmehr angenommen werden, dass der minerale Stickstoff entweder als Ammonverbindungen oder schon organisch gebunden in die Blätter hineintritt und dieses wäre nicht zu Gunsten der Treubschen Hypothese zu deuten.

Während die Arbeit an *Pangium edule* in vielen Hinsichten als fehlerhaft bezeichnet werden muss, so ist den Untersuchungen Treubs an *Phaseolus lunatus*<sup>52)</sup> ein weit gröszerer Wert beizumessen. In erster Linie ist dieses ihrem quantitativen Charakter zu verdanken. Im übrigen sind die Versuche, welche sich immer auf Blätter beziehen, nahezu dieselbe als die, welche an *Pangium* angestellt worden waren.

Treub beobachtet hier ebenfalls einen fördernden Einfluss des Lichtes auf den Blausäurebestand; nach einer sonnigen Periode sind die Blätter blausäurericher als nach einer sonnenärmeren Periode. Verdunkelung von ganzen Pflanzen während mehrerer Tage bewirkt eine Abnahme; werden die Pflanzen nachher dem Lichte ausgesetzt, so fängt die Blausäure wieder an zuzunehmen, jedoch erst nach 10 bis 12 Tagen. Regelmässige Schwankungen im Tagesverlauf konnten aber nicht beobachtet werden. Es scheint also von einem Transport der Blausäure nicht die Rede zu sein.

Treub stellt weiter Versuche an zur Stützung seiner Annahme, das Licht habe nur Einfluss infolge der Produktion von Kohlenstoffassimilaten. Junge, noch im Wachstum begriffene Blätter werden im Halbdunkeln auf Zuckerlösungen gestellt, denen bisweilen 0.1 bis 0.2 v.H. Kaliumnitrat zugegeben war. Treub gibt an, in diesem schwachen Lichte sei Assimilation ausgeschlossen; für diese Behauptung werden jedoch keine Belege angeführt. Die Versuche, welche mit verschiedenen Zuckerarten

angestellt wurden, ergaben, dasz Zucker, und besonders die Glukose, im Blatt eine erhebliche Anreicherung der HCN zur Folge hat.

Noch stärker tritt dieser Einfluss zu Tage, wenn Glukose-Nitrat-Lösungen verwendet werden; dabei wurde in den Blättern ein Blausäuregehalt bis zu 0.4 v.H. (bezogen auf Frischgewicht) erreicht, während normaliter dieser Gehalt nicht über 0.3 v.H. ansteigt.

In diesen Ergebnissen erblickt Treub einen direkten Einfluss der Nitrate auf die Blausäurebildung, unter Voraussetzung der Anwesenheit von Kohlenstoffassimilaten.

In einigen Fällen jedoch wird bei den Glukose-Nitrat-Versuchen eine Abnahme der Blausäure beobachtet. Dieser Befund wird von Treub erklärt durch die Annahme, überschüssiges Nitrat dürfte die weitere Verarbeitung der HCN fordern. Die Tatsache, dasz die primordialen Blätter des Phaseolus lunatus grosze Mengen Nitrat und sehr wenig Blausäure aufweisen, wäre nach ihm demselben Einfluss zuzuschreiben.

Die angeführten Versuche und Ergebnisse bilden den wichtigsten Teil der Arbeit Treubs und es musz jedenfalls bemerkt werden, dasz viele dieser Ergebnisse zu Gunsten seiner Hypothese zu deuten sind.

In technischer Hinsicht erscheinen seine Versuche jedoch nicht einwandfrei.

Wie schon in einem vorhergehenden Abschnitt ausführlich dargetan wurde, haben die Bestimmungen der locker gebundenen Blausäure, welche immer bei Phaseolus ausgeführt wurden, keinen Wert. Jedoch auch die Bestimmung der Totalblausäure besitzt Fehlerquellen, welche die Quantitatitität der Methode in Abrede stellen (s. III. Abschnitt). Sodann betrachten wir heutzutage eine Beziehung der Resultate auf Frischgewicht als unzulässig<sup>19)</sup> und dieser Einwand trifft um so mehr zu, weil die jungen Blätter oder Blatthälften während des Versuches dauernd

wachsen. Es ist klar, dasz die unter diesen Bedingungen erzielten Ergebnisse zu irrgen Schlusfolgerungen führen können.

Wenn Treub in seiner Hypothese die Blausäure als das erste erkennbare Assimilationsprodukt des Stickstoffes betrachtet, so geht daraus sofort hervor, dasz die Blausäure eine Vorstufe zum Eiweisz sein müsse.

In einem theoretischen Anhang seiner Arbeit behauptet er dann auch an der Hand verschiedener Zitate, der Blausäure wäre als Vorstufe zum Eiweisz keine Schwierigkeiten von chemischer Seite entgegenzubringen.

Wie dem auch sei, es tut sich sofort die Frage auf: Warum findet sich nicht in jeder Pflanze Blausäure, wenn dieses Prinzip tatsächlich bei der Eiweiszbildung beteiligt ist? Obwohl seit den Untersuchungen Treubs viele Pflanzen als blausäureführend anerkannt worden sind — die 1906 von Greshoff<sup>20)</sup> veröffentlichte Liste blausäureführender Pflanzen war schon sehr ausgedehnt —, so ist doch in der groszen Mehrzahl der Pflanzen keine Blausäure nachzuweisen. Dieses war nach Treub so zu erklären, dasz die Blausäure hier sofort nach ihrer Entstehung verarbeitet werde.

Einige Forscher, wie Brunswik<sup>8)</sup>, Seiler<sup>48)</sup>, Rosenthaler<sup>46)</sup> u.a. waren der Meinung, dasz in diesem Fall in jeder Pflanze, wenn nur eine genügend grosze Menge Material verwendet wird, Spuren Blausäure nachzuweisen sein müssen. Der Nachweis gelang in vielen Fällen, aber bei weitem nicht in allen untersuchten Pflanzen. Dieses Ergebnis ist ein schwacher Punkt für die Hypothese Treubs, denn die Blausäureproben sind derart empfindlich, dasz geringe Spuren HCN zu erkennen sind. Es mag inzwischen dahin gestellt sein, ob in den Fällen, wo dieser Nachweis gelingt, bei Mazeration groszer Blattmengen, nicht eine positive Reaktion vorgetäuscht werden könnte infolge einer Spur nicht primär anwesender Blausäure.

Von den Forschern, welche sich mit den quantitativen Aenderungen der Blausäuremenge im Blatt befaszten, erwähnen wir

Van de Ven<sup>56)</sup>). Dieser beobachtet nach einer Verdunkelung von Kirschlorbeerblättern während 3 Wochen eine Blausäureabnahme von etwa 50 v.H. Seine Arbeit beschränkt sich nur auf wenige Versuche. Ausserdem ist die benutzte Bestimmungsmethode nicht einwandfrei, weil dabei die Blausäure ohne eine vorhergehende Mazeration destilliert wird.

Verschaffelt<sup>57)</sup> stellt Dunkelversuche an mit Blatt-hälften des Kirschlorbeers. Sogar nach einer Versuchsdauer von mehreren Wochen erfolgt keine Abnahme der HCN in den Blättern. Nur wenn die Blätter zu vergilben anfangen, nimmt die Blausäuremenge rasch ab. Nach diesem Autor ist eine auftretende Abnahme bei Dunkelversuchen am Kirschlorbeer lediglich dem Vergilben und Absterben der Blätter zu verdanken.

Es musz jedoch betont werden, dasz die Dunkelversuche im Winter (Dezember) an ausgewachsenen Blättern angestellt worden sind, sodasz man sich über das erwähnte Ergebnis nicht zu wundern braucht.

Frl. Zynen Wartel<sup>62)</sup> beobachtet an Blatthälften des Prunus Padus eine Zunahme der Blausäure, wenn diese auf Wasser gestellt und dem Lichte ausgesetzt werden. Leider beschränkt sich diese Beobachtung nur auf einen einzigen Versuch.

Greshoff<sup>20)</sup>, der den Blausäureuntersuchungen Treubs den ersten Anstoss gegeben hat, pflichtet Treub in bezug auf die Funktion der Blausäure im Eiweiszstoffwechsel völlig bei, ist jedoch der Meinung, dasz der Blausäure nicht in allen Pflanzen derselbe Wert beizumessen sei.

Dunstan und Henry<sup>13)</sup> treten ebenfalls den Treubschen Ansichten bei, gleichwie Ravenna und seine Mitarbeiter.

Ravenna und Peli<sup>37)</sup> stellen mit Sorghum vulgare

ähnliche Versuche an wie Treub mit Phaseolus lunatus. Diese Forscher beobachteten ebenfalls eine Steigerung des Blausäuregehaltes, wenn die Blätter auf Glukose-Nitrat-Lösungen gestellt werden und erblicken in der Blausäure die erste erkennbare organische Verbindung bei der Eiweiszsynthese des Sorghum.

Von Ravenna und Zamorani<sup>38)</sup> wurde in Sorghum-pflanzen festes Asparagin einverleibt. Nach einer Versuchsdauer von 30 bis 40 Tagen weisen diese Pflanzen, Kontrollpflanzen gegenüber, eine Verringerung des Blausäurebestandes auf. Die Forscher deuten dieses Ergebnis als eine Stütze für die Reihenfolge:

Nitrat — Blausäure — Amide — Eiweisz,  
weil ihrer Ansicht nach, infolge der Einverleibung des Asparagins, der Vorgang Nitrat — Blausäure zum Teil umgangen wird.

Die Versuchsanordnung berechtigt m.E. durchaus nicht zu derartigen Schlussfolgerungen. Wenn wir ins Auge fassen, dasz die mit Asparagin behandelten Pflanzen rascher wachsen, also ein gröszeres Frischgewicht aufweisen als die Kontrollpflanzen, dasz weiter Sorghum die Eigentümlichkeit besitzt, nach gewisser Entwicklung schnell die Blausäure zu verlieren, so geht daraus aufs deutlichste hervor, dasz der Beobachtung einer Abnahme des Blausäuregehaltes (bezogen auf Frischgewicht!) nur ein geringer Wert beizumessen ist.

Ravenna und Bosinelli<sup>41)</sup> suchen den Blausäurebestand zu beeinflussen durch Einverleibung von aromatischen Stoffen wie Benzoësäure, Salicylsäure, Diphenolen u.a., offenbar in der Absicht, ein Uebermasz des aromatischen Teils des Blausäureglukosides in der Pflanze herbeizuführen. Einige dieser Stoffe erweisen sich als giftig, andere aber nicht. Jedenfalls ist immer eine Abnahme der HCN die Folge. Glücklicherweise enthalten die Autoren sich einer Schlussfolgerung, darf man doch mit Recht

erwarten, dasz die normalen Vorgänge in der Pflanze infolge einer Einverleibung der genannten Stoffe in festem Zustande und relativ groszen Dosen ernstlich gestört werden müssen.

Peche<sup>34)</sup> studiert auf mikrochemischem Wege die Lokalisation der Blausäure in *Prunus Laurocerasus*. Er benutzt als Reagens das Merkuronitrat, welches mit der Blausäure reagiert unter Bildung winziger Quecksilberkügelchen.

Mit Hilfe dieser Probe beobachtet er, dasz im Palissaden gewebe die Blausäure nicht im Zellsaft, sondern im Plasma vorliegt und dasz die Chlorophyllkörner immer die stärkste Reaktion aufweisen.

Peche ist hinsichtlich dieses Befundes der Meinung, dasz die Blausäuresynthese an die Chlorophyllkörner gebunden sei und entwickelt weiter die Theorie, die Blausäure werde an Gerbstoff labil gebunden und wandere in dieser Form in die Zellen des Schwammparenchysms, wo sie zum Teil als Glukosid gespeichert, zum Teil zur Eiweiszsynthese benutzt werden dürfte. Er schlieszt auf einen Transport aus den Blättern nach dem Phloem der Zweige, anlässlich des Befundes, dasz nach sonnigen Tagen eine stärkere HCN-Reaktion im Phloem auftritt.

Peche betont, dasz seine Ansichten jedenfalls der experimentellen, physiologischen Untersuchung bedürfen. Er ist jedoch m.E. nicht berechtigt, die Synthese der Blausäure den Chlorophyllkörnern zuzuschreiben, lediglich infolge der Beobachtung, dasz hier die stärkste Reaktion auftritt. Uebertragung dieser Beobachtung an der toten, präparierten Zelle auf die intakte Zelle ist meiner Meinung nach nicht gestattet.

Weiter ist, wie in einem vorhergehenden Abschnitt dargetan wurde, das Vorkommen einer labilen Blausäure verbindung in den Blättern durchaus nicht bewiesen.

Couperot<sup>5)</sup> prüft viele blausäureführenden Pflanzen auf Nitraten und kommt dabei zum Ergebnis, dasz diese

keine Bedingung sind für das Auftreten der Blausäure in den Pflanzen.

Seiler<sup>48)</sup> verwendet als Versuchspflanze Prunus Laurocerasus. Er beobachtet eine tägliche Schwankung des Blausäuregehaltes; abends ist dieser Gehalt am grössten. Aus dem Befund, dasz während der Nacht eine Abnahme stattfindet, schlieszt er auf einen Transport der Blausäure durch die Nerven. Dieser Annahme wäre es ebenfalls zu verdanken, dasz keine regelmässige Beziehung zwischen Blausäure-N und Eiweisz-N in den Blättern entdeckt werden konnte.

Weiter findet Seiler, dasz im Samen ein höherer Blausäuregehalt zusammengeht mit einem niedrigen Eiweiszgehalt. Dieser Befund würde auf Beziehungen der Blausäure zur Eiweissynthese hinweisen.

Seiler kann der Hypothese Treubs keine positiven Beweise entgegenbringen.

Rosenthaler<sup>46,47)</sup> dagegen kommt zu ganz anderen Ergebnissen. Dieser Forscher hat der Treubschen Hypothese eingehend nachzuprüfen versucht.

Die Frage, ob die Blausäure ein Aufbau- oder ein Abbauprodukt ist, sucht er folgendermassen zu lösen:

Junge Sorghumpflanzen werden eingespritzt mit einer Tyrosinlösung und nach gewisser Zeit auf ihren Blausäuregehalt geprüft. Als Kontrolle dienen gleich alte Pflanzen, welche nicht eingespritzt worden sind. Rosenthaler beobachtet in den „Tyrosinpflanzen“ eine erhebliche Steigerung der Blausäuremenge und schlieszt, dasz die HCN in Sorghum ein Abbauprodukt sei und dasz Dhurrin — das bezügliche Glukosid — aus Tyrosin entstehe. Zweifelsohne ist die angeführte Probe von groszer Wichtigkeit; es empfiehlt sich aber diesen Versuch aufs neue in gröszerem Massstabe anzustellen, da die Daten, welche Rosenthaler gibt, zu wenig zahlreich sind um seine weitgreifenden Schlussfolgerungen zu rechtfertigen.

Rosenthaler verwirft die Richtigkeit der Hypothese Treubs für Sorghum und nimmt seinerseits an, dasz die Blausäureglukoside gebildet werden aus dem Uebermasz der zu jeder Zeit zur Eiweiszsynthese benötigten Aminosäuren. Die Glukoside dürften späterhin irgendwo für Synthesen benutzt werden.

Dem Einflusz der Kohlenhydrate auf die Blausäurebildung sucht er nachzuforschen im zweiten Teil seiner Arbeit<sup>47)</sup>. Als Versuchspflanze wird der Kirschlorbeer verwendet; die Versuche und Blausäurebestimmungen werden mit nur einer Blatthälfte angestellt.

Rosenthaler beobachtet, im Gegensatz zu Seiler, keine täglichen Schwankungen im Blausäurebestand. Verdunkelung von Blatthälften, welche der Pflanze belassen werden, hat sogar nach 10 bis 35 Tagen keine Abnahme zur Folge. Wenn er denselben Versuch im Lichte während 30 bis 70 Tage anstellt, so wird nur eine geringe Steigerung der Blausäuremenge gefunden. Werden die Pflanzen bei den genannten Versuchen überdies geringelt, so kommt er zu gleichen Ergebnissen; von einem Transport der Blausäure wäre also nicht die Rede.

Schlieszlich stellt Rosenthaler noch Düngungsversuche mit Sambucus nigra an, bei welchen Versuchen an den Böden verschiedene Aminosäuren zugegeben werden. Die Pflanzen sind gröszer und kräftiger und blausäurereicher als die Kontrollpflanzen. Diese Versuche zeigen meiner Meinung nach lediglich, dasz Stickstoffdüngung einen fördernden Einflusz auf den Blausäuregehalt hat, eine Tatsache, welche schon früher, z.B. von Wester<sup>60)</sup> am Kirschlorbeer, beobachtet worden ist. Die Aminosäuren werden im Boden ja von den Bakterien mineralisiert.

Wie aus den oben angeführten Versuchen hervorgeht, hat Rosenthaler von einem Einflusz des Lichtes, also ebenfalls der Kohlenhydrate, auf die Blausäurebildung nichts bemerken können und er verwirft auch aus diesem

Gründe die Hypothese Treubs. Wie ich in einem vorhergehenden Abschnitt dargetan habe, sind seine Versuchsergebnisse m.E. seiner unempfindlichen Bestimmungsmethode zu verdanken.

## § 2. Beobachtungen an austreibenden Knospen und an keimenden Samen.

Ueber das Verhalten der Blausäure beim *Austreiben der Knospen* sind wir nur sehr unvollständig berichtet.

Tuma<sup>56)</sup>, u.a. fanden, dasz beim Austreiben die Blausäuremenge in den Knospen beträchtlich ansteigt.

Verschaffelt<sup>57)</sup> beobachtet an Prunus Padus und Prunus Laurocerasus ebenfalls eine absolute Zunahme der Blausäure in den Knospen; der *Gehalt* ändert sich aber nur wenig. Er kommt weiter zum Ergebnis, dasz der Blausäuregehalt in den unterhalb der austreibenden Knospen befindlichen Stengelteilen keine merklichen Schwankungen aufweist. Die grosze Zunahme der HCN in den Knospen findet nach diesem Autor nicht statt auf Kosten des Glukosides in den Stengelteilen und von einem Transport der Blausäure ist nicht die Rede. Es sei jedoch bemerkt, dasz Verschaffelt den Blausäuregehalt in den Stengelteilen angibt in v.H. des Frischgewichtes, welche Masznahme nicht als einwandfrei betrachtet werden musz.

Rosenthaler<sup>47)</sup> konstatiert eine starke Zunahme der Blausäuremenge in den Knospen des Kirschchlorbeers; der Blausäuregehalt nimmt nach diesem Autor jedoch ab.

Er beobachtet keine wesentliche Abnahme der HCN in den vorjährigen Blättern, sodasz die Zunahme in den Knospen offenbar nicht einem Transport der Blausäure aus den Blättern zu verdanken ist. Nur in einigen Fällen wurde eine ziemlich grosze Abnahme in den Blättern gefunden, welches Ergebnis m.E. vom Absterben dieser Blätter herühren dürfte.

Bezüglich der *Keimung* liegen mehrere Angaben vor, welche aber oft mit einander im Widerspruch stehen.

Jorissen<sup>28)</sup> beobachtet bei der Keimung von *Linum usitatissimum* eine Zunahme der Blausäure von 2 mg zu 4 mg pro 25 g Samen.

Lehmann<sup>32)</sup> findet bei der Keimung von *Sorbus aucuparia* eine Abnahme, und zwar derart, dasz im Stadium, wo die Kotyledonen oberhalb des Bodens gelangen, die Blausäure völlig verschwunden ist. Er schlieszt aus diesem Befund auf eine Verarbeitung des Glukosides. Der Blausäure schreibt er eine Schutzwirkung gegen niedere Organismen zu; die Glukose soll zum Aufbau von neuen Zellen dienen.

Soave<sup>49)</sup> konstatiert, dasz in süßen Mandeln, welche im ungekeimten Zustande keine oder ausserordentlich wenig Blausäure enthalten, bei der Keimung HCN auftritt.

de Plato<sup>35)</sup> findet, dasz beim Reifungsprozess dagegen die Blausäuremenge in den süßen Mandeln abnimmt und zunimmt in der bitteren Varietät.

Frl. Zynen Wartel<sup>62)</sup> beobachtet bei der Keimung von Leinsamen eine Zunahme der Blausäure von 1.5 mg zu 24 mg pro 20 g Samen.

Guignard<sup>24)</sup> kommt bei der Dunkelkeimung von *Phaseolus lunatus* zum Ergebnis, dasz die Blausäuremenge im Keimling eine Abnahme von etwa 25 v.H. zeigt und dasz diese sich sodann während längerer Zeit wenig ändert. Bei der Keimung im Lichte wird ebenfalls diese Abnahme beobachtet; sodann setzt eine allmähliche Zunahme ein.

Ravenna und seine Mitarbeiter<sup>39, 40, 42)</sup> beobachten bei der Dunkelkeimung der Samen von *Linum usitatissimum*, *Sorghum vulgare* und *Phaseolus lunatus*, dasz die Blausäuremenge zuerst zunimmt und späterhin abnimmt. Dasselbe ist der Fall bei der Keimung im Lichte.

Zugabe von Ammonchlorid bewirkt einen höheren Blausäuregehalt.

Die Forscher sind der Meinung, dasz die HCN bei der Keimung aus Ammonverbindungen hervorgehen kann.

## V. A B S C H N I T T.

### DAS VERHALTEN DER BLAUSÄURE BEI DER KEIMUNG IM DUNKELN.

#### § 1. Einleitung und Technisches.

Die Keimung der blausäurehaltigen Samen im Dunkeln kann uns in verschiedener Hinsicht wichtige Ergebnisse liefern.

In erster Linie kann sie Aufschlusz geben über die Frage, ob die Blausäureglukoside als Reservestoffe zu bezeichnen sind, zweitens ob ein Transport der Blausäure oder des Glukosides stattfindet und drittens sind Angaben über die Herkunft der Blausäure möglich.

Als Versuchsobjekte benutzte ich die Samen von Phaseolus lunatus L.\* und bittere Mandeln.\*\*) Wie ebenfalls Guignard<sup>24)</sup> beobachtete, gehören die Samen des Phaseolus lunatus, auch Kratokbohnen genannt, offenbar verschiedenen Varietäten an; ich bekam jedenfalls ein Gemisch, zusammengesetzt aus weiszen, gelben, braunen, roten, schwarzen und in verschiedenen Farben gefleckten Bohnen, deren Grösze überdies noch ziemlich stark wechselte.

Der Blausäuregehalt wechselt ebenfalls; die weisze Varietät enthält z.B. fast gar keine Blausäure. Die rotbraune Varietät hat sich, sowohl in bezug auf Blausäuregehalt als auf Keimkraft, als geeignet erwiesen.

---

\*) Die Samen erhielt ich aus Niederl. Indien durch Vermittlung des „Koloniaal Instituut“, Amsterdam. Ich möchte nicht unterlassen, dem Direktor der Abteilung „Handelmuseum“, Herrn Prof. Dr. L. Ph. le Cosquino de Bussy, meinen Dank abzustatten für seine freundliche Mithilfe.

\*\*) Die bitteren Mandeln wurden geliefert durch Frat. Ingegnoli, Milano.

Durch eine scharfe Auswahl nach Farbe und Grösze bekam ich ein genügend homogenes Material, sei es in ziemlich kleiner Menge.

Die bitteren Mandeln an sich sind für Keimungsversuche unbrauchbar. Eine Auswahl nach Grösze und Gewicht sagt nichts aus über die bezüglichen Werte des Samenkernes. Ueberdies werden etwaige „Philippinen“ das Resultat fälschen.

Vorversuche belehrten aber, dasz die Mandeln, wenn ihre harte Samenschale entfernt worden ist, ebensogut keimen: von 20 Samenkernen keimten 14 Stück ganz normal und ohne Schaden für die Kotyledonen.

Die Mandeln wurden deshalb ihrer Schale befreit, welche Behandlung ohne Schädigung der Samenkerne am besten in einer Drehbankschraube vorgenommen wird.

Man beseitigt die „Philippinen“ und wählt sich jetzt die Samenkerne von annähernd gleicher Grösze und gleichem Gewicht, damit die mittlere Abweichung gering sei. Durch diese Maßnahme sind wir im Stande die Ergebnisse pro Samen oder pro Anzahl Samen zu berechnen, vorausgesetzt, dasz die bei jedem Versuch verwendete Anzahl genügend gross sei und dasselbe Totalgewicht habe.

Die *Bestimmungsmethode* der Blausäure gestaltet sich etwas verschieden von der in dem betreffenden Abschnitt beschriebenen. Die trockenen ungekeimten Samen werden zuvor möglichst fein zerstampft. Man ist dazu berechtigt, weil unter diesen Umständen keine Blausäure frei wird. Der Beweis dafür ist leicht zu erbringen; eine feingestampfte bittere Mandel färbt Pikrin-Sodapapier nach 24 Stunden nur schwach rosa, gibt man jedoch eine Spur Wasser zu, so wird das Papier innerhalb einer Viertelstunde tiefrot.

Die zerstampften Samen werden sodann der üblichen Methode unterzogen. Für die bitteren Mandeln ist nach der Destillation eine zweite Mazeration notwendig; die zweite Blausäureausbeute ist jedenfalls klein, weshalb, wie

es sich ergeben hat, eine solche Mazeration für die blausäure-armen Phaseolussamen überflüssig ist. Selbstverständlich werden die wasserreichen Kotyledonen der gekeimten Samen nicht zuvor zerkleinert.

### § 2. Die Versuche.

#### A. *Phaseolus lunatus L.*

6 × 100 ausgewählte Bohnen von rotbrauner Farbe und anscheinend gleicher Grösze, und mit demselben Gewicht von 37.5 g pro 100 Samen wurden in Saattöpfen zu keimen gelegt und mittels eines schwarzen Tuches vor Lichteinflüssen geschützt.

TABELLE 1 \*).

*Phaseolus lunatus L.* Keimung im Dunkeln.  
Blausäure in  $\text{cm}^3 \text{AgNO}_3$  1/100 n. pro 100 Keimlinge.

Datum 1931		Num- mer	Kotyle- donen	Rest der Pflanze	Total	Bemerkungen
17-4	Ungekeimte .	1	12.40	—	12.40	
	Samen ....	2	12.05	—	12.05	
29-4	Keimpflanzen	3	11.40	14.20	25.60	
	12—15 cm.	4	9.20	15.10	24.30	
4-5	Keimpflanzen	5	1.20	32.55	33.75	Kotyledonen verschrumpft
	± 35 cm. .	6	1.00	30.60	31.60	
8-5	Keimpflanzen	7	—	23.85	23.85	"
	± 45 cm. .	8	—	19.95	19.95	

Nach einer gewissen Entwicklung wurden von zwei Portionen die normal gekeimten Pflanzen mit unverletzten Kotyledonen der Analyse unterzogen. Als die Kotyledonen

\*) Ich möchte hier noch einmal betonen, dasz die eingetragenen  $\text{cm}^3$  Silberlösung 1/100 n. von der Liebigschen Titration herrühren. Jede  $\text{cm}^3$  Silberlösung zeigt somit 0.54 mg HCN an.

eben verschrumpft waren, wurden zwei andere Keimversuche beendet und wenige Tage später die übrigen. Die Bohnen keimten zu 60 bis 65 v.H.; die Ergebnisse sind auf 100 Samen berechnet worden (Tab. 1).

Wir beobachteten eine Zunahme der absoluten Blausäuremenge im Keimling. Die in den Kotyledonen enthaltene Menge ändert sich anfänglich nur wenig, nimmt jedoch rasch ab, sobald die Reserven erschöpft sind. Sodann tritt ebenfalls eine Abnahme der Blausäure in der Keimpflanze ein (Versuche 7 und 8).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dasz das Blausäureglukosid eine Reservestoff ist.

Die Frage, ob der Konsum des Glukosides primär infolge Kohlenhydrat- (Glukose) oder infolge Stickstoffmangels (HCN) bedingt wird, mag vorläufig dahingestellt bleiben.

#### *B. Prunus Amygdalus Stokes var. amara.*

Am 9. Mai 1931 wurden 4×25 ausgewählte bittere Mandeln (Gewicht 34.2 g pro je 25 Mandeln, und  $1.37 \pm 0.03$  g pro Mandel) im Dunkeln in geräumige Saattöpfe zu keimen gelegt. Die Keimung geschah im Freien.

Am 31. Mai kamen die jungen Keimlinge gleichzeitig oberhalb des Bodens; 9 Juni hatten die Keimpflanzen eine Höhe von ungef. 12 cm. An diesem Datum wurden zwei Portionen zur Analyse herangezogen. Gekeimt waren bzw. 18 und 19 Mandeln; die Kotyledonen waren sehr gut erhalten, zeigten nur vereinzelt kleine braune Stellen.

Am 22. Juni wurden die zwei anderen Versuche beendet. Es waren 18 und 16 Keimlinge vorhanden, jedoch wurden nur 11 und 9 Pflanzen analysiert, da jetzt bei mehreren Pflanzen die Kotyledonen sich losgelöst hatten oder zum Teil zergangen waren. Die abgeworfenen Kotyledonen enthielten noch reichliche Mengen Reservestoffe und Blausäure, sodasz von einer völligen Erschöpfung nicht die Rede war.

TABELLE 2.

*Prunus Amygdalus Stokes var. amara.* Keimung im Dunkeln.  
Blausäure in cm<sup>3</sup> AgNO<sub>3</sub> 1/100 n. pro 25 Keimlinge.

Datum 1931		Num- mer	Kotyle- donen	Rest der Pflanze	Total	Mittelwert
9-5	Ungekeimte .	1	149.7	—	149.7	153 ± 3
	Samen ....	2	156.1	—	156.1	
9-6	Keimpflanzen	3	150.9	65.8	216.7	218 ± 2
	± 12 cm. .	4	139.5	80.6	220.1	
22-6	Keimpflanzen	5	125.7	138.1	263.8	273 ± 9
	± 30 cm. .	6	133.9	148.1	282.0	

Die Blausäuremenge im Keimling zeigt eine starke Zunahme, während die in den Kotyledonen sich nur wenig geändert hat. Die Ergebnisse stimmen mit den Resultaten, welche anfänglich bei den Keimversuchen an *Phaseolus lunatus* erhalten wurden (Tab. 1, Nr. 3—4) und sind ebenfalls im völligen Einklang mit den Befunden Ravennas.

Man kann erwarten, dassz bei fortgesetzter Dunkelkeimung der bitteren Mandeln die Blausäuremenge ebenfalls abnehmen wird, näm. sobald die Reserven der Kotyledonen erschöpft sind. Dafür wäre eine grosze Menge Material erforderlich, weil beim Fortschreiten der Keimung eine immer gröszerwerdende Anzahl Keimlinge beseitigt werden musz, deren Kotyledonen geschädigt oder abgeworfen worden sind.

Es fehlte mir leider an Material und Zeit diesen wichtigen Versuch anzustellen.

Wie bereits erwähnt wurde, kommt dem Blausäureglukosid einen Wert als Reservestoff zu.

Es ist einerseits möglich, dassz die Abnahme des Glukosides (bei *Phaseolus lunatus*) die Folge einer Aufnahme der Blausäure in den N-Stoffwechsel ist, anderseits kann die

Abnahme primär von einem Kohlenhydratmangel des Keimlings bedingt sein.

Der auslösende Faktor ist zweifelsohne nicht der Stickstoffmangel, denn der Keimling ist im Stande, mit seinen schon gut gebildeten Wurzeln anorganischen Stickstoff aus dem Boden aufzunehmen. Wir sind vielmehr im Stande, die Blausäureglukoside hier vor allem als *Kohlenhydratreserven* zu betrachten. Eine solche Funktion der Blausäureglukoside hat nichts Fremdes, sind ja im Laufe der Jahre schon viele Glukoside als Kohlenhydratreservestoffe anerkannt worden (vergl. z. B. Weevers<sup>58, 59</sup>).

Die schließlich auftretende Abnahme der Blausäure ist deshalb so zu erklären, dassz erst nachdem die anderen Kohlenhydrate der Kotyledonen und des Keimlings erschöpft sind, ein Konsum des Glukosides stattfindet, wobei die Blausäure umgewandelt und vielleicht wieder in den N-Stoffwechsel aufgenommen wird.

Wie müssen wir uns jetzt die anfängliche Zunahme der Blausäure im Keimling erklären?

Zuerst kann diese von der Assimilation des mineralen Stickstoffes des Bodens stammen. Diese Annahme ist ohne weiteres recht plausibel. Ravenna<sup>42)</sup> fand jedoch bei der Keimung von Phaseolus lunatus in ausgewaschenem Sand, dasz die Blausäure in diesem Falle auch anfänglich zunimmt und späterhin abnimmt. Da hier von einer Aufnahme des anorganischen Stickstoffes aus dem Boden nicht die Rede sein kann, so musz die HCN aus stickstoffhaltigen Substanzen des Samens stammen. Die Vermutung liegt also nahe, dasz die Umwandlung des Eiweizes im keimenden Samen dabei eine Rolle spielt. Zwecks Gewinnung eines Einblickes in diesen Vorgang wurden Eiweisz- und Reststickstoff in den etiolierten Keimlingen der Versuche Nr. 5 und 6 bestimmt und mit den korrespondierenden Stickstoffmengen in ungekeimten Mandeln verglichen.

Da bei der Blausäurebestimmung eine zweite Mazeration

mit 100 mg Emulsin stattgefunden hat, sind die bezüglichen Stickstoffwerte dieses Enzyms bei den Berechnungen in Abzug gebracht worden.

TABELLE 3.  
a. Ungekeimte Mandeln.

Versuchs-nummer	1	2	Mittelwert
Eiweisz-N ..	982.0	1029.0	1005 ± 24
Rest-N .....	167.0	148.0	157 ± 12
Total-N * )..	1149.0	1177.0	1163 ± 14
Blausäure-N.	42.0	43.7	42,8 ± 0,8

b. Etiolierte Keimlinge

Versuchs-nummer	5			6			Mittelwert
	Kotyle-donen	Rest der Pflanze	Total	Kotyle-donen	Rest der Pflanze	Total	
Eiweisz-N ..	225.0	247.0	472.0	252.5	290.0	542.5	507 ± 35
Rest-N .....	89.0	509.0	598.0	100.0	515.5	615.5	607 ± 9
Total-N *)..	314.0	756.0	1070.0	352.5	805.5	1158.0	1114 ± 44
Blausäure-N.	35.2	38.8	74.0	37.5	41.5	79.0	76,5 ± 2,5

Aus der Tabelle geht hervor, dasz die Total-N-Menge nicht zugenommen hat, obwohl der Keimling Stickstoff aus dem Boden aufzunehmen im Stande war. Vielleicht hat dagegen eine Abnahme des Total-N stattgefunden; die Versuchsbedingungen berechtigen jedoch nicht mit Sicherheit darauf zu schlieszen. Es ist aber mit Rücksicht auf die obengenannten Resultaten Ravennas recht wahrscheinlich, dasz die Blausäurezunahme im keimenden Samen, wenigstens zum Teil, von *organischen Stickstoffverbindungen* herrühre.

Wo und bei welchen Prozessen findet diese Blausäurebildung statt?

\*) Blausäure-N nicht einbegriffen.

Man könnte annehmen, dasz die HCN bei der Mobilisierung der Eiweisze in den Kotyledonen gebildet und sodann in die junge Keimpflanze befördert werde. Es finde in diesem Fall also ein Transport der HCN statt. Tatsächlich lässt sich in allen Teilen des Mandelkeimlings Blausäure nachweisen, welche Beobachtung zu Gunsten eines Transportes zu deuten wäre. Dann müszte man sich aber darüber wundern, dasz die Blausäuremenge in den Kotyledonen sich während der langen Versuchsdauer verhältnismäsig wenig ändert. Mit der Auswanderung der aus dem Eiweisz entstandene Blausäure, dürfte man doch ebenfalls eine Abnahme der schon im ungekeimten Samen enthaltene HCN erwarten. Aus diesem Grunde ist ein Transport der HCN nicht wahrscheinlich.

Weit plausibeler erscheint mir die Erklärung, dasz die in den Kotyledonen entstandenen Eiweiszabbauprodukte in die junge Pflanze wandern und dasz aus diesen Produkten die Blausäurebildung an Ort und Stelle stattfinde. Die Frage, ob dabei die Blausäure bei dem weiteren Abbau der Stickstoffverbindungen oder hingegen bei der Regeneration der Eiweisze entsteht, musz offen gelassen werden.

## VI. ABSCHNITT.

### DAS VERHALTEN DER BLAUSÄURE BEIM AUSTREIBEN.

#### § 1. Einleitung und Technisches.

Das Studium des Austreibens an blausäureführenden Pflanzen ermöglicht einen Einblick in die Frage, ob ein Transport des Glukosides oder der Blausäure stattfindet bei der Entwicklung der Knospen, und ob die Blausäureglukoside als Reservestoffe zu bezeichnen sind. Dazu ist es notwendig, den Blausäuregehalt der Zweige zu kennen.

Es ist schon oft dargetan worden, dasz die Blausäuremenge in den Knospen von *Prunus Laurocerasus* (Ver-

schaffelt<sup>57)</sup>, Rosenthaler)<sup>47)</sup> und *Prunus Padus* (*Tuma*)<sup>55)</sup> beim Austreiben stark zunimmt; vom Verhalten der Blausäure im austreibenden Zweig selbst wissen wir fast nichts. Nur Verschaffelt gibt an, dasz die Zunahme in den Knospen nicht einer Abnahme der Blausäure in den unmittelbar darunter befindlichen Stengelteilen zu verdanken ist.

Als *Versuchsobjekte* benutzte ich abgeschnittene Zweige von *Prunus Padus* L., der Ahlkirsche, und von *Prunus Laurocerasus* L., var. *Schipkaensis* Späth, einer blausäurereichen Varietät des Kirschlorbeers. Die in Frage kommenden Untersuchungen fordern ein homogenes Material, also Zweige von annähernd gleicher Länge, Dicke und auch von gleichem Alter. Es hat sich näml. gezeigt, dasz ältere Zweige kleinere Mengen Blausäure enthalten als junge. Diese Bedingung war beim Kirschlorbeer, von welcher Pflanze ich über 40 Exemplare verfügen konnte, in befriedigender Weise zu erfüllen. Leider besitzt die benutzte Varietät nur kleine Zweige.

Im Jahre 1930 war es ein glücklicher Umstand, dasz im Vorjahr die Padussträucher gekappt worden waren. Eine ziemlich grosze Anzahl einjähriger Wassertriebe, welche schön gerade, von gleicher Länge und unverzweigt waren, stand mir zur Verfügung. Die Zweige trugen überdies nahezu gleich viel Knospen.

Die *Bezugsgröszen* bereiten hier einige Schwierigkeiten. Das Frischgewicht ist sowohl für die Knospen als für die Zweige unbrauchbar, da der Wassergehalt stark wechselt kann. Das Trockengewicht ist ebenfalls als Bezugsgröße zu verwerfen, da dieses in hohem Grade von dem Ernährungszustand abhängt.

Peche<sup>34)</sup> hat die Lokalisation der Blausäure in *Prunus Laurocerasus* erforscht und gezeigt, dasz die HCN vorwiegend im Bast, weiter in den Markstrahlen und nur wenig im Mark vorliegt; im Holz ist sie nicht nachzuweisen.

Dieser Befund stimmt überein mit den Angaben Treubs über die Lokalisation in *Pangium edule*.

Diese Tatsachen veranlaszten mich, als Bezugsgrösze für die Blausäure in den Zweigen das Trockengewicht des *extrahierten* Bastes zu wählen. Dieses Gewicht vertritt also gleichfalls die im Holz befindlichen Markstrahlen und das Mark. Indem aber die Blausäure grösztenteils im Bast enthalten ist, wird der Einfluss von individuellen Schwankungen in Entwicklung und Blausäuregehalt von Mark und Markstrahlen sehr gering bei den gleichjährigen Zweigen von gleicher äuszerlicher Entwicklung. Selbstverständlich dürfen Zweige verschiedenes Alters nicht mit einander verglichen werden.

Die Beziehung der Blausäure auf *extrahierten* Bast ist notwendig, einerseits, weil beim Trocknen erhebliche Blausäureverluste auftreten, anderseits, weil sonst der verschiedene Extraktgehalt vor und nach dem Austreiben die Ergebnisse fälschen würde.

Für Knospen und junge Triebe sind weder Frisch- noch Trockengewicht verwendbar. Als Bezugsgrösze wurde hier die Blausäuremenge pro Knospe, bzw. Trieb, gewählt.

Die Bestimmung der Blausäure wurde nach der beschriebenen Methode vorgenommen. Die Zweige wurden zweckmäsig zuvor in Stücke von etwa 5 cm Länge zerschnitten.

Nach Beendigung der Destillation wurde das Material mit Wasser ausgewaschen und sodann wurde mit einem scharfen Messerchen der Bast sorgfältig abgeschabt. Dieser wird mit dem Destillationsrückstand unter Zugabe von Emulsin und der erforderlichen Wassermenge, aufs neue mazeriert. Wie bereits erwähnt, ist diese zweite Mazeration in weitaus den meisten Fällen überflüssig, doch ist sie vorsichtshalber immer durchgeführt worden.

Nach der zweiten Destillation wurde der Bast dreimal in je einem Liter Wasser aufgewirbelt, abgegossen durch

Koliertuch, sodann angesammelt in ein Wägegläschen, getrocknet auf 103 bis 105° und gewogen.

### § 2. Die Versuche.

#### A. *Prunus Padus L.*

Ende März 1930 stellte ich Versuche an mit abgeschnittenen Zweigen von *Prunus Padus*, welche ich im Dunkeln austreiben liesz während 13 Tage. Es ergab sich dabei, dasz die Blausäuremenge sowohl in den etiolierten Trieben als in den Zweigen zunahm. Später, Ende April 1930, wurden unter denselben Bedingungen Zweige des Kirschlorbeers austreiben gelassen. Dieser Versuch, welcher 24 Tage dauerte, zeigte jedoch in unzweideutiger Weise, dasz die etiolierten Kirschlorbeerzweige, und ebenfalls dessen etiolierten Triebe, in ihrem Blausäurebestand zurückgehen.

Ich vermutete jetzt, dasz diese ganz verschiedenen Ergebnisse der verschiedenen Versuchsdauer zu verdanken wären, und zwar in dieser Weise, dasz im Anfang des Etiolments die Blausäuremenge zunimmt und dasz späterhin, wenn die anderen Reservestoffe erschöpft sind, die Blausäuremenge wieder abnimmt, entweder infolge Stickstoff- oder infolge Kohlenhydratmangels.

Es wurden deshalb im Jahre 1931 diese Versuche wiederholt.

Eine gröszere Anzahl Zweige liesz ich im Dunkeln austreiben und entnahm diesen zeitweilig einige zur Analyse. Man bekommt auf diese Weise einen Einblick in die Schwankungen des Blausäuregehaltes während der ganzen Versuchsdauer.

Da die in den Jahren 1930 und 1931 angestellten Versuche zu denselben Ergebnissen geführt haben, werden hier nur die Etiolierungsversuche des letzten Jahres erwähnt.

#### a. Austreiben im Dunkeln.

30 März 1931 wurde eine Anzahl Zweige von annähernd

gleicher Grösze und von gleichem Alter abgeschnitten. Ein Teil diente zur Ermittlung des Anfangswertes, ein anderer Teil wurde in Wasser gestellt und im Dunkelzimmer austreiben gelassen; eine dritte Portion wurde ins Licht gestellt (s. unten).

Damit die Objekte frisch bleiben, ist je nach einigen Tagen ein kleines Stückchen des unteren Endes abzuschneiden.

Die Zweige treiben bei Zimmertemperatur rasch aus; nach gewisser Zeit bleiben die unteren Knospen in Entwicklung zurück, während die am apikalen Ende eine Länge von 20 cm und mehr erreichen. Am Ende des Versuchs standen die etiolierten Triebe noch aufrecht und zeigten keine Absterbungs- oder Austrocknungserscheinungen. Nur einige der unteren Knospen waren abgestorben. Bei der Berechnung der Blausäuremenge pro Knospe ist deshalb nur die Anzahl der jeweils anwesenden Schößlinge in Betracht genommen.

Aus der Tabelle (4) geht aufs deutlichste hervor, dass die Blausäuremenge in den jungen Schößlingen zunimmt, und dass letztere ihre HCN bei fortgesetzter Etiolierung dauernd beibehalten. Die Zweige zeigen ebenfalls eine Zunahme, jedoch weniger stark ausgeprägt; jedenfalls ist auch hier am Ende des Versuchs nicht von einer Abnahme die Rede. Die Blausäurewerte stimmen nicht so genau als man vielleicht wünsche; die Differenzen sind zweifelsohne grösstenteils die Folge individueller Schwankungen. Diese Bemerkung gilt ebenfalls für die nachstehenden Blausäurezahlen der Zweige.

#### *b. Austreiben im Lichte.*

Wie oben erwähnt, wurde der dritte Teil der Paduszweige in Wasser gestellt und dem Lichte ausgesetzt bei Zimmertemperatur. Daneben ist das Verhalten der Blausäure beim Austreiben *an der Pflanze* in Betracht genommen.

TABELLE 4.\*)  
*Prunus Padus L.* Austreiben im Dunkeln.  
 Abgeschnittene Zweige mit je 15 Knospen.  
 Blausäure in  $\text{cm}^3 \text{AgNO}_3$  1/100 n.

Datum 1931		Num- mer	Knospen HCN pro Knospe	Zweige HCN pro g extrah. Bast
30-3	Vor dem Austreiben ....	70	0.07	15.3
		71		15.0
		72	0.08	16.4
		73		14.9
		74	0.08	14.4
		75		15.1
		76		14.4
	Mittelwert .....		0.08 ± 0	15.1 ± 0.25
9-4	Etioliert ausgetrieben ....	83	0.22	17.8
	Knospen 10—12 cm ....	84	0.38	17.1
		85	0.19	18.8
		86	0.24	17.3
		87	—	18.0
	Mittelwert .....		0.26 ± 0.04	17.8 ± 0.3**)
17-4	Etioliert ausgetrieben ....	92	0.32	18.0
	Schöszlinge bis 20 cm...	93	0.32	18.4
		94	0.18	17.2
		95	0.30	17.9
		96	0.22	18.5
	Mittelwert .....		0.27 ± 0.03	18.0 ± 0.2
24-4	Etioliert ausgetrieben ....	110	0.33	17.3
	Schöszlinge bis 35 cm...	111	0.32	18.4
		112	0.21	18.6
		113	0.35	18.3
		114	0.41	17.8
	Mittelwert .....		0.32 ± 0.03	18.1 ± 0.2

\* ) \*\*) Siehe die Fusznoten S. 348.

TABELLE 5.\*)  
*Prunus Padus L. Austreiben im Lichte.*  
*Abgeschnittene Zweige mit je 15 Knospen.*  
*Blausäure in cm<sup>3</sup> AgNO<sub>3</sub> 1/100 n.*

Datum 1931		Num- mer	Knospen HCN pro Knospe	Zweige HCN pro g extrah. Bast
30-3	Vor dem Austreiben Mittelwert....	70-76	0.08 ± 0	15.1 ± 0.25
7-4	Knospen austreibend ....	77 78 79 80 81 82	0.25 0.45 0.26 0.25 0.24 0.22	17.1 16.5 17.8 18.0 16.9 17.3
	Mittelwert .....		0.28 ± 0.035	17.3 ± 0.2**)
20-4	Mit grünen Blättern ....	97 98 99 100 101 102	0.49 0.57 0.39 0.34 0.41 0.27	18.9 16.7 19.2 18.1 17.0 17.9
	Mittelwert .....		0.41 ± 0.045	18.1 ± 0.4

Der Natur nach gelten die Anfangswerte (Kontrolle) des vorigen Versuches (Tabelle 4) hier ebenfalls; diese sind deshalb aufs neue eingetragen worden (Tabelle 5 und 6).

\* ) Die bei den Mittelwerten vermerkte mittlere Abweichung wurde immer berechnet nach der Formel:  $m = \pm \sqrt{\frac{\sum v^2}{n(n-1)}}$

\*\*) Extraktion des extrahierten Bastes im Autoklaven bei 4 Atm. zeigte, dass die Zunahme in den Zweigen nicht die Folge ist einer, im Laufe des Versuchs aufgetretene Abnahme von denjenigen Substanzen, welche nicht bei der üblichen Extraktion gelöst werden.

TABELLE 6.

*Prunus Padus L.* Austreiben im Lichte an der Pflanze.  
Blausäure in  $\text{cm}^3 \text{AgNO}_3$  1/100 n.

Datum 1931		Num- mer	Knospen HCN pro Knospe	Zweige HCN pro g extrah. Bast
30-3	Vor dem Austreiben Mittelwert ...	70-76	0.08 ± 0	15.1 ± 0.25
12-4	Im Austreiben begriffen	88 89 90 91	0.18 0.17 0.19 0.21	18.4 17.6 17.6 17.9
	Mittelwert .....		0.19 ± 0.01	17.9 ± 0.2
22-4	Blätter in der Entfaltung begriffen .....	103 104 105 106 107 108	0.40 0.40 0.43 0.47 0.39 0.50	17.0 18.2 17.8 16.8 17.5 18.1
	Mittelwert .....		0.43 ± 0.015	17.6 ± 0.25

Wir beobachten hier beim Fortschreiten des Austreibens am Lichte immer Steigerung der absoluten Blausäuremenge in den Knospen; und diese erreicht Werte, welche nur wenig gröszer sind als die, welche in etiolierten Schösslingen gefunden wurden. Die Zweige zeigen ebenfalls alle eine Blausäurezunahme.

Die Resultate der Versuche an den abgeschnittenen Zweigen weisen keinen wesentlichen Unterschied auf mit denen, welche erhalten wurden bei den Versuchen, wo die Knospen an der Pflanze ausgetrieben sind.

B. *Prunus Laurocerasus L.*, var. *Schipkaensis* Späth.  
Die Varietät *Schipkaensis* des Kirschlorbeers besitzt nur

TABELLE 7.

*Prunus Laurocerasus L. var. Schipkaensis.* Austreiben im Dunkeln von abgeschnittenen, entblätterten Zweigen mit je 15 Knospen. Blausäure in cm<sup>3</sup> AgNO<sub>3</sub> 1/100 n.

Datum 1931		Num- mer	Knospen HCN pro Knospe	Zweige HCN pro g extrah. Bast
15-4	Vor dem Austreiben ....	115	0.08	8.9
		116		9.1
		117		9.3
		118		7.9
		119		7.6
		120		8.7
		121	0.10	9.1
	Mittelwert .....		0.09 ± 0.005	8.7 ± 0.3
28-4	Etioliert ausgetrieben....	122	0.13	—
		123		—
		124		8.2
		125	0.15	9.3
		126		9.2
		127		8.4
	Mittelwert .....		0.14 ± 0.005	8.8 ± 0.3
4-5	Etioliert ausgetrieben ....	128	0.08	8.3
		129		7.7
		130		8.3
		131	0.09	7.6
		132		7.9
	Mittelwert .....		0.09 ± 0.005	8.0 ± 0.15
11-5	Etioliert ausgetrieben ....	133	0.01	4.7
		134		5.8
		135		5.4
		136	0.02	6.5
		137		5.8
	Mittelwert .....		0.02 ± 0	5.6 ± 0.3

kleine Zweige, weshalb die Einzelversuche mit je zwei dieser Zweige angestellt worden sind.

#### a. Austreiben im Dunkeln.

April 1931 wurde eine Anzahl annähernd gleiche Zweige abgeschnitten. Wie bei den Versuchen an *P. Padus*, wurde in einigen Zweigen der Anfangswert der Blausäure bestimmt; die übrigen liesz ich zum Teil im Dunkelzimmer, zum Teil im Lichte austreiben. Die vorjährigen Blätter wurden zuvor entfernt. (Tab. 7).

Die Zweige treiben langsam aus und die jungen Schösslinge erreichen keine gröszere Länge als 7 bis 8 cm. Zur Vergleichung mit *P. Padus* ist hier ebenfalls eine lange Versuchsdauer gewählt, welche sehr gut von den Objekten ertragen wird.

Die Blausäuremenge pro Knospe steigt zuerst an und nimmt sodann stark ab, so, dasz am Ende des Versuches fast keine Blausäure mehr anwesend ist. Die Zweige zeigen ein ähnliches Verhalten, nur wird anfänglich keine Zunahme beobachtet.

Im Jahre 1930 hatte ich schon denselben Versuch angestellt mit Zweigen, denen die vorjährigen, noch ganz grünen Blätter belassen worden waren. Die Anwesenheit dieser an Blausäureglukosid reichen Blätter beeinflusse nämli. vielleicht das Verhalten der Blausäure in Zweig und Knospen. (Tab. 8).

Die vorjährigen Blätter waren am Ende des Versuchs nur zum Teil vergilbt und abgefallen.

Von einem Einflusz dieser Blätter bemerkt man jedoch wenig. Die Knospen enthalten schlieszlich nur Spuren Blausäure und in den Zweigen hat eine Abnahme stattgefunden, welche von derselben Gröszenordnung ist als beim vorhergehenden Versuch. Nur in einigen Fällen ist die Abnahme ziemlich wenig ausgeprägt.

TABELLE 8.

*Prunus Laurocerasus L. var. Schipkaensis. Austreiben im Dunkeln von abgeschnittenen, beblätterten Zweigen mit je 15 Knospen. Blausäure in cm<sup>3</sup> AgNO<sub>3</sub> 1/100 n.*

Datum 1930		Num- mer	Knospen HCN pro Knospe	Zweige HCN pro g extrah. Bast
29-4	Vor dem Austreiben ....	45	{ 0.08	8.3
		46	{ 0.08	8.3
		47	{ 0.08	7.9
		48	{ 0.12	9.8
		49	{ 0.11	7.8
		51	{ 0.11	8.2
		52	{ 0.11	8.7
		Mittelwert .....	0.10 ± 0.01	8.4 ± 0.25
23-5	Etioliert ausgetrieben ....	61	{ 0.06	7.0
		62	{ 0.02	7.2
		63	{ 0.02	6.9
		64	{ 0.02	6.9
		65	{ 0.04	6.6
		66	{ 0.04	8.1
		67	{ 0.04	6.3
		68	{ 0.04	5.9
		Mittelwert .....	0.04 ± 0.01	6.9 ± 0.2

### b. Austreiben im Lichte.

Neben Versuchen an abgeschnittenen Zweigen, (Tab. 9) wurden hier, wie bei *Prunus Padus*, Versuche angestellt, wo die Knospen an der Pflanze austreiben gelassen wurden.

Bei den abgeschnittenen, entblätterten Zweigen wird eine starke Blausäurezunahme in den austreibenden Knospen beobachtet; in den Zweigen selbst bleibt die Menge der HCN fast konstant.

Die Knospen, welche an der Pflanze austreiben, zeigen

TABELLE 9.

*Prunus Laurocerasus L. var. Schipkaensis.* Austreiben im  
Lichte von abgeschnittenen, entblätterten Zweigen mit je  
15 Knospen. Blausäure in  $\text{cm}^3 \text{AgNO}_3$  1/100 n.

Datum 1931		Num- mer	Knospen HCN pro Knospe	Zweige HCN pro g extrah. Bast
15-4	Vor dem Austreiben .... Mittelwert .....	115 — 121	0.09 ± 0.005	8.7 ± 0.3
30-4	Im Austreiben begriffen .	138 139 140 141 142 143	— 0.22 0.22	8.4 9.3 7.9 8.5 8.7 9.0
	Mittelwert .....		0.22 ± 0	8.6 ± 0.2

TABELLE 10.

*Prunus Laurocerasus L. var. Schipkaensis.* Austreiben im  
Lichte von entblätterten Zweigen mit je 15 Knospen an  
der Pflanze. Blausäure in  $\text{cm}^3 \text{AgNO}_3$  1/100 n.

Datum 1931		Num- mer	Knospen HCN pro Knospe	Zweige HCN pro g extrah. Bast
15-4	Vor dem Austreiben .... Mittelwert .....	115 — 121	0.09 ± 0.005	8.7 ± 0.3
8-5	Blättchen in der Entfal- tung begriffen .....	150 151 152 153 154 155	0.50 0.46 0.69	8.6 9.5 9.0 7.8 9.1 8.9
	Mittelwert .....		0.55 ± 0.07	8.8 ± 0.25

TABELLE 11.

*Prunus Laurocerasus L. var. Schipkaensis.* Austreiben im Lichte von beblätterten Zweigen mit je 15 Knospen an der Pflanze. Blausäure in cm<sup>3</sup> AgNO<sub>3</sub> 1/100 n.

Datum 1931		Num- mer	Knospen HCN pro Knospe	Zweige HCN pro g extrah. Bast
29-4	Vor dem Austreiben .... Mittelwert .....	45 — 52	0.10 ± 0.01	8.4 ± 0.25
14-5	Blättchen in der Entfal- tung begriffen .....	53 54 55 56 57 58 60	0.54 0.38 0.74 0.76 0.62 0.56	8.0 8.9 9.2 10.3 8.7 10.9 11.3
	Mittelwert .....		0.60 ± 0.06	9.6 ± 0.5

immer eine Zunahme der Blausäuremenge, welche gröszere Werte erreicht als beim Austreiben der abgeschnittenen Zweige der Fall ist. Die Blausäuremenge der Zweige steigt ebenfalls etwas an, im Gegensatz zu dem Verhalten der abgeschnittenen Zweige. Wie aus den Tab. 10 und 11 hervorgeht, hat auch hier die Anwesenheit der vorjährigen Blätter keinen merklichen Einfluss auf den Blausäuregehalt der Knospen.

### § 3. Zusammenfassung der Austreibungsversuche.

Zur Gewinnung eines bequemeren Ueberblickes sind die Mittelwerte der vorhergehenden Tabellen in den Tab. 12 bis 14 zusammengefaszt worden.

Aus den Versuchen geht hervor, dasz beim Austreiben der Knospen die Blausäuremenge immer ansteigt, sowohl im Lichte als im Dunkeln, und sowohl bei abgeschnittenen

Zweigen als an der Pflanze. Diese Beobachtung gilt für beide Versuchsobjekte.

Mit Ausnahme der abgeschnittenen Kirschlorbeerzweige, wird in den Zweigen gleichfalls eine Steigerung des Blausäurebestandes beobachtet.

TABELLE 12.

*Prunus Padus L.* Verhalten der Blausäure beim Austreiben.  
Mittelwerte. Blausäure in  $\text{cm}^3 \text{AgNO}_3 1/100 \text{ n}$ .

Datum		Nummer	Knospen HCN pro Knospe	Zweige HCN pro g extrah. Bast
30-3	Vor dem Austreiben..	70-76	0.08 ± 0	15.1 ± 0.25
9-4	Etiolation 10 Tage ..	83-87	0.26 ± 0.04	17.8 ± 0.3
17-4	18 ..	92-96	0.27 ± 0.03	18.0 ± 0.2
24-4	25 ..	110-114	0.32 ± 0.03	18.1 ± 0.2
	Austreiben im Lichte			
7-4	8 Tage .....	77-82	0.28 ± 0.035	17.3 ± 0.2
20-4	21 .. ....	97-102	0.41 ± 0.045	18.0 ± 0.4
12-4	Austreiben im Lichte	88-91	0.19 ± 0.01	17.9 ± 0.2
22-4	an der Pflanze ....	103-108	0.43 ± 0.015	17.6 ± 0.25

Ein Transport der Blausäure aus den Zweigen nach den Knospen und den jungen Schößlingen wird also nicht wahrscheinlich. Eine Stütze für diese Anschauung ist, dass bei den Versuchen an beblätterten Kirschlorbeerzweigen nicht der geringste Einfluss von den vorjährigen Blättern zu bemerken ist, obwohl während des Versuches viele dieser Blätter abfallen, welche sodann keine Blausäure mehr enthalten. Ein Transport der Blausäure aus diesen Blättern nach den jungen Knospen hat deshalb nicht stattgefunden.

Die Totalmenge der Blausäure im gesamten austreibenden

TABELLE 13.

*Prunus Laurocerasus L. var. Schipkaensis.* Verhalten der Blausäure beim Austreiben von entblätterten Zweigen.  
Mittelwerte. Blausäure in  $\text{cm}^3 \text{AgNO}_3$  1/100 n.

Datum 1931		Nummer	Knospen HCN pro Knospe	Zweige HCN pro g extrah. Bast
15-4	Vor dem Austreiben..	115 — 121	0.09 ± 0.05	8.7 ± 0.3
	Etiolation 13 Tage ..	122-127	0.14 ± 0.005	8.8 ± 0.3
	4-5 19 ..	128-132	0.09 ± 0.005	8.0 ± 0.15
11-5	26 ..	133-137	0.02 ± 0	5.6 ± 0.3
	Austreiben im Lichte	138 — 143	0.22 ± 0	8.6 ± 0.2
	Austreiben im Lichte an der Pflanze ....	150 — 155	0.55 ± 0.07	8.8 ± 0.25

TABELLE 14.

*Prunus Laurocerasus L. var. Schipkaensis.* Verhalten der Blausäure beim Austreiben von beblätterten Zweigen.  
Mittelwerte. Blausäure in  $\text{cm}^3 \text{AgNO}_3$  1/100 n.

Datum 1930		Num- mer	Knospen HCN pro Knospe	Zweige HCN pro g extrah. Bast
29-4	Vor dem Austreiben.....	45-52	0.10 ± 0.01	8.4 ± 0.25
23-5	Etiolation 24 Tage .....	61-68	0.04 ± 0.01	6.9 ± 0.2
14-5	Austreiben im Lichte an der Pflanze .....	53-60	0.60 ± 0.06	9.6 ± 0.5

Zweig hat zugenommen; es ist somit Blausäure neu gebildet worden. Die Frage, aus welchen Substanzen diese HCN hervorgeht, ist jedoch nicht mit diesen Versuchen zu lösen.

Wichtiger aber ist die Beobachtung, dasz am Ende der Etiolierungsversuche am Kirschlorbeer, die Blausäuremenge abnimmt.

Ist jetzt diese Abnahme dadurch bedingt, dasz die Blausäure, nach Treub eine allgemeine Vorstufe des Eiweiszes, weiter in den Eiweiszstoffwechsel bezogen wird? Man hätte dann aber schon eine Abnahme der Blausäure beobachten müssen, sobald die Blausäurezunahme in den Knospen und in den Zweigen aufhört. Und das ist nicht der Fall; es dauert ziemlich lange, wenigstens 20 Tage, bevor die Abnahme einsetzt.

Es ist nicht unmöglich, dasz, nachdem die anderen Stickstoffreserven erschöpft sind, der Blausäureschwund vom Stickstoffmangel bedingt wird; mit Rücksicht auf den Vorhergehenden, sind wir jedoch zur Schlusfolgerung berechtigt, dasz die HCN hier nicht als wichtiges Zwischenprodukt des N-Stoffwechsels betrachtet werden kann.

Sodann ist man im Stande, die Abnahme der Blausäure einem Konsum des Glukosides als Kohlenhydratreserve zuzuschreiben, und zwar in dieser Weise, dasz das Glukosid erst schwindet, nachdem die anderen Kohlenhydrate verbraucht worden sind. Welche der beiden Funktionen als Reservestoff, die dem Blausäureglukosid zukommen können, bei den Versuchen vorherrscht, ist schwer zu sagen.

Dasz die Blausäureabnahme nicht bei *Prunus Padus* beobachtet wird, mag wohl daher röhren, dasz die längeren und dickeren Paduszweige (Gewicht  $\pm 25$  g) weit gröszere Mengen Kohlenhydrate, und wahrscheinlich auch Stickstoffreserven, enthalten als die ziemlich kleinen und dünnen Kirschlorbeerzweige (Gewicht  $\pm 8$  g), während die Anzahl der Knospen für beide Objekte gleich ist, sodasz am Ende

des Versuchs die Reserven hier noch nicht völlig erschöpft sein dürften.

Es geht aus unseren Ergebnissen hervor, dasz die Angabe Verschaffelts, dass die Blausäuremenge in den austreibenden Zweigen keine Schwankungen aufweise, nicht zutrifft.

Wir treten aber Rosenthaler in seiner Anschauung bei, dasz die Blausäure in den jungen Knospen nicht von den vorjährigen Blättern herrühre.

Die Ergebnisse der Austreibungsversuche lassen sich jetzt folgendermassen zusammenfassen:

1. Die Blausäuremenge nimmt beim Austreiben zu in den Knospen und in geringem Massstabe gleichfalls in den Zweigen. Diese Zunahme ist unabhängig vom Lichte.
- 2: Nach einem längeren Etiolament von abgeschnittenen Kirschchlorbeerzweigen setzt eine Blausäureabnahme in den Knospen und in den Zweigen ein. Die Abnahme wird offenbar von einem Konsum des Glukosides als Reservestoff bedingt.
3. Ein Transport der Blausäure aus den Zweigen oder aus den vorjährigen Blättern des Kirschchlorbeers nach den austreibenden Knospen ist sehr unwahrscheinlich.

## VII. ABSCHNITT.

### DAS VERHALTEN DER BLAUSÄURE IN DEN BLÄTTERN.

#### § 1. Technisches.

##### *Die Versuchspflanzen.*

Als Versuchspflanzen wurden benutzt:

*Prunus Laurocerasus* L., var. *Schipkaensis* Späth.

*Phaseolus lunatus* L.

*Pangium edule* Reinw.

Von der ersten Versuchspflanze standen mir, wie erwähnt, 40 Sträucher, welche unter den Namen *var. Schipkaensis* Späth geliefert worden waren, zur Verfügung. Die Sträucher

tragen kleinere Zweige und Blätter als der gewöhnliche Kirschchlorbeer; die Blätter erreichen eine Länge von 10 bis 13 cm und eine Breite von 4 bis 5 cm. Die Blätter sind im allgemeinen schön symmetrisch und sehr geeignet für Blattversuche. Obwohl der Blausäuregehalt mit dem Alter der Blätter wechselt, ist dieser für ausgewachsene Blätter auf 0.22 v.H. anzugeben, während der gewöhnliche Kirschchlorbeer im Mittel einen Blausäuregehalt von 0.15 v.H. aufweist.

Die Pflanzen des *Phaseolus lunatus* wurden aus den Samen erhalten. Die ausgewählten, rotbraunen Samen (dieselbe Varietät, welche für die Keimungsversuche verwendet worden ist) wurden im Mai in Saattöpfen zu keimen gelegt. Die jungen Keimlinge wurden je in einen groszen Topf über gepflanzt, und im unerwärmten Gewächshaus weiter gezüchtet, sodasz ich im Juli über eine ziemlich grosse Anzahl Pflanzen verfügen konnte. Die gefiederten Blätter, mit je drei Blättchen, sind in ausgewachsenem Zustand ziemlich gross; die Fiederblättchen einer kräftigen Pflanze erreichen eine Länge von 10 bis 12 cm und eine Maximalbreite von 7 bis 8 cm. Die Pflanzen blühten zum Teil und lieferten keimkräftige Samen.

Es hat grosse Schwierigkeiten gegeben, Pflanzen von *Pangium edule* zu erhalten.

Eine Sendung Pangiumsamen \*), aus 135 Stück bestehend, erwies sich bei Ankunft grösztenteils als verfault und von den übrigen Samen keimte kein einziger. Eine zweite Partie war als Früchte versandt worden, zum Teil in Kokosfasern, zum Teil in Holzkohle. Die Früchte waren bei Ankunft völlig zergangen, aus den Gruppierungen der Samen war jedoch noch ersichtlich, dasz die Früchte vielfach mehr

---

\*) Die Pangiumsamen erhielt ich ebenfalls durch Vermittlung der Abteilung „Handelmuseum“ des „Koloniaal Instituut“ Amsterdam, Direktor dieser Abteilung Prof. Dr. L. Ph. le Cosquino de Bussy.

als 10 Samen enthalten. Von diesen Samen, welche eine sehr harte Schale besitzen und von 15 bis 40 g wiegen, war gleichfalls ein groszer Teil schon in der Fäulnis begriffen. Von den 285 Samen dieser Sendung keimten im Tropenhause nach 7 Wochen 14 Stück. Nach wenigen Tagen wirft die junge Pflanze den Ueberrest des Samens ab, obwohl dieser letzte noch reichlich Reservestoffe und Blausäureverbindungen enthält. Von den Keimpflanzen gingen nach und nach noch einige zugrunde, sodasz schlieszlich 9 Pflanzen übrig waren.

Die jungen Pangiumpflanzen trugen bald einige groszen drei- oder fünflappigen Blätter, welche eine Grösze von 20 cm und mehr erreichten. Die Blätter vergilbten leider rasch und fielen ab, sodasz an einer einjährigen Pflanze nie mehr als 5 Blätter saszen. Treub gibt an, dasz seine einjährigen Pangiumpflanzen bis 15 Blätter trugen. Zweifelsohne spielen die klimatologischen Verhältnisse hier eine Rolle, denn im Winter wachsen hier die jungen Pflanzen im schwachen Sonnenlichte nur kümmерlich, während in den Tropen das Wachstum regelmäszig fortschreitet.

Wenn ich jetzt noch bemerke, dasz für die Versuche nur junge Blätter in Betracht kommen und man jede Pflanze nicht all ihrer jungen Blätter berauben darf, so wird es klar, dasz ich den Versuchen an *Pangium edule* nicht die Ausdehnung habe geben können, welche diese verdienten, und wie ich sie mir gewünscht hätte.

#### *Bezugsgröszen.*

Die Blattversuche am Kirschlorbeer und an *Pangium edule* wurden angestellt nach der Blatthälftenmethode, bei den Versuchen an *Phaseolus lunatus* dagegen wurden die beiden Fiederblättchen eines Blattes verglichen. Wie es Fr. Gouwentak<sup>19)</sup> gezeigt hat, ist für Blattversuche die Beziehung auf Frischgewicht oder Trockengewicht zu verwerfen und ist die Oberfläche der Blätter die beste Bezugsgrösze. Für Einzelheiten verweise ich nach der genannten Arbeit.

Bei meinen Untersuchungen war eine Bezugnahme auf die Oberfläche jedoch nicht verwendbar, da fast ausschliesslich mit jungen, noch im Wachstum begriffenen Blättern gearbeitet wurde und die Probehälften oder Probeblättchen während der Versuchsdauer infolge fortgesetztes Wachstums beträchtlich an Grösze zunahmen. Diese Oberflächenzunahme betrug z.B. für Phaseolusblätter 10 bis über 20 v.H. des Anfangswertes.

Die Vergleichung von Blatthälften ohne Oberflächenbestimmung, stellt eine fast vollständige Symmetrie des Blattes voraus. Und dann musz noch darauf geachtet werden, dasz eine nicht zu kleine Anzahl Blätter verwendet wird. Die Blätter des Kirschchlorbeers sind genügend symmetrisch um diese Blatthälftenmethode zu gestatten.

*Die Kirschchlorbeerversuche* wurden angestellt mit einer Anzahl Blätter, welche bei der Beobachtung *ad oculos* symmetrisch und von gleicher Entwicklung waren. Zu Anfang des Versuches werden die Blätter halbiert in der Weise, dasz mit einer scharfen Schere die eine Blatthälfte hart an dem Hauptnerv entlang abgeschnitten wird. Diese Hälfte ohne Hauptnerv dient zur Ermittlung des Anfangswertes der Blausäure; mit der anderen Hälfte (also mit Hauptnerv) wird der eigentliche Versuch angestellt. Am Ende des Versuches wird in gleicher Weise die zweite Hälfte vom Hauptnerv abgetrennt. Letzterer kommt somit nicht in Betracht.

Selbstverständlich muszte geprüft werden, ob zu Anfang des Versuches diese anscheinend gleich groszen Blatthälften tatsächlich innerhalb des zulässigen Fehlers eine gleiche Oberfläche haben.

- Zur Ermittlung dieser Oberfläche werden mittels sog. Blaudruckpapier scharfe Abdrücke der Blatthälften hergestellt (für Einzelheiten siehe bei Keulemans)<sup>31)</sup>. Diese Bilder werden ausgewaschen, getrocknet und nachher genau ausgeschnitten, in einem Wägegläschen getrocknet bei 103

bis 105° und gewogen. Man ermittelt in gleicher Weise das Gewicht eines Papierausschnittes mit bekannter Oberfläche, welche letzte mit einem Rollplanimeter genau bestimmt worden ist. Die Oberfläche der Blattabdrücke ist sodann zu berechnen.

Ich führe jetzt einige meiner vielen Vorversuche an:

**Prunus Laurocerasus L. Oberflächenbestimmung  
der Hälften von je 25 Blättern in cm<sup>2</sup>.**

Hälften a.		Hälften b.	
	Oberfläche in cm <sup>2</sup>	Blausäure in cm <sup>3</sup> Silberlösung	Oberfläche in cm <sup>2</sup>
1	246.2	34.60	248.4
2	282.0	37.30	278.6
3	298.0	42.10	300.6
4	252.5	37.75	253.4

Aus diesen Werten geht hervor, dassz die Oberfläche der Blatthälften von je 25 Blättern innerhalb 1 bis 1.5 v.H. gleich ist. Eine derartige Uebereinstimmung genügt für die in Frage kommenden Untersuchungen.

Die Versuche an *Pangium edule* wurden ebenfalls mit Blatthälften angestellt. Die Pangiumblätter haben eine Oberfläche von 150 bis 300 cm<sup>2</sup> und sind keineswegs symmetrisch. Hier muszte selbstverständlich die Oberfläche bestimmt werden, um so mehr, weil jeder Versuch sich oft auf eine oder zwei Blatthälften beschränkte. Damit man doch unabhängig vom Wachstum der Versuchshälften bliebe, wurden vor den Versuchen rasch Abdrücke der ganzen Blätter angefertigt. Da der Hauptnerv des Pangiumblattes geradlinig von der Spitze zur Blattbasis verläuft, wurde deshalb ebenfalls im Blattabdruck eine gerade Linie von der Spitze zur Basis gezogen und die Oberfläche der beiden Hälften mit Hilfe des Rollplanimeters bestimmt.

Die Versuche an den gefiederten Blättern von *Phaseolus lunatus* wurden in einer anderen Weise vorgenommen. Hier wurden die zwei gegenüberstehenden Blättchen des zusammengesetzten Blattes verglichen. Während diese Fiederblättchen asymmetrisch sind, ist das Endblättchen jedoch schön symmetrisch. Viele Versuche sind deshalb angestellt worden mit je einem Fiederblättchen und der Hälfte des Endblättchens. Da bei den Versuchen fast immer junge Blätter in Betracht kommen, so musz hier gleichfalls die Bestimmung der Oberfläche zu falschen Ergebnissen führen. Es muszten deshalb junge Blätter mit anscheinend gleichgrossen Fiederblättchen ausgewählt werden. Das ist keine schwere Aufgabe; die Blätter sind im allgemeinen ganz regelmäzig. Es hat sich ergeben, in ganz ähnlicher Weise wie für *Prunus Laurocerasus* dargetan worden ist, dasz die Oberfläche der korrespondierenden Fiederblättchen von 25 Blättern innerhalb des zulässigen Fehlers dieselbe ist.

Es folgen einige Belege:

*Phaseolus lunatus* L. Oberflächenbestimmung der gegenüberstehenden Fiederblättchen von je 25 Blättern in cm<sup>2</sup>.

Blättchen a.		Blättchen b.	
	Oberfläche in cm <sup>2</sup>	Blausäure in cm <sup>3</sup> Silberlösung	Oberfläche in cm <sup>2</sup>
1	134.5	13.35	135.1
2	117.4	12.35	116.0
3	114.8	10.80	112.6
4	132.8	12.65	132.0

#### *Die Versuche.*

Wie bereits erwähnt, sind die Versuche grösstenteils mit abgeschnittenen Blatthälften oder Fiederblättchen angestellt worden. Das Versuchsmaterial wurde mit den kurzen Blattstielen in Reagenzgläser mit destilliertem Wasser oder mit

einer bestimmten Lösung gestellt. Die Versuche am Kirschchlorbeer wurden immer bei Zimmertemperatur vorgenommen, die an Phaseolus lunatus und Pangium in dem bezüglichen Gewächshaus. Falls die Versuche länger als zwei Tage dauerten, wurden die Blätter nach je zwei Tagen auf eine frische Lösung gestellt und die Schnittfläche am Blattstiel erneut, damit die Blätter nicht infolge Wassermangels austrocknen. In vielen Fällen, zumal bei den Versuchen am Kirschchlorbeer, welche oft ziemlich lang dauerten, wurden die Blätter überdies unter eine Glasglocke gestellt. Auf diese Weise erhalten sich die Blätter sehr gut.

Oft mussten jedoch Versuche vernachlässigt werden, wenn näml. einige Blatthälften welkten, weil die Blattfüsze oberhalb des Wasserspiegels geraten waren.

## § 2. Einreihung der Versuchsergebnisse.

### A. Der Einfluss des Lichtes.

Während einer sonnigen Periode enthalten die Blätter eines anscheinend gleichen Entwicklungsstadiums eine gröszere Blausäuremenge als in einer sonnenarmen Periode. Diese Tatsache wurde ebenfalls von Treub an Phaseolus lunatus beobachtet. Dagegen hat dieser Forscher während der Tagesbeleuchtung keine Zunahme in den Blättern finden können und ebensowenig eine Abnahme während der Nacht. Seiler dagegen gibt eine Abnahme der Blausäure im Kirschchlorbeerblatt während der Nacht an und schlieszt hieraus auf einen Transport der HCN.

Es erschien angebracht, diese Angaben zu prüfen. Ueber die Schwankungen während Tag und Nacht geben die Tab. 15 und 16 Auskunft. Selbstverständlich wurden hier die Versuchshälften der Pflanze belassen. Die Tagesversuche wurden alle an einem sonnigen Tage mit jungen, fast ausgewachsenen Blättern angestellt. Die Nachtversuche wurden gleichfalls an demselben Datum vorgenommen.

TABELLE 15.

*Prunus Laurocerasus L.* Schwankungen der HCN-Menge während des Tages (6 bis 20 Uhr Ortszeit).  
HCN in  $\text{cm}^3 \text{AgNO}_3$  1/100 n pro 25 Hälften.

Datum	Nr.	Morgenwert	Abendwert	Diff.	Bemerkungen
5-6-31	157	13.25	14.15	+ 0.90	Schönes Wetter
	158	11.15	11.95	+ 0.80	
	159	9.50	10.20	+ 0.70	
	160	10.40	11.30	+ 0.90	

TABELLE 16.

*Prunus Laurocerasus L.* Schwankungen der HCN-Menge während der Nacht (20 bis 6 Uhr Ortszeit).  
HCN in  $\text{cm}^3 \text{AgNO}_3$  1/100 n. pro 25 Hälften.

Datum	Nr.	Abendwert	Morgenwert	Diff.
2-6-31	152	8.30	8.35	—
	153	8.80	9.15	+ 0.35
	154	10.85	11.00	+ 0.15
	155	9.10	9.35	+ 0.25

Wie aus den Tabellen ersichtlich ist, nimmt tagsüber die Blausäuremenge zu; während der Nacht bleibt diese konstant, neigt sogar etwas nach Zunahme. Jedenfalls ist von einer Abnahme über Nacht nicht die Rede und wird eine Verarbeitung oder ein Transport der Blausäure unter diesen Umständen ganz problematisch.

Die Zunahme während des Tages ist als eine Wachstumserscheinung des jungen Blattes zu deuten, nimmt doch immer die Blausäuremenge in den jungen, noch im Wachstum begriffenen Blättern zu. Ueber die Herkunft dieser Blausäure gibt der Versuch keinen Aufschluss. Die HCN kann entweder im Blatte selbst gebildet werden, oder aus anderen Teilen nach dem Blatte befördert werden. Damit

letztere Möglichkeit ausgeschlossen sei, betrachten wir jetzt das Verhalten in *abgeschnittenen* Blättern während mehrerer Tage. Im Lichte nimmt die Blausäure hier gleichfalls zu (Tab. 17).

TABELLE 17.

*Prunus Laurocerasus L.* Abgeschnittene junge Blatthälften auf Wasser im Lichte. HCN in cm<sup>3</sup> AgNO<sub>3</sub> 1/100 n. pro 25 Hälften.

Nr.	Versuchs-dauer (Tage)	Anfangswert	Versuch	Diff. % *)
144	2	8.40	8.70	+ 4
145	2	7.90	8.15	+ 3
146	5	9.40	9.95	+ 6
147	5	9.55	10.40	+ 9
148	7	8.70	9.05	+ 4
149	7	8.30	8.95	+ 8

Die Blausäure wird also im Blatte selbst gebildet. Bemerkenswert ist, dasz die Blausäuremenge bis zu einer gewissen Höhe ansteigt und sodann fast konstant bleibt.

Schalten wir den Einfluss des Lichtes aus, so kommen wir zu ganz anderen Ergebnissen. Stellen wir Dunkelversuche an mit abgeschnittenen Blättern des Kirschchlorbeers, so nimmt immer die Blausäure ab, jedoch wechselt die Geschwindigkeit dieser Abnahme mit dem Alter der benutzten Blätter. (Tab. 18).

Ich möchte betonen, dasz die fast ausgewachsenen Kirschchlorbeerblätter nach 15 Tagen noch ganz frisch und grün aussehen, sodasz von einer Abnahme infolge des Absterbens oder Vergilbens der Blätter nicht die Rede ist.

Junge, fast ausgewachsene Blätter zeigen sich gleichfalls wenig aktiv, jedoch tritt die Abnahme schon früher ein.

\*) Differenzen in v. H. des Anfangswertes.

TABELLE 18.

*Prunus Laurocerasus L.* Blatthälften auf Wasser im Dunkeln.  
HCN in cm<sup>3</sup> AgNO<sub>3</sub> 1/100 n. pro 25 Hälften.

Nr.	Objekt	Ver-suchs-dauer (Tage)	Anfangs-wert	Versuch	Diff. %	Bemer-kungen
11	Vorjährige Blätter .	7	23.75	24.20	+ 2	
10		9	26.30	26.15	—	
9		11	24.85	24.15	— 3	
8		13	27.80	26.45	— 5	
58	Fast ausgewachsene	5	13.35	13.45	—	
59	Blätter .....	7	14.50	13.80	— 5	
63		9	12.85	11.90	— 7.5	
64		11	13.10	11.55	— 12	
21	Junge Blätter .....	2	11.10	11.25	—	
22		2	11.60	11.55	—	
23		3	12.25	11.90	— 3	
24		4	10.45	9.55	— 8.5	
25		5	9.95	8.95	— 10	
26		7	10.70	8.90	— 17	
27		7	10.20	8.20	— 19,5	
14	Sehr junge Blätter	5	10.45	7.55	— 28	frisch
15		6	9.80	5.35	— 45	± frisch
16		7	10.60	4.40	— 60	erschlaffend
17		8	11.15	2.85	— 74	schlaff

Recht ausgeprägt werden die Differenzen, wenn man Blätter verwendet, welche noch im Wachstum begriffen sind. Es sei jedoch bemerkt, dasz alle HCN nie schwindet. Die Blätter erschlaffen bevor vollständiger Schwund eingetreten ist.

Wie sollen wir uns diese Verhältnisse deuten? Man könnte annehmen, die Blausäure entstehe im Lichte und werde im N-Stoffwechsel benutzt. Im Dunkeln werde also keine Blausäure neu gebildet und die vorhandene HCN müsse abnehmen. Die Blausäureglukoside trüten also als Stickstoffreserven auf. Die Annahme wäre mit der Hypothese

Treubs zu vereinbaren. Anderseits ist die Abnahme der Blausäure als eine Verwertung des Glukosides als Kohlenhydratreserve zu deuten. Diese Annahme stimmt weit

TABELLE 19.

*Phaseolus lunatus L.* Unausgewachsene Blätter auf Wasser im Dunkeln. HCN in cm<sup>3</sup> 1/100 n. AgNO<sub>3</sub> pro 25 Hälften.\*)

Nr.	Versuchs-dauer (Tage)	Anfangswert	Versuch	Diff. %	Bemer-kungen
114	1	16.10	16.60	+ 3	
115	1	15.35	15.50	—	
109	2	15.60	16.00	+ 2,5	
110	2	17.50	17.00	— 3	
112	3	11.80	11.35	— 4	
113	3	14.35	14.00	— 2,5	
119	3	16.25	15.80	— 3,5	
103	4	15.00	14.55	— 3	
104	4	15.95	15.35	— 4	
106	4	13.85	13.00	— 6	
107	4	18.05	17.20	— 5	
96	6	17.05	15.40	— 9	
98	6	14.55	13.15	— 10	
99	6	14.60	13.05	— 10,5	
94	6	14.35	13.00	— 9	
88	8	17.95	12.85	— 26	
89	8	15.35	11.95	— 22	
92	8	14.35	10.05	— 30	

besser zu den Versuchsergebnissen. Diese zeigen, dass die stärkereichen Blätter nur nach längerer Zeit anfangen die Blausäure zu verlieren. Die ausgewachsenen und vorjährigen Blätter enthalten reichlich Stärke, die unausgewachsenen

\*) Jede Hälfte besteht aus einem Fiederblättchen und der Hälfte des Endblättchens, welche beide dem Blattstiele belassen wurden.

dagegen keine oder eine Spur, die sehr jungen Blätter sind stärkefrei.

Dieses wird gleichfalls beobachtet bei den Dunkelversuchen an *Phaseolus lunatus* (Tab. 19 und 20). Während die jungen, ausgewachsenen Blätter eine starke Bläuung mit Jodlösung aufweisen, färben die jungen, unausgewachsenen Blätter sich nicht oder nur schwach rötlich mit diesem Reagens.

TABELLE 20.

*Phaseolus lunatus* L. Eben ausgewachsene Blätter auf Wasser im Dunkeln. HCN in  $\text{cm}^3 \text{AgNO}_3$  1/100 n. pro 25 Hälften.

Nr.	Versuchs-dauer (Tage)	Anfangs-wert	Versuch	Diff. %	Bemer-kungen
131	2	21.75	21.55	—	Stärke
132	2	22.65	22.80	—	"
133	3	23.60	23.85	—	Stärke?
134	3	18.60	18.65	—	"
128	4	15.40	15.20	—	stärkefrei
129	4	14.00	13.55	— 3	"
130	4	16.10	15.40	— 4	"
126	6	18.15	17.35	— 4.5	"
127	6	14.95	14.00	— 6.5	"
124	8	12.10	10.65	— 12	"

Wie aus Tabelle 20 hervorgeht, schwindet zuerst die Stärke; nach etwa 3 Tagen sind die Blätter vollständig stärkefrei. Während dieser Periode bleibt die Blausäuremenge fast konstant; am vierten Tage setzt die Abnahme der HCN ein.

Es spricht also manches dafür, dasz die Blausäureglukoside hier primär als Kohlenhydratreserven auftreten. Die Ergebnisse sind so zu deuten, dasz nachdem die Reserven an Stärke und an freiem Zucker erschöpft sind,

die Glukoside Kohlenhydratmangels wegen aufgespaltet werden, bei welchem Vorgang die Blausäure in irgendeiner Weise umgewandelt wird.

Es wird jetzt erklärlich, dasz nie ein vollständiger Schwund der Blausäure beobachtet wird, da die Glukoside etwa die letzten verwendbaren Kohlenhydrate des Blattes bilden.

Es ist deshalb vielleicht nicht ohne Wichtigkeit, dasz Pangiumblätter im Dunkeln alle HCN verlieren ohne dasz sie Absterbungserscheinungen zeigen \*) (Tab. 21).

TABELLE 21.

Pangium edule Reinw. Unausgewachsene Blätter auf Wasser  
im Dunkeln. HCN in  $\text{cm}^3 \text{AgNO}_3$  1/100 n.  
pro  $100 \text{ cm}^2$  Oberfläche.

Nr.	Versuchs-dauer (Tage)	Anfangswert	Versuch	Diff. %
168	3	6.30	6.10	— 3
169	3	5.90	5.80	—
170	6	10.40	3.20	— 69
171	6	5.30	1.75	— 67
172	6	5.45	1.90	— 65
173	8	5.50	0.20	— 96
174	8	9.15	0.35	— 96

Weil hier offenbar mit dem Glukoside nicht alle Reservestoffe erschöpft sind, ist die Möglichkeit vorhanden, dasz die Blausäure aus anderen Gründen verschwindet.

Das abweichende Verhalten der Pangiumblätter wird späterhin noch bestätigt.

\*) Die Blausäuremenge in den jungen Blättern ist bei weitem nicht so gross als Treub für junge Blätter angibt, an welcher Tatsache zweifelsohne die klimatologischen Verhältnisse Schuld sind. Als ich später näml. die Pangiumpflanzen an eine sonnigere Stelle übergebracht hätte, so nahm die Blausäuremenge pro Oberfläche beträchtlich zu (vergl. Tab. 26).

*B. Der Einflusz der Kohlenhydrate.*

Wenn unsere Anschauung richtig ist, dasz im Dunkeln die Blausäure aus den Blättern schwindet infolge Kohlenhydratmangels, so musz der Abnahme vorgebeugt werden können, wenn Kohlenhydrate zugeführt werden. Bei den Lichtversuchen sind diese fortwährend vorhanden infolge der Kohlenstoffassimilation. Bei den Dunkelversuchen musz die Kohlenhydratzufuhr künstlich hergestellt werden.

Zu diesem Zweck wurden Blatthälften des Kirschchlorbeers im Dunkeln auf 4 %-ige Glukoselösungen gestellt. Wie schon früher erwähnt, wurden die ziemlich rasch verderbenden Lösungen nach je zwei Tagen durch frische Lösungen ersetzt. Es stellte sich heraus, dasz die Blatthälften einen fortgesetzten Aufenthalt in einer derartigen Glukoselösung nicht ertragen; die Blätter zeigen nach 3 bis 4 Tagen braune Ränder, welche sich allmählich über die ganze Spreite ausdehnen (Tab. 22).

TABELLE 22.

*Prunus Laurocerasus L. Unausgewachsene Blätter auf  
4 % Glukoselösung im Dunkeln.*

HCN in  $\text{cm}^3 \text{ Ag NO}_3 1/100 \text{ n. pro 25 Hälften.}$

Nr.	Versuchs-dauer (Tage)	Anfangs-wert	Versuch	Diff. %	Bemer-kungen
61	3	9.80	9.75	—	
62	3	9.65	9.65	—	
63	3	9.90	9.80	—	
64	6	9.65	—	—	Blätter sterben ab

Auf einer 1 %-igen Lösung verbleiben die Blätter längere Zeit ohne Schaden. In Tab. 23 sind die Resultate mit 1 %-iger Glukoselösung angeführt. Zur Vergleichung sind daneben Dunkelversuche mit Blatthälften auf reinem Wasser angestellt worden. Die Blatthälften waren alle von

anscheinend gleicher Entwicklung und die Versuche sind an demselben Datum angefangen worden.

TABELLE 23.

*Prunus Laurocerasus L.* Unausgewachsene Blätter im Dunkeln. HCN in cm<sup>3</sup> Ag NO<sub>3</sub> 1/100 n. pro 25 Hälften.

Datum	Nr.		Versuchs-dauer (Tage)	Anfangs-wert	Versuch	Diff. %
1-7-31	192	Dest. Wasser	3	10.95	10.50	— 4
	193		3	12.40	11.70	— 6
	194		3	12.40	12.00	— 3
	195		5	12.30	10.15	— 18
	196		5	12.40	10.95	— 12
	197		5	12.60	10.50	— 17
1-7-31	198	1 % Glukose	3	11.35	11.25	—
	199		3	12.15	12.20	—
	200		3	11.65	11.50	—
	201		5	11.90	11.95	—
	202		5	11.85	11.65	—
	203		5	12.50	12.30	—

Wie ersichtlich ist, nimmt die Blausäuremenge fortwährend ab in den Blatthälften, welche auf reines Wasser gestellt worden sind, während die Hälften, welche auf der Glukoselösung verweilten, ihren Blausäurebestand während der ganzen Versuchsdauer beibehalten.

Diese Versuche zeigen zwei wichtige Tatsachen.

Zuerst wird der Wert der Blausäureglukoside als Kohlenhydratreserve, welcher schon im vorhergehenden Kapitel behauptet wurde, bestätigt. Da fortwährend Glukose zugeführt wird, ist eine Ausnützung des Glukosides als Kohlenhydrat nicht notwendig.

Zweitens erhellt, dasz, wenn Glukose anwesend ist, die Blausäure nicht in den N-Stoffwechsel aufgenommen wird, obwohl keine Stickstoffverbindungen zugeführt werden.

Die Blausäure kann also nicht eine so wichtige Substanz im Eiweiszstoffwechsel sein, wie Treub es behauptet hat.

Die Blätter des Phaseolus lunatus verhalten sich in ähnlicher Weise als die Kirschchlorbeerblätter (Tab. 24).

TABELLE 24.

Phaseolus lunatus L. Unausgewachsene Blätter im Dunkeln  
auf 4 % Glukoselösung in  $\text{cm}^3 \text{Ag NO}_3$  1/100 n.  
pro 25 Hälften.

Nr.	Versuchs-dauer (Tage)	Anfangswert	Versuch	Diff. %
97	2	15.10	16.75	+ 11
95	3	13.30	15.15	+ 14
93	4	16.95	19.75	+ 16
90	4	17.35	19.45	+ 12
86	5	13.30	15.00	+ 13
87	5	13.85	15.95	+ 15

Die Blausäuremenge nimmt in den Blättern zu bis zu einem gewissen Grade. Das Maximum ist schon nach 2 bis 3 Tagen erreicht; während der weiteren Versuchsdauer bleibt die Blausäuremenge nahezu konstant. Der einzige Unterschied mit dem Kirschchlorbeerversuch ist deshalb, dasz hier anfänglich eine Blausäurezunahme beobachtet wird.

Dieses Ergebnis wird erklärlich, wenn wir ins Auge fassen, dasz der Blattstiel des Phaseolus reichlich Nitrate enthält \*); in dem Hauptnerv wird ebenfalls, jedoch wenig,

\*) Das Nitrat (und Nitrit) wurde in den Blattstielen, bzw. Hauptnerven, nachgewiesen, indem das Material in 1 bis 2  $\text{cm}^3$  Wasser ausgekocht und nach Abkühlung das Extrakt auf eine 1 % Diphenylaminlösung in konz. Schwefelsäure geschichtet wurde.

Die Reaktion ist, in dieser Weise ausgeführt, ausserordentlich empfindlich.

Bei Kirschchlorbeerextrakten müssen zuvor die Gerbstoffe entfernt werden, da diese sich mit der konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  rot färben.

Nitrat gefunden, während die Blattspreite sich als nitratfrei ergeben hat. Im sehr kurzen Blattstiel des Kirschlorbeers, sowie im Hauptnerv, ist jedoch nur eine Spur Nitrat nachzuweisen.

Es mag jetzt vorläufig dahingestellt bleiben, ob die Blausäure ein direktes Umwandlungsprodukt der Nitrate ist; doch wird indirekt die Anwesenheit der Nitrate einen Einfluss auf die Blausäuremenge haben, da die organischen Stickstoffverbindungen im Blatt wenigstens zum Teil von dem zugeführten anorganischen Stickstoff herrühren. Es wird jetzt klar, warum in den Phaseolusblättern eine Zunahme der Blausäuremenge stattgefunden hat im Gegensatz zu dem Verhalten der Kirschlorbeerblätter.

TABELLE 25.

*Phaseolus lunatus L.* Unausgewachsene Fiederblättchen im Dunkeln auf 4 % Glukoselösung. HCN in cm<sup>3</sup> Ag NO<sub>3</sub> 1/100 n. pro 25 Blättchen.

Nr.	Versuchs-dauer (Tage)	Anfangswert	Versuch	Diff. %
215	2	10.10	11.00	+ 9
217	2	12.60	13.50	+ 7
219	2	14.60	15.10	+ 3,5
221	2	12.70	13.55	+ 7
223	2	12.90	13.45	+ 4
216	3	8.30	8.50	+ 3
218	3	15.75	16.10	+ 2
220	3	11.25	12.30	+ 9
222	3	13.20	13.90	+ 5
224	3	14.05	14.50	+ 3
211	4	10.30	10.55	+ 2,5
212	4	10.10	10.50	+ 4
213	5	11.25	11.45	+ 2
214	5	9.95	10.05	—

Diese Anschauung wird von einem Versuch gestützt, welcher nur mit den Fiederblättchen des *Phaseolus lunatus*

angestellt wurde. Der nitratreiche Blattstiel kommt also ausser Betracht und es ist nur die Rede von den sehr geringen Mengen Nitrat im winzigen Stielchen des Fiederblättchens und im Hauptnerv. (Tab. 25).

Tatsächlich ist die Blausäurezunahme hier weit weniger ausgeprägt. Gleich wie beim vorhergehenden Versuch bleibt die Blausäuremenge, wenn einmal die Zunahme erfolgt ist, fast konstant.

Jedenfalls zeigen auch diese Versuche, dasz die Blausäure unter diesen Umständen nicht in den N-Stoffwechsel aufgenommen wird.

Merkwürdigerweise zeigt *Pangium edule* auch hier ein abweichendes Verhalten. Wenn die Blätter auf 3 %-ige Glukoselösung gestellt werden, so nimmt die Blausäuremenge doch beträchtlich ab. (Tab. 26).

TABELLE 26.

*Pangium edule* Reinw. Unausgewachsene Blätter im Dunkeln auf 3 % Glukoselösung. HCN in cm<sup>3</sup> Ag NO<sub>3</sub> 1/100 n. pro 100 cm<sup>2</sup> Blattoberfläche.

Nr.	Versuchs-dauer (tage)	Anfangs-wert	Versuch	Diff. %	Bemerkungen
204	3	8.10	7.60	— 6	
205	3	14.00	13.75	— 2	
207	5	12.20	9.70	— 20	
208	5	10.80	8.10	— 25	fangen an zu erschlaffen
209	5	10.15	7.80	— 23	

Es sei jedoch bemerkt, dasz die Blätter nicht so frisch bleiben, wie falls sie auf reinem Wasser verweilen. Vielleicht wäre mit einer schwächeren Glukosekonzentration ein ähnliches Ergebnis zu erzielen als mit *Prunus Laurocerasus* der Fall war. (*Pangium edule* enthält weder im Blatt noch im Blattstiel Nitrat.) Das Blattmaterial des *Pangium* reichte leider nicht aus, diesen Versuch zu wiederholen.

*C. Der Einflusz der Nitrat.*

Im Vorhergehenden wurde bemerkt, dasz eine Steigerung des Blausäurebestandes bei Verdunkelung von Phaseolusblättern, welche auf Glukoselösung verweilen, auf den Gehalt an anorganischem Stickstoff des Blattstieles und der Nerven zurückzuführen ist. Es wird damit jedoch nicht behauptet, dasz die Blausäure direkt aus den Nitraten hervorgehe.

Betrachten wir zuerst den Fall, wo dem Blatte dauernd Nitrat zur Verfügung stehen. Wenn den Phaseolusblättern im Dunkeln nur eine 0.15 %-ige Kaliumnitratlösung geboten wird, so beobachten wir, dasz oft die Blausäuremenge etwas ansteigt, um sodann ziemlich rasch abzunehmen (Tab. 27). Wird aber ausserdem Glukose gegeben, so erfolgt eine stärkere Zunahme, welche ein Maximum erreicht; sodann wird auch hier eine Abnahme beobachtet. (Tab. 28).

TABELLE 27.

Phaseolus lunatus L. Unausgewachsene Blätter im Dunkeln auf 0.15 %  $\text{KNO}_3$ -Lösung. HCN in  $\text{cm}^3 \text{AgNO}_3$  1/100 n pro 25 Hälften.

Nr.	Versuchs-dauer (Tage)	Anfangswert	Versuch	Diff. %
84	2	13.95	14.50	+ 3
81	3	10.60	11.30	+ 6
78	4	13.30	13.15	- 1
75	4	12.05	12.00	- 0
72	5	12.25	11.10	- 9
67	5	17.40	16.35	- 6
68	6	14.65	13.05	- 11

Aus diesen Beobachtungen geht hervor, dasz für eine Speicherung der Blausäure die Anwesenheit der Nitrat nicht genügt. Das ist nur der Fall, wenn Glukose disponibel

ist zur Glukosidbildung. Die oft beobachtete geringe Zunahme zu Anfang der Versuche mit Nitratlösung, wäre damit einer, in diesem Stadium noch vorhandenen, Kohlenhydratreserve zu verdanken.

TABELLE 28.

*Phaseolus lunatus L.* Unausgewachsene Blätter im Dunkeln auf 4 % Glukose + 0.15 %  $\text{KNO}_3$ . HCN in  $\text{cm}^3 \text{AgNO}_3$  1/100 n pro 25 Hälften.

Nr.	Versuchs-dauer (Tage)	Anfangswert	Versuch	Diff. %
31	2	13.70	14.10	+ 3
33	4	13.60	14.50	+ 7
42	5	13.90	15.40	+ 11
43	5	12.90	14.20	+ 10
44	5	14.20	15.65	+ 10
34	6	10.15	11.05	+ 9
35	8	13.20	13.68	+ 4
36	8	12.15	12.85	+ 6

Die Zunahme der Blausäure bei den Glukosenitratversuchen ist nicht gröszer als bei Glukoseversuchen (s. Tab. 24). Wenn die Blausäure direkt aus den Nitraten hervorgeinge, so wäre eine gröszere Ansteigung der HCN zu erwarten, da dauernd Nitrate und Glukose zur Verfügung stehen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, *dasz die Nitrat offenbar nicht in erster Linie für die Blausäurebildung verantwortlich sind*.

Die Verhältnisse werden noch verwickelter durch die Beobachtung, dasz nach der Blausäurezunahme, sowohl bei den Nitratversuchen als bei den Glukosenitratversuchen, eine bestimmte Abnahme auftritt. Treub erklärt diese Tatsache in der Weise, dasz die Nitrat die Umwandlungs geschwindigkeit der Blausäure steigern. Diese Annahme erscheint gezwungen; ausserdem ist sie nicht einwandfrei.

Man dürfte in diesem Falle doch erwarten, dasz bei den

Glukosenitratversuchen die Blausäuremenge nicht zunächst zunähme, sondern anfinge sofort abzunehmen.

Auf ein zweites Bedenken gegen die Annahme Treubs stossen wir, wenn die obenstehenden Versuche wiederholt werden, jedoch mit dieser Abänderung, dasz anstatt Kaliumnitrat Asparagin, also eine *organische* Stickstoffquelle, verwendet wird. (Tab. 29 und 30).

TABELLE 29.

*Phaseolus lunatus L.* Unausgewachsene Blätter im Dunkeln auf 1 % Asparaginlösung. HCN in  $\text{cm}^3 \text{AgNO}_3$  1/100 n. pro 25 Hälften.

Nr.	Versuchs-dauer (Tage)	Anfangswert	Versuch	Diff. %
83	2	12.60	12.45	—
80	3	14.00	13.80	— 1.5
77	4	16.25	16.00	— 1.5
74	4	15.20	14.90	— 2
69	5	15.30	14.00	— 8.5
70	5	17.50	15.10	— 14
85	6	15.00	13.25	— 12

TABELLE 30.

*Phaseolus lunatus L.* Unausgewachsene Blätter im Dunkeln auf 4 % Glukose + 1 % Asparagin. HCN in  $\text{cm}^3 \text{AgNO}_3$  1/100 n. pro 25 Hälften.

Nr.	Versuchs-dauer (Tage)	Anfangswert	Versuch	Diff. %
66	2	15.20	18.05	+ 19
45	4	19.40	22.95	+ 18
32	5	13.05	17.00	+ 30
37	5	15.75	20.80	+ 32
38	5	16.20	19.95	+ 23
39	6	14.40	17.00	+ 18
30	8	14.10	14.90	+ 6

Wir kommen hier zu denselben Ergebnissen als bei den Nitratversuchen. Die Anwesenheit des Asparagins hat keine Zunahme der Blausäure zur Folge, wenn nicht ausserdem Glukose gegeben wird. Die Steigerung der Blausäuremenge, welche im letzten Falle auftritt, ist weit grösser als bei den Nitratversuchen. Selbstverständlich können ebenfalls die Nitrate, welche im Objekt enthalten sind, ihren Einfluss ausüben; die Blausäurezunahme infolge der Anwesenheit des Asparagins redet jedoch vor sich selbst; sie ist mehr als zweimal so gross als bei den Glukoseneitrat- oder Glukoseversuchen.

Dieses Ergebnis berechtigt zur Schlusfolgerung, dasz das Auftreten der Blausäure in den Blättern nur indirekt von der Anwesenheit der Nitrate, im allgemeinen des mineralen Stickstoffes, abhängig ist, und dasz die Blausäure wenigstens ebensogut bei Anwesenheit organischer N-Verbindungen entstehen kann.

Bei den Asparaginversuchen tritt später, gleich wie bei den Nitratversuchen, eine Abnahme der Blausäure ein und zwar erst nach etwa 5 Tagen. Die Nitrate, welche zu Anfang der Versuche in den Blättern anwesend waren, sind dann schon längst verschwunden (nach 3 bis 4 Tagen). Die obenerwähnte Annahme Treubs, dasz die Nitrate die weitere Verarbeitung der Blausäure im Stickstoffstoffwechsel fördern dürften, wird also von den Glukoseneitrat- und Asparaginversuchen widerlegt.

Wie müssen wir uns dann die Abnahme der Blausäuremenge bei den Nitrat- und Asparaginversuchen deuten?

Für die Versuche, wo die Blätter nur auf eine Nitrat- oder Asparaginlösung gestellt wurden, ist die Abnahme, wenigstens zum Teil, der Ausnutzung des Glukosides infolge Kohlenhydratmangels zu verdanken.

Die Abnahme der Blausäure nach 5 bis 6 Tagen ist vielleicht einer beginnenden Vergiftung des Blattes zuzuschreiben. Tatsächlich zeigen die Blätter nach 7 bis 8 Tagen

Absterbungsscheinungen (Phaseolusblätter auf reinem Wasser dagegen sehen nach 8 Tagen noch frisch aus). Dem Blatt werden ziemlich starke Nitrat- oder Asparaginlösungen dargeboten, aus- zerdem Glukose. Anfänglich vermögen diese Nährstoffe vielleicht einen günstigen Einflussz auszuüben, es ist aber denkbar, dasz späterhin Störungen auftreten, weil z.B. die Photosynthese ausgeschlossen ist und deshalb gewisse Prozesse, welche des Lichtes bedürfen, in einem gewissen Stadium gehemmt werden. Eine Stütze für diese Annahme wäre, dasz Phaseolusblätter im Lichte auf einer Nitratlösung, welcher sogar noch Glukose zugegeben wurde, eine starke Blausäurezunahme zeigen und dasz während einer gleichen Versuchsdauer die HCN hier, in Gegensatz zum Ergebnis der entsprechenden Dunkelversuche, fast nicht abzunehmen scheint (Tab. 31).

TABELLE 31.

*Phaseolus lunatus L.* Unausgewachsene Blätter im Lichte auf 4 % Glukose + 0.15 %  $\text{KNO}_3$ . HCN in  $\text{cm}^3 \text{AgNO}_3$  1/100 n. pro 25 Hälften.

Nr.	Versuchs-dauer (Tage)	Anfangswert	Versuch	Diff. %
54	2	14.95	16.45	+ 10
49	4	19.25	21.30	+ 10,5
48	4	13.85	16.20	+ 17
47	6	16.80	19.25	+ 14,5
40	6	14.75	16.80	+ 14

Es wurde noch versucht den Einflussz von anderen Stickstoffverbindungen als Nitrate klarer zu Tage treten zu lassen, durch Beseitigung der Nitrate, welche zu Anfang der Versuche schon im Phaseolusblatt anwesend sind. Zu diesem Zweck wurden die ganzen Blätter während 4 Tage im Dunkeln auf Wasser gestellt.

Nach dieser Periode ist jede Spur von Nitraten verschwunden (in den meisten Fällen schon nach 3 Tagen). Die Hälften dieser Blätter dienten zur Bestimmung des Anfangswertes, die anderen Hälften wurden auf 4 %-ige Glukoselösung gestellt, welcher Lösung 0.15 % Kaliumnitrat, bzw. 1 % Asparagin zugegeben worden war.

Diese Versuche blieben jedoch erfolglos, da die Versuchsbedingungen schlecht von den Blättern ertragen wurden. Bald nachdem die Blätter auf die Nährflüssigkeit gestellt worden waren, fingen die Blättchen an abzufallen oder lösten sich leicht vom Blattstiel.

#### *D. Beziehungen zwischen Blausäure und Eiweisz.*

Wenn die Blausäure eine so wichtige Stufe in der Stickstoffassimilation der Blätter wäre, wie Treub in seiner Hypothese behauptet, so geht daraus hervor, dasz der Eiweiszstoffwechsel mit den Schwankungen im Blausäurebestand weitgehend verknüpft sein müsse. Es empfiehlt sich daher, die Menge des Eiweiszstickstoffes in den Fällen kennen zu lernen, wo die Schwankungen der Blausäuremenge in den Blättern ausgeprägt sind.

Von vornherein wird man jedoch keine quantitativen Ergebnisse erwarten können. Die Ursache ist darin enthalten, dasz es sich bei den stärksten Blausäureschwankungen oft nur um Fraktionen von Milligrammen Blausäure-N handelt. Und die Bestimmung des Eiweisz-N ist nicht derart empfindlich, dasz diese geringen Mengen Blausäure-N quantitativ wiedergefunden werden können. Ueberdies kann man erwarten, dasz nicht nur der Eiweisz N, aber auch der Rest-N bei einer Schwankung des Blausäurestickstoffes beteiligt ist.

Mit Rücksicht auf diese Tatsachen beschränkte ich mich auf die Beobachtung der *Richtung*, in welche die Schwankungen im Eiweisz-N und Blausäure-N hinweisen. Diese Schwankungen wurden an abgeschnittenen jungen Blättern

untersucht, wo also die Eiweisssynthese im vollen Flusse ist.

Zuerst wurde untersucht, wie sich der Eiweisz-N in blausäureführenden Blättern verhält, wenn diese im Dunkeln auf reines Wasser gestellt werden. Darüber berichtet Tabelle 32.

TABELLE 32.

*Prunus Laurocerasus L. Junge, unausgewachsene Blätter auf Wasser im Dunkeln. In mg N pro 25 Hälften.*

Nr.	Versuchs-dauer (Tage)	mg Blausäure-N			mg Eiweisz-N		
		Anfangs-wert	Versuch	Diff.	Anfangs-wert	Versuch	Diff.
138	2	2.13	2.15	—	11,8	11.6	— 0.2
139	2	1.82	1.81	—	10.7	10.2	— 0.5
140	5	2.20	1.94	— 0.26	11.5	10.9	— 0.6
141	5	2.14	1.93	— 0.21	11.6	10.6	— 1.0
142	7	1.79	1.49	— 0.30	10.7	9.1	— 1.6
143	7	2.20	1.87	— 0.43	11.4	9.7	— 1.7

Im Einklang mit den früheren Dunkelversuchen (S. Tab. 18 und 23), bleibt hier die Blausäuremenge während der ersten Tage der Versuchsdauer fast konstant. Die Menge des Eiweisz-N nimmt fortwährend ab, welche Beobachtung infolge der überwiegenden Eiweisdissimilation zu erwarten war. Von einer Hemmung der Eiweiszabnahme, sobald die Blausäure zu verschwinden anfängt, bemerken wir nichts.

Zu gleichen Ergebnissen kommen wir, wenn die Fiederblättchen des *Phaseolus lunatus* auf eine Glukoselösung gestellt werden. (Tab. 33).

Obwohl die Abnahme des Eiweisz-N nicht grosz ist, so hat sie doch ganz bestimmt stattgefunden. Von einer Abnahme des Blausäure-N, welche man alsdann als eine Verwertung in der Eiweissynthese deuten könnte, ist

jedoch nicht die Rede. (Die Resultate der Blausäurebestimmung wurden schon früher gegeben in Tab. 25).

TABELLE 33.

*Phaseolus lunatus L.* Unausgewachsene Fiederblättchen im Dunkeln auf 4 % Glukoselösung.  
In mg N pro 25 Blättchen.

Nr.	Versuchs-dauer (Tage)	mg Blausäure-N			mg Eiweisz-N		
		Anfangs-wert	Versuch	Diff.	Anfangs-wert	Versuch	Diff.
215	2	2.83	3.08	+ 0.25	18.0	17.7	- 0.3
217	2	3.53	3.78	+ 0.25	16.1	15.6	- 0.5
219	2	4.09	4.23	+ 0.14	18.0	17.5	- 0.5
221	2	3.56	3.79	+ 0.23	18.1	17.4	- 0.7
223	2	3.61	3.77	+ 0.16	17.4	16.8	- 0.6
216	3	2.32	2.38	+ 0.06	17.7	17.3	- 0.4
218	3	4.41	4.51	+ 0.10	17.8	16.9	- 0.9
220	3	3.15	3.44	+ 0.29	16.6	15.8	- 0.8
222	3	3.70	3.89	+ 0.19	15.0	13.9	- 1.1
224	3	3.93	4.06	+ 0.13	15.1	14.1	- 1.0
211	4	2.88	2.95	+ 0.07	22.0	20.2	- 1.8
212	4	2.83	2.94	+ 0.11	15.4	14.2	- 1.2
213	5	3.15	3.21	+ 0.06	14.3	12.6	- 1.7
214	5	2.79	2.81	—	14.1	12.7	- 1.4

Betrachten wir schliesslich den Einfluss des Lichtes auf die Menge des Eiweisz-N. Neben der Kohlenhydratassimilation sind hier also andere photosynthetische Wirkungen möglich. Wenn junge Blatthälften des Kirschlorbeers auf Wasser ans Licht gestellt werden, so erfolgt, wie schon früher dargetan wurde (s. Tab. 17), eine Zunahme der Blausäuremenge, welche späterhin fast konstant bleibt. Die Menge des Eiweisz-N steigt ebenfalls nicht unbeträchtlich an (Tab. 34).

Mit Rücksicht auf die Wichtigkeit dieser Ergebnisse wurde der Versuch in grössererem Maßstabe wiederholt.

Die Versuche wurden an demselben Tag angestellt und dauerten  $4\frac{1}{2}$  Tage (Tab. 35). Während der Versuchsdauer gab es im Mittel  $10\frac{1}{2}$  Stunden Sonnenschein pro Tag.\*)

TABELLE 34.  
Prunus Laurocerasus L. Junge Blatthälften auf Wasser im  
Lichte. In mg N pro 25 Hälften.

Nr.	Versuchs-dauer (Tage)	mg Blausäure-N			mg Eiweisz-N		
		Anfangs-wert	Versuch	Diff.	Anfangs-wert	Versuch	Diff.
144	2	2.35	2.44	+ 0.09	11.7	12.0	+ 0.3
145	2	2.21	2.28	+ 0.07	11.5	12.3	+ 0.8
146	5	2.63	2.79	+ 0.16	12.5	13.6	+ 1.1
147	5	2.67	2.91	+ 0.24	12.8	14.2	+ 1.4
148	7	2.44	2.53	+ 0.09	12.0	12.9	+ 0.9
149	7	2.32	2.51	+ 0.19	12.6	13.3	+ 0.7

TABELLE 35.  
Prunus Laurocerasus L. Junge Blatthälften auf Wasser im  
Lichte während  $4\frac{1}{2}$  Tage. In mg N pro 25 Hälften.

Nr.	Versuchs-dauer (Tage)	mg Blausäure-N			mg Eiweisz-N		
		Anfangs-wert	Versuch	Diff.	Anfangs-wert	Versuch	Diff.
175	$4\frac{1}{2}$	3.99	4.35	+ 0.36	15.5	16.4	+ 0.9
176	"	3.63	3.92	+ 0.29	14.2	14.8	+ 0.6
177	"	3.11	3.47	+ 0.36	11.9	12.5	+ 0.6
178	"	3.02	3.26	+ 0.24	11.3	11.8	+ 0.5
179	"	3.26	3.48	+ 0.22	11.6	12.4	+ 0.8
180	"	2.70	3.02	+ 0.32	10.4	11.4	+ 1.0
181	"	2.93	3.24	+ 0.31	11.1	12.0	+ 0.9
182	"	3.28	3.44	+ 0.16	11.5	12.2	+ 0.7

\* ) Nach offiziellen meteorologischen Beobachtungen im botanischen Garten in Amsterdam, mir bereitwilligst von Herrn Dr. M. Pinkhof zur Verfügung gestellt.

Diese Versuche zeigen ebenfalls eine Steigerung der Blausäuremenge und der Eiweiszmenge. Wenn wir jetzt ins Auge fassen, dasz jede Blathälfe ein abgeschlossenes Ganze ist, so geht aus diesen Versuchen hervor, dasz der Blausäure-N hier nicht in die Eiweiszsynthese aufgenommen wird, dürfte man sonst neben einer Zunahme des Eiweisz-N, eine Abnahme des Blausäure-N erwarten.

Eine andere Erklärung ist weit annehmbarer, näml. diese, dasz aus dem Rest-N (Aminosäuren u.d.) im Lichte einerseits Eiweisz, anderseits Blausäure gebildet werde.

Diese Anschauung wird im nächsten Abschnitt eingehender besprochen werden.

### § 3. Zusammenfassung der Blattversuche.

Die Resultate der vorhergehenden Untersuchungen an blausäureglukosidführenden Blättern lassen sich folgendermassen zusammenfassen.

1. Während des Tages nimmt die Blausäuremenge in den jungen Blättern zu; während der Nacht bleibt sie konstant.  
Ein Transport der Blausäure über Nacht aus den jungen Kirschlorbeerblättern findet also nicht statt.
2. Im Lichte steigt die Blausäuremenge in abgeschnittenen Kirschlorbeerblättern zuerst an, um dann fast konstant zu bleiben.
3. Im Dunkeln nimmt die Blausäuremenge in den abgeschnittenen Blättern ab.

Diese Abnahme erfolgt erst, nachdem die Stärke aus den Blättern verschwunden ist und ist langsamer, je nachdem ältere Blätter verwendet werden.

4. Die Blausäure verschwindet bei Verdunkelung nie ganz aus den Blättern, vorausgesetzt, dasz diese nicht im Absterben begriffen sind.

- Eine Ausnahme bilden die Blätter des *Pangium edule*, wo ein vollständiger Schwund erreicht wird.
5. Die Blausäure verschwindet nicht bei Verdunkelung, wenn den abgeschnittenen Blättern eine geeignete Glukosekonzentration dargeboten wird.  
Pangium edule bildet vielleicht wieder einen Ausnahmefall.
  6. Die Anwesenheit von Nitraten fördert die Bildung der Blausäureglukoside im Dunkeln nur, wenn ausserdem Glukose zur Verfügung steht; sonst tritt Abnahme ein.  
Im Lichte wird ebenfalls ein fördernder Einfluss der Nitrate beobachtet.
  7. Darreichung von Asparagin an die abgeschnittenen Blätter des *Phaseolus lunatus* gibt ähnliche Resultate als die Nitrat, nur ist der fördernde Einfluss des Asparagins auf die Blausäuremenge ein weit gröszerer.  
Die Nitrat sind also nicht unbedingt notwendig für die Blausäurebildung.
  8. Die Abnahme der Blausäure bei Verdunkelung von abgeschnittenen Kirschlorbeerblättern hat keinen merklichen Einfluss auf die Eiweisdissimilation dieser Blätter.
  9. Im Lichte nimmt in abgeschnittenen Kirschlorbeerblättern sowohl die Blausäuremenge als die Eiweismenge zu.
- 

#### VIII. ABSCHNITT. DISKUSSION DER ERGEBNISSE.

Nachdem im Vorhergehenden die verschiedenen Ergebnisse zusammengefaszt wurden, erscheint es jetzt angebracht, die gesamten Daten im Zusammenhang mit einander zu betrachten und sie mit den Ergebnissen früherer Forscher zu vergleichen, um schliesslich eine

Anschauung über das Blausäureproblem zu geben, zu welcher die Resultate dieser Arbeit veranlassen.

Betrachten wir zuerst die physiologische Bedeutung der *Blausäure*.

Treub beobachtet einen fördernden Einflusz der Nitraten und der Kohlenhydrate auf den Blausäurebestand der Blätter und schlieszt daraus, dasz die Blausäure (nicht das Glukosid!) aus diesen zwei Körpern entstehe. Seine Hypothese, dasz die Blausäure ein Assimilationsprodukt des Stickstoffes, und zwar das erste erkennbare, sei, fußt auf diese Beobachtungen.

Es sei zuerst bemerkt, dasz Treub offenbar den anorganischen, zugeführten Stickstoff mit Nitraten gleichstellt. Wir finden doch nirgends Ammonverbindungen berücksichtigt, welche, wie Ravenna bei Keimversuchen mit Sorghum beobachtete, einen fördernden Einflusz auf die Blausäuremenge im Keimling haben können. Daneben hat Treub nie zu beweisen gesucht, dasz die Blausäure nicht ein Dissimilationsprodukt sei, und ebensowenig sind von ihm Versuche angestellt worden, welche zeigen, dasz die Blausäure nicht aus organischen Stickstoffverbindungen hervorgehen könne. Die Hypothese Treubs ist deshalb mit Rücksicht auf seine Versuchsergebnisse als prämatur zu bezeichnen. Dies bedeutet jedoch noch nicht, dasz die Hypothese unrichtig sei.

Aus unseren Blattversuchen geht hervor, dasz die Kohlenhydrate, vor allem die Glukose, zwar einen Einflusz haben, jedoch nur in dieser Hinsicht, dasz die Glukose notwendig für die Bildung des *Glukosides* ist und dasz die Blausäure in den Blättern infolge Anwesenheit anorganischen Stickstoffes nur zunimmt in dem Falle, wo die entstehende Blausäure Glukose zur Glukosidbildung findet. Es ist keineswegs ausgeschlossen, dasz bei der Bildung der Blausäure (oder des Cyanhydrins) gleichfalls Glukose in Reaktion tritt; dieser Fragepunkt wird jedoch nicht durch die Ver-

suche, und auch nicht durch die ähnlichen Versuche Treubs, bewiesen, sogar nicht wahrscheinlich gemacht.

Die Anwesenheit der Nitrate hat zwar zur Folge, dasz die Blausäuremenge in den Blättern ansteigt, jedoch ist dargetan worden, dasz auch die Anwesenheit organischer Stickstoffverbindungen eine Zunahme herbeiführen kann, und zwar in weit gröszerem Maße.

Es geht aus diesen Tatsachen hervor, dasz die Grundlage der Hypothese Treubs, näml. die Bildung der Blausäure aus Nitraten und Kohlenhydraten hinfällig wird.

Schreiten wir jetzt zur Hypothese an sich.

Wenn die Blausäure das erste, oder nur ein folgendes Assimilationsprodukt des Stickstoffes wäre, so müsse diese Verbindung fortwährend in die weitere Stickstoffassimilation aufgenommen werden. Bei den blausäureführenden Pflanzen wäre das Glukosid als eine vorläufige Speicherung der Blausäure zu bezeichnen, während bei den anderen Pflanzen die HCN sofort in die weitere Eiweiszsynthese bezogen werde. Wenn wir dann aber Versuche anstellen mit abgeschnittenen Blättern, wo kein, oder nur anfänglich, anorganischer Stickstoff zur Verfügung steht, so müsste die Blausäuremenge abnehmen.

Im Dunkeln ist das tatsächlich der Fall. Wie aber aus den Versuchen hervorgeht, ist die Abnahme der Blausäure hier wahrscheinlich nicht der Aufnahme in den Eiweiszstoffwechsel, sondern vielmehr der Spaltung des Glukosides infolge Kohlenhydratmangels zu verdanken. Wenn wir letzterer Spaltung vorbeugen, indem den Blättern Glukose dargereicht wird, so bleibt die Blausäuremenge beim Kirschchlorbeer konstant und nimmt bei Phaseolus anfänglich zu, um weiter gleichfalls konstant zu bleiben.

Hier wird also dargetan, dasz der Blausäure keine wichtige Rolle in der Stickstoffassimilation zukommt, sonst hätte bei diesen Versuchen eine Abnahme der HCN auftreten müssen.

Man könnte anführen, die Lichtreaktion sei notwendig

für die Umwandlung der Blausäure in Eiweiszbausteinen, obwohl wir heute wissen, dasz die Eiweiszsynthese auch im Dunkeln vor sich gehen kann. Bei Kirschchlorbeerblättern, welche ans Licht gestellt worden sind, beobachten wir jedoch eine Zunahme des Eiweizes *und* der Blausäure, obwohl nur eine zu vernachlässigende Spur anorganischen Stickstoffes zugeführt wird.

*Diese Versuche berechtigen zu der Schluszfolgerung, dasz die Blausäure nicht das erste, sogar nicht ein folgendes, Assimilationsprodukt des Stickstoffes ist, und dasz demgemäß die Hypothese Treubs unrichtig ist.*

Wie müssen wir uns dann die Bildung und die Funktion der Blausäure erklären?

Die grosse Zunahme der Blausäuremenge in den Blättern, welche bei Asparagin-glukoseversuchen auftritt, weist auf eine Bildung der Blausäure aus *organischen* Stickstoffverbindungen hin.

Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der eben erwähnten Kirschchlorbeerversuche im Lichte gestützt. Wenn hier beobachtet wird, dasz, obwohl kein anorganischer Stickstoff zur Verfügung steht, die Blausäuremenge und die Eiweiszmenge beide ansteigen, so geht daraus hervor, dasz die Blausäure aus organischen Stickstoffverbindungen gebildet werden muss.

Jetzt taucht die Frage auf, ob die Blausäure bei dissimilatorischen oder bei assimilatorischen Prozessen gebildet wird.

Wie schon bei der Besprechung der Resultate der Keimungsversuche hervorgehoben wurde, ist schwer darüber zu entscheiden, ob die HCN bei der Dissimilation der Eiweisse oder bei deren Regeneration entsteht.

Ebenso kann die Blausäurezunahme in austreibenden Knospen einerseits der Dissimilation der mobilisierten Eiweisse, welche im Zweig enthalten sind, zugeschrieben werden, anderseits ist eine Bildung neben der Eiweiszsynthese möglich.

Die Ergebnisse der Blattversuche bieten mehr Anhaltpunkte. Die Glukoseversuche im Dunkeln zeigen, dasz die Blausäuremenge dabei konstant bleibt, eventuell nach einer anfänglichen Zunahme (*Phaseolus lunatus*). Wenn die Blausäure hier ein Dissimilationsprodukt wäre, so hätte man erwarten können, dasz die HCN-Menge nicht konstant geblieben wäre, sondern weiter zugenommen hätte, da einerseits Eiweiszdissimilation aufgetreten ist (s. die bezüglichen Tabellen), anderseits Glukose anwesend ist, um etwaige entstandene Blausäure als Glukosid zu speichern. Man könnte anführen, dasz eine solche Zunahme nicht beobachtet wird, infolge weiterer Unwandlung der Blausäure. Es wäre dann aber als ganz zufällig zu bezeichnen, dasz dabei die Bildung und die Umwandlung der Blausäure dieselben Werte erreichen.

Diese Verhältnisse reden zugunsten der Anschauung, dasz die HCN in den Blättern von der Eiweiszsynthese abhängig ist. Auch die Beobachtungen, dasz nach intensiver Beleuchtung die Blausäuremenge in den Blättern beträchtlich gröszer ist als während dauernd schlechtes Wetters und dasz auch in abgeschnittenen Blättern am Licht Zunahme erfolgt, wären vielmehr als Stützen für diese Anschauung zu deuten, als für eine, welche die Blausäure als Dissimilationsprodukt bezeichnet.

Die Verhältnisse lassen sich so erklären, dasz die Blausäure als Nebenprodukt des Eiweiszstoffwechsels, vielleicht der Eiweiszsynthese, aus organischen Stickstoffverbindungen entstehe. Als Muttersubstanzen kommen dabei Aminosäuren oder schon höher organisierte N-Verbindungen in Betracht.

Es sind wahrscheinlich ganz bestimmte Eiweisze, vielleicht auch bestimmte N-Verbindungen, welche zur Blausäurebildung veranlassen. In dieser Weise wird ebenfalls das Fehlen der HCN in der groszen Mehrzahl der Planzen erklärlich.

Die Frage, ob aus den organischen N-Verbindungen die Blausäure oder das bezügliche Cyanhydrin gebildet wird, muss offen gelassen werden, obwohl eine sofortige Bildung des Cyanhydrins *a priori* am wahrscheinlichsten ist.

Dagegen befriedigt nicht die Annahme Rosenthalers, dassz das Blausäureglukosid aus Aminosäuren entstehe. Es müsste sodann angenommen werden, dassz die Bildung des Glukosides unabhängig der Anwesenheit der Kohlenhydrate sei, welche Annahme schwerig mit den Resultaten unserer Glukoseversuche zu vereinbaren wäre.

Aus diesen und anderen Versuchen schlieszen wir dagegen, dassz die in irgendeiner Weise entstandene Blausäureverbindung, nur falls Kohlenhydrate zur Verfügung stehen, als Glukosid gespeichert wird.

Welche Bedeutung kommt jetzt diesem Glukoside zu?

Wenn beobachtet wird, dassz im Dunkeln die Blausäure erst aus den Blättern schwindet, nachdem die Stärke verschwunden ist, und dasz die Abnahme nicht stattfindet, wenn den Blättern Glukose dargereicht wird, so weisen diese Ergebnisse bestimmt darauf hin, dassz die Blausäureglukoside hier in erster Linie als Kohlenhydratreserven fungieren.

Diese Versuche zeigen überdies, dassz das Aglukon an sich nicht stabil ist. Wenn näm'l. keine Kohlenhydrate anwesend sind, so wird die Blausäure nicht gespeichert. Die Resultate der Blattversuche mit Nitraten und mit Asparagin, wo keine Glukose gegeben wurde, bilden eine Stütze für diese Anschauung. Die Anwesenheit lockergebundener Blausäure, wovon in einem vorhergehenden Abschnitt schon die Rede war, wird also in Anbetracht dieser Ergebnisse noch fraglicher.

Die nach fortgesetztem Etioment auftretende Abnahme der Blausäure in den Phaseolus-Keimlingen war der Funktion des Glukosides als Kohlenhydratreserve zu verdanken. Die HCN-Abnahme, welche in etiolierten Schöß-

lingen und Zweigen des Kirschlorbeers beobachtet wird, ist vielleicht auch auf diese Funktion zurückzuführen.

Daneben müssen wir annehmen, dasz die Blausäureglukoside ebenfalls einen Wert für den N-Stoffwechsel haben können. Dieser Wert scheint für die Blausäurepflanzen nicht immer derselbe zu sein.

Während bei den Dunkelversuchen mit den abgeschnittenen Blättern von *Prunus Laurocerasus* und von *Phaseolus lunatus*, wo die Glukoside primär als Kohlenhydratreserven fungieren, die Blausäure nur zum Teil aus den Blättern schwindet, wenigstens solange die Blätter nicht abzusterben anfangen, so verlieren die Blätter von *Pangium edule* im Dunkeln ihre Blausäure ganz, ohne Absterbungsscheinungen zu zeigen. Für *Pangium edule* ist eine Umwandlung, welche primär vom N-Stoffwechsel bedingt wird, recht gut anzunehmen.

Aber auch wenn die Glukoside bei den erstgenannten Pflanzen infolge Kohlenhydratmangels schwinden, wird vielleicht die Blausäure nach ihrer Umwandlung später wieder im N-Stoffwechsel benutzt.

Die Abnahme des Blausäureglukosides, also ebenfalls der Blausäure, wird in den eben erwähnten Fällen von den Versuchsbedingungen gefordert. Im normalen, am Licht wachsenden Blatt werden derartige weitgehende Dissimilationen wahrscheinlich nie auftreten. Und doch beobachten wir bei vielen Pflanzen, in den meisten Fällen einige Zeit nachdem die Blätter ausgewachsen sind, dasz die Blausäuremenge dieser Blätter abnimmt. Das gilt ebensosehr für unsere Versuchspflanzen *Phaseolus lunatus* und *Pangium edule*. Wir müssen hier also damit rechnen, entweder dasz die Blausäure aus den Blättern transportiert wird, oder dasz die Glukoside Umwandlungen unterliegen.

Dasz ein Transport der Blausäure stattfinden könne, wird von Treub auf Grund von Ringelungsversuchen an *Pangium* behauptet, weil oberhalb der Ringwunde eine

stärkere Blausäurereaktion gefunden wurde. Dieser Versuch ist jedoch nicht unzweideutig; die Blausäure kann ebensogut an Ort und Stelle gebildet worden sein.

Seiler nimmt gleichfalls einen Transport der Blausäure aus den Kirschchlorbeerblättern während der Nacht an; Verschaffelt und Rosenthaler bemerken bei demselben Objekt jedoch davon nichts.

Aus meinen Versuchen am Kirschchlorbeer geht hervor, dasz während der Nacht kein Transport der Blausäure aufgetreten ist. Die Austreibungsversuche wiesen ebenfalls auf die Unwahrscheinlichkeit eines Transportes hin. Auch die Resultate der Keimungsversuche bilden eine Stütze dafür, dasz die Blausäure oder eine Verbindung, welche leicht HCN abspaltet, nicht transportiert wird.

Die Abnahme der Blausäure, welche in den ausgewachsenen Blättern von *Phaseolus lunatus* auftritt, ist also nicht einer Auswanderung der HCN, sondern vielmehr einer Umwandlung des Glukosides zuzuschreiben.\*)

Die Tatsache, dasz *Sorghum vulgare* fast blausäurefrei wird im Stadium, dasz die Pflanze zur Samenbildung schreitet, ist in derselben Weise zu deuten.

Man muss in diesen Fällen annehmen, dasz die dabei entstehenden Umwandlungsprodukte wieder im N-Stoffwechsel benutzt werden können.

Im normalen Kirschchlorbeerblatt bemerkt man zuerst jedoch nichts von einer derartigen Umwandlung der Blausäure. Das ausgewachsene Blatt weist nur geringe Schwankungen in der Blausäuremenge auf und die HCN scheint sich hier wie ein Abfallprodukt zu benehmen.

Das wird aber anders, wenn die Blätter zu vergilben anfangen. Dabei verschwindet die Blausäure ganz in weitaus den meisten Fällen. Auch hier wird die Blausäure

\*) Der Blattstiell des *Phaseolusblattes* enthält übrigens nur spurenweise Blausäure.

vielleicht nach ihrer Umwandlung in die Pflanze befördert und weiter im N-Stoffwechsel benutzt.

Es gibt aber wieder Ausnahmefälle. In den abgefallenen Blättern von *Indigofera galegooides* fand Treub<sup>53)</sup> noch beträchtliche HCN-Mengen; dasselbe wurde von Guignard<sup>23)</sup> für *Sambucus nigra* beobachtet.

Aus dem Angeführten erhellt, dasz den Blausäureglukosiden ebenfalls ein Wert als Stickstoffreserve beizumessen ist, dasz aber dieser Wert für die verschiedenen Blausäurepflanzen Variationen aufzuweisen scheint.

#### SCHLUSZFOLGERUNGEN.

1. Die Blausäure ist nicht das erste erkennbare Assimulationsprodukt des Stickstoffs.

Die Hypothese Treubs ist demgemäß unrichtig.

2. Die Blausäure oder das bezügliche Cyanhydrin ist ein Nebenprodukt des Eiweiszstoffwechsels, vielleicht der Eiweiszsynthese, und erfüllt keine wichtige Rolle im N-Stoffwechsel.

Die Blausäure entsteht aus organischen Stickstoffverbindungen.

3. Das Vorkommen nichtglukosidischer Blausäure in der Pflanze ist unwahrscheinlich.
4. Ein Transport der Blausäure, des Cyanhydrins oder des Blausäureglukosides findet nicht statt.
5. Die Blausäureglukoside können jedenfalls als Kohlenhydratreserven auftreten.

Wenn ein Konsum aus diesem Grunde stattfindet, so wird die Blausäure umgewandelt und kann vielleicht wieder im Stickstoffstoffwechsel benutzt werden.

6. Bei *Pangium edule* scheint das Blatt selbst aus der von ihm produzierten Blausäure einen Nutzen zu ziehen; bei *Prunus Laurocerasus* erscheint die Blausäure für das produzierende Blatt unnütz.

Wenn die Blätter vergilben, wird in den meisten

Fällen jedoch die Blausäure umgewandelt und vielleicht in der Pflanze wieder im Stickstoffstoffwechsel benutzt.

Deshalb kommt den Blausäureglukosiden wahrscheinlich ebenfalls einen Wert als Stickstoffreserve zu; dieser scheint jedoch nicht für alle Blausäurepflanzen derselbe zu sein.

Diese Arbeit wurde ausgeführt im pflanzenphysiologischen Institut der Universität Amsterdam. Ich möchte nicht unterlassen, dem Direktor, Herrn Prof. Dr. Th. Weevers, für sein stetes Interesse und seine wertvollen Ratschläge meinen herzlichen Dank auszusprechen.

## LITERATUR.

1. Bishop, L. R. Estimation of cyanogenetic glukosides. Biochem. Journ., 21, II, 1927.
2. Bourquelot et Danjou. Sambunigrine. Soc. Biol. 59, 1905.
3. Brunswik, H. Der Mikrochemische Nachweis pflanzlicher Blausäureverbindungen. Sitz. Ber. Ak. Wiss. Wien, Bd 130, 1921.
4. Clawson, B. J. and C. C. Young. J. Biol. Chem., 15, 1913.
5. Couperot, E. V. Recherches sur la présence des azotates dans les plantes médicinales et alimentaires, et, en particulier, dans les plantes, renfermant des Glukosides cyanhydriques. Thèse Paris, 1913.
6. Czapek, F. Biochemie der Pflanzen. IIe Aufl., Gustav Fischer, Jena.
7. Dezani, Serafino. La trasformazione dell' acido cianidrico ad opera dei succhi delle piante. Biochimica e Terapia sperimentale, vol. X. (Zitiert nach Demselben, Arch. di Fis., 25, 1927).
8. Derselbe. Sull' utilizzazione delle cianidrine e dei loro prodotti di saponificazione per parte delle piante. Archiv. di Fisiologia, 25, 1927.
9. Dunstan, W. R. and T. A. Henry. The nature and the origin of the poison of *Lotus arabicus*. Proc. R. Soc. London, Vol. 67, 1901.
10. Dieselben. The nature and the origin of the poison of *Lotus arabicus*. Proc. R. Soc. London, Vol. 68, 1901.
11. Dieselben. Cyanogenesis in Plants, II. The Great Millet, *Sorghum vulgare*. Proc. R. Soc. London, Vol. 70, 1902.
12. Dieselben. Cyanogenesis in Plants, III. On Phaseolunatin, the cyanogenetic Glukoside of *Phaseolus lunatus*. Proc. R. Soc. London, Vol. 72, 1904.
13. Dieselben. Rep. Brit. Ass. Adv. Sci. York, 1906.
14. Dunstan, W. R., T. A. Henry, and S. J. M. Auld. Cyanogenesis in Plants, IV. The occurrence of Phaseolunatin in Common Flax. Proc. R. Soc. London, Ser. B, Vol. 78, 1906.
15. Dieselben. Cyanogenesis in Plants, V. The occurrence of Phaseolunatin in Cassava. Proc. R. Soc. London, Ser. B, Vol. 78, 1906.

16. Dieselben. Cyanogenesis in Plants, VI. On Phaseolunatin and the associated Enzymes in Flax, Cassava and the Lima Bean. Proc. R. Soc. London, Ser. B, Vol. 79, 1907.
17. Emerson, H. W., H. P. Cady and E. H. S. Bailey. J. Biol. Chem. 15, 1913.
18. Godwin, H. and L. R. Bishop. The Behaviour of the cyano-genetic glukosides of cherry laurel during starvation. The New Phytologist, XXVI, 1927.
19. Gouwentak, C. A. Untersuchungen über den N.-Stoffwechsel bei Helianthus annuus L. Rec. Trav. bot. néerl., XXVI, 1929.
20. Greshoff, M. Sur la distribution de l'acide cyanhydrique dans le règne végétal. Bull. Sc. Pharmacol. 1906, Nr. 11.
21. Guignard, L. Sur l' existence, dans le Sureau noir, d'un composé fournissant de l'acide cyanhydrique. C. Rend. Paris, T 141, 1905.
22. Derselbe. Sur l'existence, dans certains groseilliers, d'un composé, fournissant de l'acide cyanhydrique. C. Rend. Paris, T 141, 1905.
23. Derselbe. Nouvelles observations sur la formation et les variations quantitatives du principe cyanhydrique du Sureau noir. C. Rend. Paris, T 141, 1905.
24. Derselbe. Sur la métamorphose des glukosides cyanhydriques pendant la germination. C. Rend. Paris, T 147, 1908.
25. Hérissey, H. Arch. d. Pharm. 245, 1907.
26. Derselbe. Journ. Pharm. et Chim. 26, 1907.
27. de Jong, A. W. K. Quelques remarques sur les plantes cyanogènes. Ann. Buitenzorg. XXII, 1908.
28. Jorissen, A. Recherches sur la germination des graines de lin et des amandes douces. Bull. Ac. R. Belg., 3e Série, Vol. 7, 1884.
29. Jorissen, A. et E. Hairs. Sur un nouveau glukoside azoté retiré du Linum usitatissimum. Bull. Ac. R. Belg., 3e Série, Vol. 14, 1887.
30. Dieselben. Nouveau glukoside, fournissant de l'acide cyanhydrique par dédoublement, et retiré du Linum usitatissimum. Bull. Ac. R. Belg., 3e Série, Vol. 21, 1891.
31. Keulemans, M. C. Die Produkte der Kohlensäureassimilation bei Tropaeolum majus. Rec. Trav. bot. néerl., XXV, 1928.
32. Lehmann, E. Vorkommen und Verbreitung des Amygdalins und Laurocerasins in den Drupaceen und Pomaceen und über die Spaltung und Umwandlung dieser Glukoside im Pflanzenorganismus. Pharm. Ztng. f. Ruszland, 1885.

33. Oppenheimer, C. Die Fermente. Vogel, Leipzig, 1913.
34. Peche, K. Mikrochemischer Nachweis der Cyanwasserstoffsäure in Prunus Laurocerasus. Sitz. Ber. Ak. Wiss. Wien, Math.-N. W. Kl., Abt. I, Bd CXXI, 1912.
35. de Plato. Ann. Staz. Sper. Agr. Roma. (2), 4, 117, 1910 (zitiert nach Czapek).
36. Power, F. B. and F. H. Lees. Trans. Chem. Soc. 87, 1905.
37. Ravenna, C. e A. Peli. L'acido cianidrico e l'assimilazione dell' azoto nelle piante verdi. Gazz. chim. ital., 37, 1907.
38. Derselbe e M. Zamorani. Nuove ricerche sulla funzione fisiologica dell' acido cianidrico nel Sorghum vulgare. Rend. Accad. Linc. Roma, 1909, II.
39. Dieselben. Sulla formazione dell' acido cianidrico nella germinazione dei semi. Rend. Accad. Linc. Roma, 1910, II.
40. Ravenna, C. e C. Vecchi. Sulla formazione dell' acido cianidrico nella germinazione dei semi. Rend. Accad. Linc. Roma, 1911, II.
41. Derselbe e G. Bosinelli. Sulla azione di alcune sostanze aromatiche nella cianogenesi delle piante. Rend. Accad. Linc. Roma, 1912, II.
42. Derselbe. Sulla formazione dell' acido cianidrico nella germinazione dei semi. Rend. Accad. Linc. Roma, 1914, II.
43. van Rijn, J. J. L. Die Glukoside. 2e Aufl., Borntraeger, Berlin, 1931.
44. Robiquet et Boutron-Chalard. Ann. Chim. et Phys. 44, 1830.
45. Roe, J. R. The estimation of the hydrogencyanidecontent of amygdalin by the aerationmethod. J. Biol. Chem. 58, 1924.
46. Rosenthaler, L. Zur Prüfung der Treubschen Hypothese I. Biochem. Zeitschr. 1923.
47. Derselbe. Zur Prüfung der Treubschen Hypothese II. Biochem. Zeitschr., 1927.
48. Seiler, K. Beiträge zur Blausäurefrage. Diss. Bern 1922. Ref. Jahrb. Phil. Fak. Bern, 1922, Bd II.
49. Soave. Nuove giorn. botan. ital., VI, 1899. Ref. Apoth. Ztng, 1900.
50. Treadwell, F. P. Kurzes Lehrbuch der Analytischen chemie, Bd. II, 11e Aufl., Deuticke, Leipzig-Wien, 1923.
51. Treub, M. Sur la localisation, le transport et le rôle de l'acide cyanhydrique dans le Pangium edule, Reinw. Ann. Buitenzorg, XIII, 1896.
52. Derselbe. Nouvelles recherches sur le rôle de l'acide cyan-

- hydrique dans les plantes vertes. Ann. Buitenzorg, XIX, 1904.
53. Derselbe. Nouvelles recherches sur le rôle de l'acide cyanhydrique dans les plantes vertes, II. Ann. Buitenzorg, XXI, 1907.
  54. Derselbe. Nouvelles recherches sur le rôle de l'acide cyanhydrique dans les plantes vertes, III. Ann. Buitenzorg, XXIII, 1910.
  55. Tuma, E. Chem. Zentr. bl. 1893, I.
  56. van de Ven, A. J. Over het cyaanwaterstofzuur bij de Prunaceae. Diss. Amsterdam, 1898.
  57. Verschaffelt, E. Over het blauwzuur in de uitloopende knoppen bij Prunus. Versl. Kon. Akad. Wetensch. Wis- en Natk. Afd., 1902.
  58. Weevers, Th. Die physiologische Bedeutung einiger Glykoside. Jahrb. Wiss. Bot. 39, 1904.
  59. Derselbe. Die physiologische Bedeutung einiger Glykoside, II. Rec. des Trav. bot. néerl., VII, 1910.
  60. Wester, D. H. Phytochemische mededeelingen, I. Pharm. Weekbl., 1914.
  61. Wirth, P. H. Onderzoeken over Blauwzuur-Benzaldehyde-oplossingen in verband met laurierkerswater. Autoref. Pharm. Weekbl. 1911.
  62. Zynen Wartel, H. G. F. Phytochemische waarnemingen over Cyaanwaterstof. Diss. Amsterdam, 1906.