

ZUR PHYSIOLOGISCHEN
BEDEUTUNG DER BLAUSÄUREGLUKOSIDE
IM PFLANZENSTOFFWECHSEL

VON

N. J. STEKELENBURG.

INHALTSVERZEICHNIS.

I. ABSCHNITT.

Einleitung	299
------------------	-----

II. ABSCHNITT.

Ueber das Vorkommen der Blausäure in den Pflanzen.

§ 1. Die Blausäureglukoside und ihre Spaltungs- produkte.....	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 physio-
logische Bedeutung der Blausäureverbindungen.

§ 1. Die Blausäureverbindungen im Stickstoff- stoffwechsel 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</i> L.	337
B. <i>Prunus Amygdalus</i> Stokes 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</i> L.	345
B. <i>Prunus Laurocerasus</i> L. 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 andererseits, 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 Kirschlorbeer 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.

Peche 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 grosse 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 wurde, 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 grosse 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 blausäureführenden 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 ausserdem 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, daß 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 Kirschlorbeer arbeiteten, kamen zum Ergebnis, daß 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 größerem Maszstabe 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. ABSCHNITT.

ÜBER DAS VORKOMMEN DER BLAUSÄURE IN DEN PFLANZEN.

§. 1. Die Blausäureglukoside und ihre Spaltungs- produkte.

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 Greshoff²⁰⁾ 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.*

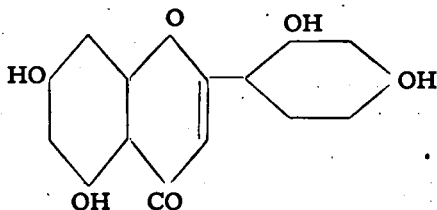
Ein richtigerer Namen wäre vielleicht Ketoncyanhydringlukoside. Hierzu gehören das Linamarin und das Gynocardin. Statt Benzaldehyd spalten sie ein Keton ab.

3. *Lotoflavincyanhydringlukoside.*

Das Aglukon ist mit den Flavonen verwandt. Das hier-

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

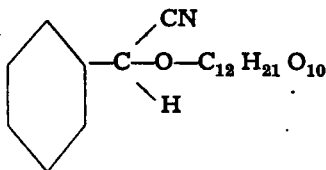
zugehörige Lotusin ^{9, 10)} spaltet neben 2 Mol. Glukose und 1 Mol. HCN, 1 Mol. Lotoflavin ab:



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 ⁴⁴⁾ in der Mandel entdeckte *Amygdalin* ist das älteste bekannte Blausäureglukosid. Emulsin spaltet das Glukosid auf in HCN, Benzaldehyd und 2 Mol. Glukose. Diese Spaltung geht in drei Etappen vor sich:



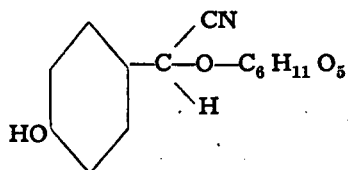
Zuerst wird das endständige Molekül Glukose abgespalten, sodann das zweite Zuckermolekül und schließlich wird das Oxynitril in Aldehyd und HCN zerlegt. Das Emulsin ist somit kein einheitliches Enzym; man ist im Stande eine Amygdalase-, eine Prunase- und eine Oxynitrilasewirkung daran zu unterscheiden, 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*,

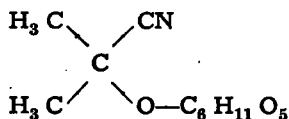
wird u.a. in *Prunus Padus* gefunden (Hérissey 1905).²⁶⁾

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

Das *Dhurrin*, (Dunstan und Henry 1902)¹¹⁾, $C_{14} H_{17} NO_7$, 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, $C_{10} H_{17} NO_6$, ist enthalten in Samen und Blättern von *Phaseolus lunatus*, der Rangoon- oder Kratokbohne. Das Glukosid wurde entdeckt von Dunstan und Henry (1903)¹²⁾; es hat sich als identisch gezeigt mit dem schon früher von Jorissen und Hairs (1891)³⁰⁾ 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 gespalten; das wirksame Enzym, die Phaseolunatase oder Linase, spaltet sie auf in Blausäure, Azeton und 1 Mol. Glukose:



Gynocardin, $C_{13} H_{19} NO_9$, ist das Blausäureglukosid des *Pangium edule* (de Jong 1908)²⁷⁾; es ist von Power und Lees³⁶⁾ entdeckt worden in *Gynocardia odorata* (1904). Es wird ebenfalls nicht von Emulsin gespalten.

Die Gynocardase spaltet das Glukosid in HCN, ein noch unbekanntes Diketon $C_8 H_8 O_4$ 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. Treub⁵²⁾ 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 unbeträchtliche Mengen Blausäure frei werden. Bei *Pangium* entstehen auf diese Weise erhebliche Mengen, weshalb Treub hier sogar *freie* Blausäure annimmt.

De Jong²⁷⁾ 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 Veröffentlichung⁵³⁾ versucht er, in Anlehnung an de Jong, die rasche Enzymwirkung zu beseitigen. Indem de Jong das Material bei einer niedrigen Temperatur (-10°) abtötet, nimmt Treub dieses vor in siedenden Salzlösungen, in welchen die Temperatur also bis weit über 100° 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 ⁵¹⁾:

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, daß die Dauer der Behandlung mit der Bürste die Intensität der Reaktion stark beeinflusst.

Ich möchte weiter an dieser Stelle betonen, daß die Blausäureprobe Treubs zu großen 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 Vergleichen ist sie unbrauchbar.

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

Peche ³⁴⁾ 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 Brunswick³⁾ später Kritik geübt. Dieser weist die Anwesenheit lockerer oder freier Blausäure durchaus von der Hand und ist der Meinung, dass die beim Abtöten der Zelle entstandene Blausäure von einer raschen enzymatischen Spaltung herrühre.

Bei meinen Untersuchungen hat sich ebenfalls ergeben, dass 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 $3.20 \text{ cm}^3 \frac{1}{100} \text{ n. Silberlösung}$. Die korrespondierenden Hälften in ganz gleicher Weise behandelt, lieferten ein Destillat, das mit 4.75 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 Abtötungsverfahren für das Enzym aus den erwähnten Gründen verzichten muss.

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 Pangiumsamen, 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, dass 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 Pangiumsamen unwahrscheinlich. Es ist zu erwarten, dass 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. A B S C H N I T T.

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 grösztenteils 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, dass die verschiedenen benutzten Methoden in dieser Hinsicht die meisten Variationen aufweisen.

Treub⁶²⁾, Ravenna³⁷⁾ und viele andere lassen die grob zerkleinerten Blätter mehrere Stunden in Wasser mazerieren, bevor diese der Destillation unterzogen werden. Die Forscher haben offenbar geglaubt, dass bei der Mazeration, auf diese Weise vorgenommen, alles Glukosid gespalten wird. Diese Annahme muss 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, dass dieses Verfahren grobe Fehler zufolge haben kann und dass die Blausäurewerte, welche Treub erhält und sogar genau auf 0.001 v.H. (des Frischgewichtes!) angibt, beträchtlich an Bedeutung einbüßen.

Eine andere Bestimmungsweise vertritt Rosenthaler⁴⁶⁾, der mit Kirschchlorbeerblättern arbeitet. Seine Methode, welche er für nur ein Blatt oder eine Hälfte anwendet, besteht darin, dass 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 noch eine merkliche Spaltung des Glukosides auf, sodass 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 Bishop¹⁾ 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, dass die Wasserstoffionenkonzentration hierauf einen grossen 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 muss 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 Blatthälfte sein muss.

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

Zum Beleg diene folgendes:

Eine normale Blatthälfte des Kirschlorbeers 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 cm³ Silberlösung 1/100 n. titriert werden. Wie ich später zeigen werde, ist eine Angabe der Titrierzahlen genauer als auf 0.10 cm³ unzulässig. Schon infolge der Titrierfehler wird also keine grössere Genauigkeit als 4 bis 5 v.H. gewährleistet. Wenn noch andere, den Versuchsbedingungen entsprechenden Fehler hinzukommen, wird es klar, dass 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 Bishop¹⁾ benutzten Verfahren⁴⁵⁾ entgegenzubringen, da dieses ebenfalls für eine Blatthälfte empfohlen wird. Wenn wir diese Tatsache ausser 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 grosser Teil der glukosidischen Blausäure frei, welche mittels Luftdurchsägung in 30-prozentige Kalilauge geleitet wird. Nach Abkühlung und unter fortwährender Luftdurchführung 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, dass eine Zersetzung dabei auftritt, welche nicht zu vernachlässigen ist. Diese Zersetzung ist in erster Linie der Tatsache zuzuschreiben, dass bei der Erwärmung der Blätter im Wasserbade die unmittelbar hintergeschaltete Kalilauge von der durchgeführten Luft recht heizt wird.

Vielleicht wäre das Bishopsche Verfahren für eine grössere 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 grosse 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 Verschaffelt⁵⁷⁾ beschriebene Verfahren, ist offenbar wenig bekannt. Es stützt auf die Beobachtung, dass 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 eindringen und seine spaltende Wirkung auf das Glukosid ausüben.

Zwecks Herbeiführung einer völligen Spaltung, empfiehlt Verschaffelt für Kirschlorbeerblätter 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 schliesslich wird destilliert. Eine Blausäurebestimmung würde deshalb zwei Tage fordern. Bei meinen Versuchen ergab es sich jedoch, dass 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 Erlenmeyerkölbchen mit etwa 50 cm³ 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 cm³ 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 cm³ Flüssigkeit im Destillationskolben zurückbleibt. Man fängt auf in etwa 3 cm³ 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 cm³ Destillat 1 cm³ einer Jodkaliumlösung 20 % zugegeben, in den meisten Fällen also 3 cm³ 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 grosse Mengen Material fordern und nie ganz rein zu erhalten sind. Ueberdies gehen die Präparate rasch an Wirkung zurück, sodass 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 ⁶⁾ 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 Kirschlorbeerblättern destilliert, und der Rückstand mit Emulsin abermals mazeriert, so erfordert das zweite Destillat bei der Titration weniger als 0.10 cm³ 1/100 n. Silberlösung, ein Zeichen, dass 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, dass die zweite Mazeration bei der ursprünglichen Methode Verschaffelts überflüssig ist.

Nur bei Zweigen und Samen beobachtet man in einigen Fällen eine unvollkommene Spaltung des Glukosides, offenbar infolge des grösseren 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^{7,8)} gibt an, im Pflanzensaft werde die Blausäure an Glukose gebunden und sodann verseift, sodass schliesslich Ammoniak entstehe. Es ist klar, dass eine derartige Umwandlung die obige Mazerationmethode völlig unbrauchbar machen würde. Ich habe mich deshalb zuvor bemüht nachzuforschen, ob und in welchem Masse diese Umwandlung stattfindet.

Zunächst ergibt sich, dass eine Reaktion zwischen Glukose und HCN in den, den Versuchsbedingungen entsprechenden Verdünnungen nicht auftritt. Es wurde für eine auf 300 cm³ 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 cm³ Silberlösung 1/100 n., während die direkte Titration der HCN-Lösung 22.35 und 22.35 cm³ Silberlösung erfordert.

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

50 Kirschchlorbeerblätter werden mit 250 cm³ Wasser auf 60° erwärmt, und sodann 3 Stunden stehen gelassen. 100 cm³ des Mazerats werden verdünnt auf 300 cm³ und destilliert; Titration 10.45 cm³ Silberlösung. Ein gleiches Volum des Mazerats wird verdünnt auf 275 cm³, zugegeben wird 100 mg Glukose und 25 cm³ einer HCN-Lösung, die übereinstimmen mit 21.50 cm³ Silberlösung. Dieses Gemisch wird 20 Stunden stehen gelassen, und sodann destilliert; Titration 31.80 cm³ Silberlösung, was für die zugegebene HCN eine Menge von 21.35 cm³ 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 Zersetzungen auftreten.

Schliesslich muss 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_H-Grenzen eine genügend grosse Wirksamkeit. Das Optimum liegt aber immer unterhalb p_H = 7; es ist deshalb darauf zu achten, dass 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 Pflanzensäften 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 Amygdalinspaltung dargetan worden ist. Dieses Gleichgewicht wird für Benzaldehydcyanhydrin in rein wässriger Lösung bei 75 v.H. Nitril gefunden (Wirth).⁶¹⁾

Bei der Destillation wird die freie Blausäure abgeführt; das Gleichgewicht, welches überdies bei höherer Temperatur günstiger für die freie Säure wird, musz wieder hergestellt werden, sodasz schliesslich alle HCN abdestilliert. Dazu ist ein ziemlich weites Einkochen erforderlich; es wurde deshalb destilliert bis auf einen Rückstand von etwa 75 cm³, was reichlich genügt.

Es hat sich gezeigt, dasz schwaches Ansäuren vor der Destillation zwar nichts schadet, jedoch auch keine wesentlichen Vorteile bietet. Vorversuche belehrten, dasz die Blausäure aus dem, an sich schon sauer reagierenden Mazerat, quantitativ abdestilliert, sodasz 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 Jong²⁷⁾ gibt an, dieser Uebelstand bestehe nicht, wenn man mit wenig verdünnter Kalilauge alkalisiert und darauf am Siedepunkt schwach ansäuert mit verdünnter Schwefelsäure. Die Lauge spaltet das Nitril auf und der geringe Säureüberschusz 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 eiweisreichen Samen der Fall ist.

Die Erhitzung wurde vorgenommen auf elektrischen, im hiesigen Laboratorium angefertigten Kochplatten, und zwar so, dass 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 Treadwell⁵⁰⁾ 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, dass eine genaue Titration unmöglich ist. Die Trübung lässt sich nur zum Teil durch Alkohol beseitigen.

Es wurde eine gewöhnliche, 50 cm³ fassende Bürette benutzt; diese gestattet noch 0.02 cm³ abzuschätzen. Die erforderliche Menge Silberlösung zur deutlichen Erkennung einer Trübung beträgt 0.08 bis 0.10 cm³; 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 grösser, im Mittel um 0.05 cm³. 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^3 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^3 Silberlösung $1/100 \text{ n.}$ 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^3 Silberlösung $1/100 \text{ n.}$ 0.54 mg Blausäure an. Die Ergebnisse sind auf 0.05 cm^3 abgerundet worden.

§ 3. Die Eiweiszbestimmung.

Diese wird vorgenommen im Destillationsrückstand der Blausäurebestimmung. Bedingung für diese Masznahme 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 Eiweis-

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. Gouwentak¹⁹⁾ dargetan hat, gestatten überdies die Versuchsbedingungen und die Bestimmungsweise des Eiweisses 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 cm³ 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 cm³ 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. ABSCHNITT.

BEOBSACHTUNGEN FRÜHERER AUTOREN ÜBER DIE PHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER BLAUSÄUREVERBINDUNGEN.

Ueberblicken wir die betreffende Literatur, so erfahren wir, dass diese sich zweckmässig in zwei gesonderten Teilen besprechen lässt. Die Ursache für diese Masznahme ist darin enthalten, dass 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 Treub⁵¹⁻⁵⁴) gewesen, der auf Grund seiner zahlreichen Arbeiten an blausäureführenden Pflanzen, der

Blausäure eine wichtige Funktion im Stickstoffstoffwechsel beizumasz, 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.⁵¹⁾ stützen alle auf die qualitative Berliner Blauprobe. Wie ich in einem vorhergehenden Abschnitt dargetan habe, ist diese Probe für Vergleichen des Blausäurebestandes ungeeignet, und büßen deshalb die damit erhaltenen Resultate beträchtlich an Bedeutung ein.

Traub 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 Traub als einen Beweis dafür, dasz die Blausäure nicht als Dissimilationsprodukt 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 Traub Blausäure und

Eiweisz in *einer* Zelle mittels Farbenreaktionen nachweisen musste.

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 CO₂-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 reine 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, dass sich in den oberirdischen Teilen des *Pangium* kein Nitrat vorfindet. Treub glaubt diese Verhältnisse so erklären zu müssen, dass 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 musz vielmehr angenommen werden, dasz 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 musz, so ist den Untersuchungen Treubs an *Phaseolus lunatus*⁵²⁾ ein weit grözzerer 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 blausäurereicher als nach einer sonnenarmeren 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. Regelmäszige 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, dass 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, dass die primordialen Blätter des *Phaseolus lunatus* grosse 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 muss jedenfalls bemerkt werden, dass 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 Quantitativität der Methode in Abrede stellen (s. III. Abschnitt). Sodann betrachten wir heutzutage eine Beziehung der Resultate auf Frischgewicht als unzulässig¹⁹⁾ und dieser Einwand trifft um so mehr zu, weil die jungen Blätter oder Blatthälften während des Versuches dauernd

wachsen. Es ist klar, dass die unter diesen Bedingungen erzielten Ergebnisse zu irrigen Schlussfolgerungen führen können.

Wenn Treub in seiner Hypothese die Blausäure als das erste erkennbare Assimilationsprodukt des Stickstoffes betrachtet, so geht daraus sofort hervor, dass 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 Greshoff²⁰⁾ 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, dass die Blausäure hier sofort nach ihrer Entstehung verarbeitet werde.

Einige Forscher, wie Brunswik³⁾, Seiler⁴⁸⁾, Rosenthaler⁴⁶⁾ u.a. waren der Meinung, dass in diesem Fall in jeder Pflanze, wenn nur eine genügend grosse 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, dass 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 befassten, erwähnen wir

Van de Ven⁵⁶⁾. 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.

Verschaffelt⁵⁷⁾ stellt Dunkelversuche an mit Blatthälften 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 Wartel⁶²⁾ 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.

Greshoff²⁰⁾, der den Blausäureuntersuchungen Treubs den ersten Anstosz 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 Henry¹³⁾ treten ebenfalls den Treubschen Ansichten bei, gleichwie Ravenna und seine Mitarbeiter.

Ravenna und Peli³⁷⁾ stellen mit *Sorghum vulgare*

ähnliche Versuche an wie Treub mit *Phaseolus lunatus*. Diese Forscher beobachten 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 Eiweiss-synthese des Sorghum.

Von Ravenna und Zamorani³⁸⁾ 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 grözeres 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 Bosinelli⁴¹⁾ suchen den Blausäurebestand zu beeinflussen durch Einverleibung von aromatischen Stoffen wie Benzoesäure, 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, dass die normalen Vorgänge in der Pflanze infolge einer Einverleibung der genannten Stoffe in festem Zustande und relativ grossen Dosen ernstlich gestört werden müssen.

Peche³⁴⁾ 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, dass im Palissadengewebe die Blausäure nicht im Zellsaft, sondern im Plasma vorliegt und dass die Chlorophyllkörner immer die stärkste Reaktion aufweisen.

Peche ist hinsichtlich dieses Befundes der Meinung, dass 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 Schwammparenchyms, wo sie zum Teil als Glukosid gespeichert, zum Teil zur Eiweissynthese benutzt werden dürfte. Er schlieszt auf einen Transport aus den Blättern nach dem Phloem der Zweige, anlässlich des Befundes, dass nach sonnigen Tagen eine stärkere HCN-Reaktion im Phloem auftritt.

Peche betont, dass 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, dass 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 Blausäureverbindung in den Blättern durchaus nicht bewiesen.

Couperot⁵⁾ prüft viele blausäureführenden Pflanzen auf Nitrate und kommt dabei zum Ergebnis, dass diese

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

Seiler⁴⁸⁾ verwendet als Versuchspflanze *Prunus Laurocerasus*. Er beobachtet eine tägliche Schwankung des Blausäuregehaltes; abends ist dieser Gehalt am grössten. Aus dem Befund, dass während der Nacht eine Abnahme stattfindet, schlieszt er auf einen Transport der Blausäure durch die Nerven. Dieser Annahme wäre es ebenfalls zu verdanken, dass keine regelmässige Beziehung zwischen Blausäure-N und Eiweisz-N in den Blättern entdeckt werden konnte.

Weiter findet Seiler, dass 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^{46,47)} 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, dass die HCN in Sorghum ein Abbauprodukt sei und dass Dhurrin — das bezügliche Glukosid — aus Tyrosin entstehe. Zweifels-ohne ist die angeführte Probe von groszer Wichtigkeit; es empfiehlt sich aber diesen Versuch aufs neue in grösserem Maszstabe 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, dass die Blausäureglukoside gebildet werden aus dem Uebermasz der zu jeder Zeit zur Eiweissynthese benötigten Aminosäuren. Die Glukoside dürften späterhin irgendwo für Synthesen benutzt werden.

Dem Einfluss der Kohlenhydrate auf die Blausäurebildung sucht er nachzuforschen im zweiten Teil seiner Arbeit ⁴⁷⁾. 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.

Schliesslich stellt Rosenthaler noch Düngungsversuche mit *Sambucus nigra* an, bei welchen Versuchen an den Böden verschiedene Aminosäuren zugegeben werden. Die Pflanzen sind grösser und kräftiger und blausäurereicher als die Kontrollpflanzen. Diese Versuche zeigen meiner Meinung nach lediglich, dass Stickstoffdüngung einen fördernden Einfluss auf den Blausäuregehalt hat, eine Tatsache, welche schon früher, z.B. von Wester ⁶⁰⁾ 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 Einfluss des Lichtes, also ebenfalls der Kohlenhydrate, auf die Blausäurebildung nichts bemerken können und er verwirft auch aus diesem

Grunde 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.

Tuma⁵⁶⁾, u.a. fanden, dasz beim Austreiben die Blausäuremenge in den Knospen beträchtlich ansteigt.

Verschaffelt⁵⁷⁾ 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.

Rosenthaler⁴⁷⁾ konstatiert eine starke Zunahme der Blausäuremenge in den Knospen des Kirschlorbeers; 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 herrühren dürfte.

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

Jorissen²⁸⁾ beobachtet bei der Keimung von *Linum usitatissimum* eine Zunahme der Blausäure von 2 mg zu 4 mg pro 25 g Samen.

Lehmann³²⁾ findet bei der Keimung von *Sorbus aucuparia* eine Abnahme, und zwar derart, dass 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.

Saave⁴⁹⁾ konstatiert, dass in süszen Mandeln, welche im ungekeimten Zustande keine oder auszerordentlich wenig Blausäure enthalten, bei der Keimung HCN auftritt.

de Plato³⁵⁾ findet, dass beim Reifungsprozess dagegen die Blausäuremenge in den süszen Mandeln abnimmt und zunimmt in der bitteren Varietät.

Frl. Zynen Wartel⁶²⁾ beobachtet bei der Keimung von Leinsamen eine Zunahme der Blausäure von 1.5 mg zu 24 mg pro 20 g Samen.

Guignard²⁴⁾ kommt bei der Dunkelkeimung von *Phaseolus lunatus* zum Ergebnis, dass die Blausäuremenge im Keimling eine Abnahme von etwa 25 v.H. zeigt und dass 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^{39, 40, 42)} beobachten bei der Dunkelkeimung der Samen von *Linum usitatissimum*, *Sorghum vulgare* und *Phaseolus lunatus*, dass 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, dass die HCN bei der Keimung aus Ammonverbindungen hervorgehen kann.

V. ABSCHNITT.

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 Aufschluss 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 Guignard²⁴⁾ beobachtete, gehören die Samen des *Phaseolus lunatus*, auch Kratokbohnen genannt, offenbar verschiedenen Varietäten an; ich bekam jedenfalls ein Gemisch, zusammengesetzt aus weissen, gelben, braunen, roten, schwarzen und in verschiedenen Farben gefleckten Bohnen, deren Grösze überdies noch ziemlich stark wechselte.

Der Blausäuregehalt wechselt ebenfalls; die weisse 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 „Kolonial Institut“, Amsterdam. Ich möchte nicht unterlassen, dem Direktor der Abteilung „Handelsmuseum“, 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 bezüglichlichen 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 Masznahme sind wir im Stande die Ergebnisse pro Samen oder pro Anzahl Samen zu berechnen, vorausgesetzt, dasz die bei jedem Versuch verwendete Anzahl genügend grosz 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 Saattöpfe zu keimen gelegt und mittels eines schwarzen Tuches vor Lichteinflüssen geschützt.

TABELLE 1 *).

Phaseolus lunatus L. Keimung im Dunkeln.
Blausäure in cm³ AgNO₃ 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, dass die eingetragenen cm³ Silberlösung 1/100 n. von der Liebigschen Titration herrühren. Jede cm³ 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, dass 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 ± 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, sodass von einer völligen Erschöpfung nicht die Rede war.

TABELLE 2.

Prunus Amygdalus Stokes var. *amara*. Keimung im Dunkeln.
Blausäure in cm³ AgNO₃ 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, dass bei fortgesetzter Dunkelkeimung der bitteren Mandeln die Blausäuremenge ebenfalls abnehmen wird, näml. sobald die Reserven der Kotyledonen erschöpft sind. Dafür wäre eine grosse Menge Material erforderlich, weil beim Fortschreiten der Keimung eine immer grösserwerdende Anzahl Keimlinge beseitigt werden muss, 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, dass 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 *Kohlenhydratreserve* 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^{58, 59}).

Die schliesslich auftretende Abnahme der Blausäure ist deshalb so zu erklären, dass 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. Ravenna⁴²) fand jedoch bei der Keimung von *Phaseolus lunatus* in ausgewaschenem Sand, dass 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 muss die HCN aus stickstoffhaltigen Substanzen des Samens stammen. Die Vermutung liegt also nahe, dass die Umwandlung des Eiweisses im keimenden Samen dabei eine Rolle spiele. Zwecks Gewinnung eines Einblickes in diesen Vorgang wurden Eiweis- 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.

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

b. Etiolierte Keimlinge

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

Aus der Tabelle geht hervor, dass 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 schliessen. Es ist aber mit Rücksicht auf die obengenannten Resultaten Ravennas recht wahrscheinlich, dass 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, dass die HCN bei der Mobilisierung der Eiweissze 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 müsste man sich aber darüber wundern, dass die Blausäuremenge in den Kotyledonen sich während der langen Versuchsdauer verhältnismässig 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, dass die in den Kotyledonen entstandenen Eiweiszabbauprodukte in die junge Pflanze wandern und dass aus diesen Produkten die Blausäurebildung an Ort und Stelle stattfindet. Die Frage, ob dabei die Blausäure bei dem weiteren Abbau der Stickstoffverbindungen oder hingegen bei der Regeneration der Eiweissze entsteht, muss 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, dass die Blausäuremenge in den Knospen von *Prunus Laurocerasus* (Ver-

schaffelt ⁵⁷⁾, Rosenthaler) ⁴⁷⁾ und *Prunus Padus* (Tuma) ⁵⁵⁾ beim Austreiben stark zunimmt; vom Verhalten der Blausäure im austreibenden Zweig selbst wissen wir fast nichts. Nur Verschaffelt gibt an, dass 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, dass 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, dass im Vorjahr die *Padus*sträucher gekappt worden waren. Eine ziemlich grosse 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 *Bezugsgrößen* bereiten hier einige Schwierigkeiten. Das Frischgewicht ist sowohl für die Knospen als für die Zweige unbrauchbar, da der Wassergehalt stark wechseln kann. Das Trockengewicht ist ebenfalls als Bezugsgrösze zu verwerfen, da dieses in hohem Grade von dem Ernährungszustand abhängt.

Pêche ³⁴⁾ hat die Lokalisation der Blausäure in *Prunus Laurocerasus* erforscht und gezeigt, dass 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 Bezugsgröße 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 äusserlicher Entwicklung. Selbstverständlich dürfen Zweige verschiedenen 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 Bezugsgröße wurde hier die Blausäuremenge pro Knospe, bzw. Trieb, gewählt.

Die *Bestimmung* der Blausäure wurde nach der beschriebenen Methode vorgenommen. Die Zweige wurden zweckmässig 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 Etiollements 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 Dunkelmzimmer 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 grösztenteils 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 cm³ AgNO₃ 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 Fußnoten S. 348.

TABELLE 5. *)

Prunus Padus L. Austreiben im Lichte.
 Abgeschnittene Zweige mit je 15 Knospen.
 Blausäure in cm³ AgNO₃ 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 cm³ AgNO₃ 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	0.18	18.4
		89	0.17	17.6
		90	0.19	17.6
		91	0.21	17.9
	Mittelwert		0.19 ± 0.01	17.9 ± 0.2
22-4	Blätter in der Entfaltung	103	0.40	17.0
	begriffen	104	0.40	18.2
		105	0.43	17.8
		106	0.47	16.8
		107	0.39	17.5
		108	0.50	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 grösser 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 $\text{cm}^3 \text{AgNO}_3$ 1/100 n.

Datum 1931		Num- mer	Knospen HCN pro Knospe	Zweige HCN pro g extrah. Bast
15-4	Vor dem Austreiben	115	0.08	8.9
		116		9.1
		117		9.3
		118	0.08	7.9
		119		7.6
		120	0.10	8.7
		121		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	0.15	8.4
	Mittelwert		0.14 ± 0.005	8.8 ± 0.3
4-5	Etioliert ausgetrieben	128	0.08	8.3
		129		7.7
		130	0.09	8.3
		131		7.6
		132	0.10	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 näml. vielleicht das Verhalten der Blausäure in Zweig und Knospen. (Tab. 8).

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

Von einem Einfluss dieser Blätter bemerkt man jedoch wenig. Die Knospen enthalten schliesslich 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 cm³ AgNO₃ 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		8.3
		47	} 0.08	7.9
		48		9.8
		49	} 0.12	7.8
		51		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		7.2
		63	} 0.02	6.9
		64		6.9
		65	} 0.02	6.6
		66		8.1
		67	} 0.04	6.3
		68		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, entblätternen Zweigen mit je
15 Knospen. Blausäure in cm^3 AgNO_3 1/100 n.

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

TABELLE 10.

Prunus Laurocerasus L. var. *Schipkaensis*. Austreiben im
Lichte von entblätternen Zweigen mit je 15 Knospen an
der Pflanze. Blausäure in cm^3 AgNO_3 1/100 n.

Datum 1931		Num- mer	Knospen HCN pro Knospe	Zweige HCN pro g extrah. Bast
15-4	Vor dem Austreiben	115	0.09 ± 0.005	8.7 ± 0.3
	Mittelwert	121		
8-5	Blättchen in der Entfal- tung begriffen	150	0.50	8.6
		151	0.46	9.5
		152		9.0
		153		7.8
		154	0.69	9.1
		155		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^3 AgNO_3 1/100 n.

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

immer eine Zunahme der Blausäuremenge, welche grözere 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 Einflusz 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 zusammengefasst 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 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	Etiollement 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
7-4	Austreiben im Lichte 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 entblätternen Zweigen.
Mittelwerte. Blausäure in cm^3 AgNO_3 1/100 n.

Datum 1931		Nummer	Knospen HCN pro Knospe	Zweige HCN pro g extrah. Bast
15-4	Vor dem Austreiben..	115	0.09 ± 0.05	8.7 ± 0.3
		—		
		121		
28-4	Etiolement 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
30-4	Austreiben im Lichte	138	0.22 ± 0	8.6 ± 0.2
		143		
8-5	Austreiben im Lichte an der Pflanze	150	0.55 ± 0.07	8.8 ± 0.25
		—		
		155		

TABELLE 14.

Prunus Laurocerasus L. var. *Schipkaensis*. Verhalten der Blausäure beim Austreiben von beblätternen Zweigen.
Mittelwerte. Blausäure in cm^3 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	Etiolement 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, dass am Ende der Etiolierungsversuche am Kirschlorbeer, die Blausäuremenge abnimmt.

Ist jetzt diese Abnahme dadurch bedingt, dass die Blausäure, nach Treub eine allgemeine Vorstufe des Eiweisses, weiter in den Eiweissstoffwechsel 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, dass, nachdem die anderen Stickstoffreserven erschöpft sind, der Blausäureschwund vom Stickstoffmangel bedingt wird; mit Rücksicht auf den Vorhergehenden, sind wir jedoch zur Schlussfolgerung berechtigt, dass 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, dass 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.

Dass die Blausäureabnahme nicht bei *Prunus Padus* beobachtet wird, mag wohl daher rühren, dass die längeren und dickeren Paduszweige (Gewicht ± 25 g) weit grössere Mengen Kohlenhydrate, und wahrscheinlich auch Stickstoffreserven, enthalten als die ziemlich kleinen und dünnen Kirschlorbeerzweige (Gewicht ± 8 g), während die Anzahl der Knospen für beide Objekte gleich ist, sodass am Ende

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

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

Wir treten aber Rosenthaler in seiner Anschauung bei, dass 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 Maszstabe gleichfalls in den Zweigen. Diese Zunahme ist unabhängig vom Lichte.
2. Nach einem längeren Etiolement von abgeschnittenen Kirschlorbeerzweigen 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 Kirschlorbeers 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 Kirschlorbeer; 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 Kirschlorbeer 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 Saattöpfe zu keimen gelegt. Die jungen Keimlinge wurden je in einen grossen Topf übergepflanzt, und im unerwärmten Gewächshaus weitergezüchtet, sodass 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 Pangiumsamens *), 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, dass die Früchte vielfach mehr

*) Die Pangiumsamens erhielt ich ebenfalls durch Vermittlung der Abteilung „Handelsmuseum“ des „Kolonial 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 grosser Teil schon in der Fäulnis begriffen. Von den 285 Samen dieser Sendung keimten im Tropenhaus 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, sodass schliesslich 9 Pflanzen übrig waren.

Die jungen Pangiumpflanzen trugen bald einige grossen drei- oder fünfblättrigen Blätter, welche eine Grösze von 20 cm und mehr erreichten. Die Blätter vergilbten leider rasch und fielen ab, sodass an einer einjährigen Pflanze nie mehr als 5 Blätter saßen. Treub gibt an, dass seine einjährigen Pangiumpflanzen bis 15 Blätter trugen. Zweifels- ohne spielen die klimatologischen Verhältnisse hier eine Rolle, denn im Winter wachsen hier die jungen Pflanzen im schwachen Sonnenlichte nur kümmerlich, während in den Tropen das Wachstum regelmässig fortschreitet.

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

Bezugsgrössen.

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 Frl. Gouwentak¹⁹⁾ 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 Kirschlorbeers sind genügend symmetrisch um diese Blatthälftenmethode zu gestatten.

Die Kirschlorbeerversuche 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)³¹⁾. 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^2 .

Hälften a.			Hälften b.	
	Oberfläche in cm^2	Blausäure in cm^3 Silberlösung	Oberfläche in cm^2	Blausäure in cm^3 Silberlösung
1	246.2	34.60	248.4	34.80
2	282.0	37.30	278.6	37.15
3	298.0	42.10	300.6	42.10
4	252.5	37.75	253.4	37.60

Aus diesen Werten geht hervor, dass 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^2 und sind keineswegs symmetrisch. Hier musste 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 regelmäszig. 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 cm².

<i>Blättchen a.</i>			<i>Blättchen b.</i>	
	<i>Oberfläche in cm²</i>	<i>Blausäure in cm³ Silberlösung</i>	<i>Oberfläche in cm²</i>	<i>Blausäure in cm³ Silberlösung</i>
1	134.5	13.35	135.1	13.30
2	117.4	12.35	116.0	12.25
3	114.8	10.80	112.6	10.80
4	132.8	12.65	132.0	12.50

Die Versuche.

Wie bereits erwähnt, sind die Versuche grösztenteils 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 Kirschlorbeer 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 Kirschlorbeer, 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 Blattfüsse 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 grössere 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 Kirschlorbeerblatt 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 cm³ AgNO₃ 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 cm³ AgNO₃ 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^3 AgNO_3 1/100 n. pro 25 Hälften.

Nr.	Versuchsdauer (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, dass 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 Kirschlorbeers, so nimmt immer die Blausäure ab, jedoch wechselt die Geschwindigkeit dieser Abnahme mit dem Alter der benutzten Blätter. (Tab. 18).

Ich möchte betonen, dass die fast ausgewachsenen Kirschlorbeerblätter nach 15 Tagen noch ganz frisch und grün aussehen, sodass 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 cm³ AgNO₃ 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	erschlaft
17		8	11.15	2.85	— 74	schlaft

Recht ausgeprägt werden die Differenzen, wenn man Blätter verwendet, welche noch im Wachstum begriffen sind. Es sei jedoch bemerkt, dass alle HCN nie schwindet. Die Blätter erschlaft 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 träten also als Stickstoffreserven auf. Die Annahme wäre mit der Hypothese

Treubs zu vereinbaren. Andererseits 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^3 1/100 n. AgNO_3 pro 25 Hälften.*)

Nr.	Versuchs- dauer (Tage)	Anfangswert	Versuch	Diff. %	Bemer- kungen
114	1	16.10	16.60	+ 3	stärkefrei
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 cm^3 AgNO_3 1/100 n. pro 25 Hälften.

Nr.	Versuchsdauer (Tage)	Anfangswert	Versuch	Diff. %	Bemerkungen
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, dass die Blausäureglukoside hier primär als Kohlenhydratreserve auftreten. Die Ergebnisse sind so zu deuten, dass 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, dass 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, dass Pangiumblätter im Dunkeln alle HCN verlieren ohne dass 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 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, dass 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 T r e u b für junge Blätter angibt, an welcher Tatsache zweifelsohne die klimatischen Verhältnisse Schuld sind. Als ich später nämll. die Pangiumpflanzen an eine sonnigere Stelle überbracht hätte, so nahm die Blausäuremenge pro Oberfläche beträchtlich zu (vergl. Tab. 26).

B. Der Einfluss der Kohlenhydrate.

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

Zu diesem Zweck wurden Blatthälften des Kirschlorbeers 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, dass 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 cm³ Ag NO₃ 1/100 n. pro 25 Hälften.

Nr.	Versuchsdauer (Tage)	Anfangswert	Versuch	Diff. %	Bemerkungen
61	3	9.80	9.75	—	Blätter sterben ab
62	3	9.65	9.65	—	
63	3	9.90	9.80	—	
64	6	9.65	—	—	

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 cm³ Ag NO₃ 1/100 n. pro 25 Hälften.

Datum	Nr.		Versuchsdauer (Tage)	Anfangswert	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 Eiweißstoffwechsel sein, wie Treub es behauptet hat.

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

TABELLE 24.

Phaseolus lunatus L. Unausgewachsene Blätter im Dunkeln auf 4 % Glukoselösung in cm^3 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 Kirschlorbeer Versuch ist deshalb, dass hier anfänglich eine Blausäurezunahme beobachtet wird.

Dieses Ergebnis wird erklärlich, wenn wir ins Auge fassen, dass 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 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 Kirschlorbeerextrakten müssen zuvor die Gerbstoffe entfernt werden, da diese sich mit der konz. H_2SO_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 Nitrates ist; doch wird indirekt die Anwesenheit der Nitrates 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^3 Ag NO_3 1/100 n. pro 25 Blättchen.

Nr.	Versuchsdauer (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, dass 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^3 Ag NO_3 1/100 n. pro 100 cm^2 Blattoberfläche.

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

Es sei jedoch bemerkt, dass 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 Einfluss der Nitrate.

Im Vorhergehenden wurde bemerkt, dass 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, dass die Blausäure direkt aus den Nitraten hervorgehe.

Betrachten wir zuerst den Fall, wo dem Blatte dauernd Nitrate zur Verfügung stehen. Wenn den Phaseolusblättern im Dunkeln nur eine 0.15 %-ige Kaliumnitratlösung geboten wird, so beobachten wir, dass 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 % KNO_3 -Lösung. HCN in $\text{cm}^3 \text{AgNO}_3$ 1/100 n pro 25 Hälften.

Nr.	Versuchsdauer (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, dass für eine Speicherung der Blausäure die Anwesenheit der Nitrate 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 % KNO_3 . HCN in cm^3 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 größer als bei Glukoseversuchen (s. Tab. 24). Wenn die Blausäure direkt aus den Nitraten hervorginge, so wäre eine größere Ansteigung der HCN zu erwarten, da dauernd Nitrate und Glukose zur Verfügung stehen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, *dass die Nitrate offenbar nicht in erster Linie für die Blausäurebildung verantwortlich sind.*

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

Man dürfte in diesem Falle doch erwarten, dass bei den

Glukosenitratversuchen die Blausäuremenge nicht zunächst zunähme, sondern anfrage 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 cm^3 AgNO_3 1/100 n. pro 25 Hälften.

Nr.	Versuchsdauer (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 cm^3 AgNO_3 1/100 n. pro 25 Hälften.

Nr.	Versuchsdauer (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 Einflusz ausüben; die Blausäurezunahme infolge der Anwesenheit des *Asparagins* redet jedoch vor sich selbst; sie ist mehr als zweimal so gross als bei den Glukose-nitrat- oder Glukoseversuchen.

Dieses Ergebnis berechtigt zur Schlussfolgerung, dass das Auftreten der Blausäure in den Blättern nur indirekt von der Anwesenheit der Nitrate, im allgemeinen des mineralen Stickstoffes, abhängig ist, und dass 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, dass die Nitrate die weitere Verarbeitung der Blausäure im Stickstoffwechsel fördern dürften, wird also von den Glukose-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 Ausnützung 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

Absterbungserscheinungen (Phaseolusblätter auf reinem Wasser dagegen sehen nach 8 Tagen noch frisch aus). Dem Blatt werden ziemlich starke Nitrat- oder Asparaginlösungen dargeboten, außerdem Glukose. Anfänglich vermögen diese Nährstoffe vielleicht einen günstigen Einfluss auszuüben, es ist aber denkbar, dass 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, dass Phaseolusblätter im Lichte auf einer Nitratlösung, welcher sogar noch Glukose zugegeben wurde, eine starke Blausäurezunahme zeigen und dass 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 % KNO_3 . HCN in cm^3 AgNO_3 1/100 n. pro 25 Hälften.

Nr.	Versuchsdauer (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 Einfluss 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 Eiweiß.

Wenn die Blausäure eine so wichtige Stufe in der Stickstoffassimilation der Blätter wäre, wie Treub in seiner Hypothese behauptet, so geht daraus hervor, dass der Eiweißstoffwechsel mit den Schwankungen im Blausäurebestand weitgehend verknüpft sein müsse. Es empfiehlt sich daher, die Menge des Eiweißstickstoffes 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, dass es sich bei den stärksten Blausäureschwankungen oft nur um Fraktionen von Milligrammen Blausäure-N handelt. Und die Bestimmung des Eiweiß-N ist nicht derart empfindlich, dass diese geringen Mengen Blausäure-N quantitativ wiedergefunden werden können. Uebrigens kann man erwarten, dass nicht nur der Eiweiß 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 Eiweiß-N und Blausäure-N hinweisen. Diese Schwankungen wurden an abgeschnittenen jungen Blättern

untersucht, wo also die Eiweissynthese 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.	Versuchsdauer (Tage)	mg Blausäure-N			mg Eiweisz-N		
		Anfangswert	Versuch	Diff.	Anfangswert	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 Eiweissdissimilation 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 gross 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.	Versuchsdauer (Tage)	mg Blausäure-N			mg Eiweisz-N		
		Anfangswert	Versuch	Diff.	Anfangswert	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 Kohlenhydrat-assimilation 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 grösserem Masstabe 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.	Versuchsdauer (Tage)	mg Blausäure-N			mg Eiweisz-N		
		Anfangswert	Versuch	Diff.	Anfangswert	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.	Versuchsdauer (Tage)	mg Blausäure-N			mg Eiweisz-N		
		Anfangswert	Versuch	Diff.	Anfangswert	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 Blatthälfte 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 Nitrate, nur ist der fördernde Einfluss des Asparagins auf die Blausäuremenge ein weit grösserer.

Die Nitrate sind also nicht unbedingt notwendig für die Blausäurebildung.

8. Die Abnahme der Blausäure bei Verdunkelung von abgeschnittenen Kirschlorbeerblättern hat keinen merklichen Einfluss auf die Eiweissdissimilation dieser Blätter.

9. Im Lichte nimmt in abgeschnittenen Kirschlorbeerblättern sowohl die Blausäuremenge als die Eiweissmenge zu.

VIII. ABSCHNITT.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE.

Nachdem im Vorhergehenden die verschiedenen Ergebnisse zusammengefasst 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*.

Treib beobachtet einen fördernden Einfluss der Nitrate 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, fuszt auf diese Beobachtungen.

Es sei zuerst bemerkt, dasz Treib offenbar den anorganischen, zugeführten Stickstoff mit Nitraten gleichstellt. Wir finden doch nirgends Ammonverbindungen berücksichtigt, welche, wie Ravenna bei Keimversuchen mit *Sorghum* beobachtete, einen fördernden Einfluss auf die Blausäuremenge im Keimling haben können. Daneben hat Treib 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 Treibs ist deshalb mit Rücksicht auf seine Versuchsergebnisse als prämatür 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 Einfluss 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, dass die Blausäuremenge in den Blättern ansteigt, jedoch ist dargetan worden, dass auch die Anwesenheit organischer Stickstoffverbindungen eine Zunahme herbeiführen kann, und zwar in weit grösserem Masse.

Es geht aus diesen Tatsachen hervor, dass die Grundlage der Hypothese Treubs, näm. 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 müsste 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 Eiweissynthese 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 Eiweissstoffwechsel, 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 Kirschlorbeer konstant und nimmt bei Phaseolus anfänglich zu, um weiter gleichfalls konstant zu bleiben.

Hier wird also dargetan, dass 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 Eiweißbausteinen, obwohl wir heute wissen, dass die Eiweißsynthese auch im Dunkeln vor sich gehen kann. Bei Kirschchlorbeerblättern, welche ans Licht gestellt worden sind, beobachten wir jedoch eine Zunahme des Eiweißes *und* der Blausäure, obwohl nur eine zu vernachlässigende Spur anorganischen Stickstoffes zugeführt wird.

Diese Versuche berechtigen zu der Schlussfolgerung, dass die Blausäure nicht das erste, sogar nicht ein folgendes, Assimilationsprodukt des Stickstoffes ist, und dass 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 Asparaginglukoseversuchen 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, dass, obwohl kein anorganischer Stickstoff zur Verfügung steht, die Blausäuremenge und die Eiweißmenge beide ansteigen, so geht daraus hervor, dass 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, andererseits ist eine Bildung neben der Eiweißsynthese möglich.

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

Diese Verhältnisse reden zugunsten der Anschauung, dass die HCN in den Blättern von der Eiweisszsynthese abhängig ist. Auch die Beobachtungen, dass nach intensiver Beleuchtung die Blausäuremenge in den Blättern beträchtlich grösser ist als während dauernd schlechtes Wetters und dass 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, dass die Blausäure als Nebenprodukt des Eiweissstoffwechsels, vielleicht der Eiweisszsynthese, aus organischen Stickstoffverbindungen entstehe. Als Muttersubstanzen kommen dabei Aminosäuren oder schon höher organisierte N-Verbindungen in Betracht.

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

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

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

Aus diesen und anderen Versuchen schlieszen wir dagegen, dasz 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, dasz 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, dasz die Blausäureglukoside hier in erster Linie als Kohlenhydratreserven fungieren.

Diese Versuche zeigen überdies, dasz das Aglukon an sich nicht stabil ist. Wenn näml. 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 Etiolement auftretende Abnahme der Blausäure in den Phaseolus-Keimlingen war der Funktion des Glukosides als Kohlenhydratreserve zu verdanken. Die HCN-Abnahme, welche in etiolierten Schösz-

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

Daneben müssen wir annehmen, dass 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 Absterbungserscheinungen 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, dass die Blausäuremenge dieser Blätter abnimmt. Das gilt ebenso sehr für unsere Versuchspflanzen *Phaseolus lunatus* und *Pangium edule*. Wir müssen hier also damit rechnen, entweder dass die Blausäure aus den Blättern transportiert wird, oder dass die Glukoside Umwandlungen unterliegen.]

Dass 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 Kirschlorbeerblättern während der Nacht an; Verschaffelt und Rosenthaler bemerken bei demselben Objekt jedoch davon nichts.

Aus meinen Versuchen am Kirschlorbeer geht hervor, dass 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, dass 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, dass *Sorghum vulgare* fast blausäurefrei wird im Stadium, dass die Pflanze zur Samenbildung schreitet, ist in derselben Weise zu deuten.

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

Im normalen Kirschlorbeerblatt 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 Blattstiel des *Phaseolus*blattes 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 galeoides* fand Treub⁵³⁾ noch beträchtliche HCN-Mengen; dasselbe wurde von Guignard²³⁾ für *Sambucus nigra* beobachtet.

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

SCHLUSZFOLGERUNGEN.

1. Die Blausäure ist nicht das erste erkennbare Assimilationsprodukt des Stickstoffes.

Die Hypothese Treubs ist demgemäß unrichtig.

2. Die Blausäure oder das bezügliche Cyanhydrin ist ein Nebenprodukt des Eiweiszstoffwechsels, vielleicht der Eiweizsynthese, 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 perparte 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 cyanogenetic 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. Ztg. f. Russland, 1885.

33. Oppenheimer, C. Die Fermente. Vogel, Leipzig, 1913.
34. Pêche, 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 uitlopende 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. Onderzoekingen 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.