

18. Hans Molisch: Ueber den mikrochemischen Nachweis von Nitraten und Nitriten in der Pflanze mittelst Diphenylamin oder Brucin.

Eingegangen am 24. März 1883.

Vor ungefähr zwei Jahren hat Borodin¹⁾, gelegentlich seiner Untersuchung über die Verbreitung des Asparagins, bei Behandlung von Pflanzenschnitten mit Alkohol charakteristische Niederschläge erhalten, darunter auch öfters einen solchen, der vorwiegend aus zweischenkelligen, einen stumpfen Winkel bildenden Krystallen bestand. Borodin hält diese wegen ihres Aussehens, ferner weil sie sich im Wasser leicht lösen, bei starker Erwärmung schmelzen und im polarisirten Licht auf dunkeln Gesichtsfeld hell und farbig aufleuchten, für Salpeterkrystalle. — Angeregt durch diese Beobachtung unternahm es hierauf N. A. Monteverde²⁾, das Vorkommen und die Vertheilung des Salpeters in der Pflanze genauer zu studiren, wobei er sich zum Nachweis des genannten Salzes derselben Methode bediente wie Borodin. Dies sind, wie ich glaube, die ersten und einzigen Versuche, welche unternommen wurden, um ein Nitrat direkt im Pflanzengewebe unter dem Mikroskope nachzuweisen.

Die Methode Borodins, den im Zellsaft gelösten Salpeter durch Einwirkung von Alkohol und späteres Austrocknenlassen des Präparates zum Auskrystallisiren zu bringen, wird gewiss in vielen Fällen ganz besonders da, wo der Salpeter in erheblicher Menge angehäuft ist, gute Dienste leisten; allein wenn es sich darum handeln sollte, minimale Mengen des Nitrates nachzuweisen, so wird diese Methode, da ja die entstehenden Krystalle nur unvollkommen und sehr klein sein werden und überdies mit anderen z. B. mit Asparaginkrystallen leicht verwechselt werden können, nicht mehr ausreichen.

1) Sitzungsber. der bot. Sektion der St Petersburger Naturforscher-Ges 1881. Vgl. d. Referat darüber in der Bot. Ztg. 1882, p. 589.

2) Ueber Verbreitung und Vertheilung des Salpeters in der Pflanze und über einige chemische Verwandlungen unter dem Einfluss des Zellsaftes. Sep-Abdr. aus d. Arb. d. St. Petersburg. Naturf.-Ges. Bd. VII, Theil II, 1882. Da diese Arbeit in russischer Sprache erschienen ist, so konnte ich dieselbe nur insoweit verwerthen, als sie in einem im botan. Centralbl. (Bd. XII, p. 257) enthaltenen Referate wiedergegeben ist.

Da von den Chemikern¹⁾ in letzter Zeit Diphenylamin oder Brucin zum Nachweis sehr kleiner Mengen von Nitraten und Nitriten im Brunnenwasser mit schönem Erfolge verwendet werden, so versuchte ich die beiden Reagentien in die Histochemie einzuführen; schon wenige Versuche liessen erkennen, dass diese, ganz besonders aber das Diphenylamin, die Gegenwart von Nitraten oder Nitriten in mikroskopischen Schnitten durch eine auffallende Farbenreaktion anzeigen. Die anfängliche Befürchtung, dass die Reaktion durch andere organische Stoffe der Zelle gestört werden könnte, erwies sich als unbegründet.

Reaction mit Diphenylamin. Als Reagenz leisteten mir die besten Dienste Lösungen von $\frac{1}{100}$ bis $\frac{1}{10}$ gr Diphenylamin in 10 ccm reiner Schwefelsäure. Solche Lösungen sind vollkommen klar und fast farblos. Bei der Prüfung frischer Schnitte ist es, wie ich mich vielfach überzeugt habe, nicht gut mit konzentrierteren Lösungen zu arbeiten, da in diesem Falle das Diphenylamin beim Zusammentreffen mit Wasser (Zellsaft) herausfällt, wodurch die Reaktion unterbleibt oder nur sehr undeutlich hervortritt. Anders ist es jedoch, wenn man einen am Objektträger eingetrockneten Schnitt, in welchem also die etwa vorhandenen Nitrate in fester Form vorhanden sind, zu untersuchen hat; da empfiehlt es sich, sehr konzentrierte Lösungen anzuwenden. Bringt man einen Tropfen von dem Reagenz auf einen ein salpetersaures oder salpetrigsaures Salz enthaltenden Querschnitt, so tritt eine tiefblaue Färbung auf, welche je nach dem grösseren oder geringeren Nitrat- oder Nitritgehalt längere oder kürzere Zeit andauert, um schliesslich zu verschwinden oder ins Braungelbe überzugehen. Sind nur Spuren von den genannten Körpern vorhanden, so erhält man mitunter keine Reaktion, wohl aber dann, wenn man den Schnitt am Objektträger austrocknen lässt und hierauf einen Tropfen recht konzentrierte Diphenylaminlösung hinzugeibt: es tritt alsbald deutliche Blaufärbung ein, die sowohl makro- als auch mikroskopisch sichtbar wird. Bei der Untersuchung von Schnitten ist es vortheilhaft, soviel von dem Reagenz auf dieselben zu bringen, dass sie vollständig untergetaucht sind. Dringt das Diphenylamin recht gleichmässig von allen Seiten

1) A. Wagner, Erkennung und Bestimmung der Nitrate im Brunnenwasser. Zeitschrift f. Chemie, herausgeg. v. Fresenius, Jg. 20, p. 329. Zum Beweise dafür, wie empfindlich die Reaktion mit Diphenylamin ist, führe ich aus Wagner's Arbeit folgende Tabelle an:

1 ccm einer Lösung von

1 Salpeter in 10 000 Wasser gab starke sofortige Reaktion.

100 000	„	„	„	„	„
200 000	„	„	deutliche Reaktion	nach kurzer Zeit.	
300 000	„	„	schwache	„	„ längerer Zeit.
600 000	„	„	keine sichere Reaktion.		

in das Gewebe ein, so kann man nun bei mikroskopischer Betrachtung an Stengelquerschnitten die Bemerkung machen, dass die Blaufärbung hauptsächlich im Marke und im Rindenparenchym auftritt, offenbar deshalb, weil die Nitrate hier in grösster Menge vorhanden sind.

Die geschilderte Reaktion kann sowohl von einem Nitrat als auch Nitrit herrühren, denn beide Salze geben die gleiche Blaufärbung. Welches von beiden Salzen oder ob beide zugegen sind, darüber sagt die Reaktion nichts aus. Da man jedoch in den Fällen, in welchen man schöne Blaufärbung erhält, auch zumeist durch blosses Verdunstenlassen von einem Tropfen ausgepressten Zellsaftes am Objektträger deutliche Salpeterkrystalle gewinnt und da ferner die Analyse von Pflanzensäften häufig die Gegenwart von Nitraten und nur selten das Vorhandensein von Nitriten¹⁾ ergeben hat, so dürfte wohl die Reaktion in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle auf Verbindungen der Salpetersäure hindeuten²⁾.

Reaktion mit Brucin. Nach A. Wagner³⁾ erwies sich die Brucinreaktion zum Nachweis von Nitraten im Brunnenwasser ebenso empfindlich, wie die mit Diphenylamin. Wendet man jedoch die beiden Reagentien auf die Pflanze an, so lässt sich nicht das Gleiche davon sagen, denn hier verdient das Diphenylamin entschieden den Vorzug, da die durch Brucin hervorgerufene Färbung in dem Falle, wenn die Nitrate nur in geringer Menge vorhanden sind, nicht besonders deutlich wird.

Ich verwendete mit Vortheil eine Lösung von $\frac{2}{10}$ gr. *Brucin* in 10 cc. reiner Schwefelsäure. Ein Tropfen einer solchen Lösung mit einem Stengelquerschnitt von *Amarantus*, *Capsella* oder *Tradescantia* zusammengebracht, ruft eine hochrothe oder rothgelbe vergängliche Färbung hervor. Auch diese Reaktion kann sowohl von Nitraten als auch von Nitriten herrühren, es gilt daher das, was über diesen Punkt bei der Diphenylaminreaktion gesagt wurde, auch von der Brucinreaktion.

Mit Hilfe dieser beiden Reagentien habe ich unter öfterer Zuziehung der Methode Borodins an 50 krautartige verschiedenen Familien angehörige Pflanzen auf ihren Nitratgehalt untersucht und habe einen solchen mit wenigen Ausnahmen in den Wurzeln, Stengeln und oft auch in den Blättern gefunden. Dies darf auch gar nicht auf-

1) Schönbein wies im ausgepressten Saftes von *Lactuca sativa* und *Leontodon taraxacum* mit angesäuertem Jodkaliumstärkekleister salpetrige Säure nach. Vgl. Ebermayer, physiolog. Chemie der Pflanzen. 1882, pag. 768.

2) Dafür würde auch die Beobachtung Goppelsröder's sprechen, dass „eine Runkelrübe, welche in einer von Nitraten freien Erde wächst, die man von Zeit zu Zeit mit einer schwachen Lösung von salpetrigsaurem Kali begiesst, in ihrem Saftes nur salpetersaure Salze, keine salpetrigsauren enthält.“ Vgl. Liebig, die Chemie in ihrer Anwendung auf Agrikultur und Physiologie. 1876. p. 65.

fallen, gehören doch die salpetersauren Salze des Bodens zu den wichtigsten Nahrungsmitteln der Pflanze. Die Salpetermenge ist, wie schon aus der Intensität der Farbenreaktion hervorgeht, bei verschiedenen Pflanzen eine höchst variable. An der Spitze jener Gewächse, welche einen ungemein grossen Salpetergehalt aufweisen, stehen vor allen zahlreiche Schuttpflanzen: die Gattungen *Amarantus*, *Chenopodium*, *Urtica*, *Mercurialis*, *Solanum*, *Sinapis*, *Helianthus*, *Capsella* und viele andere, die man als wahre „Salpeterpflanzen“ bezeichnen könnte. Dass manche Pflanzen in ganz besonderem Grade die Fähigkeit haben, den Salpeter in geradezu unglaublicher Menge aufzuspeichern, geht schon aus einer Beobachtung Boussingaults hervor¹⁾. Nach diesem Forscher nimmt der Tabak auf salpeterhaltigem Boden bei Mazulipatam soviel von dem Salpeter auf, dass die Blätter desselben eine weisse Farbe annehmen. *Helianthus*, der auf salpeterreichem Boden kultivirt wurde, speichert soviel Salpeter im Marke auf, dass kleine Stückchen davon auf glühende Kohle geworfen, unter Detonationen verpuffen. A. Boutin²⁾ fand in *Amarantus Blitum* 11,68 pCt., in *A. ruber* 16 pCt. und in *A. atropurpureus* 22,77 pCt. salpetersaures Kali (bezogen auf die Trockensubstanz). Wurden Stengelstücke davon in freier Luft getrocknet, so blühte der Salpeter in Form eines weissen Ueberzuges aus. Von diesen salpeterreichen Pflanzen bis zu jenen, welche nur Spuren von Nitraten oder gar keine nachweisbaren Mengen enthalten, kommen alle Uebergänge vor. Gar keine Reaktion unter den untersuchten krautartigen Pflanzen erhielt ich beispielsweise bei einer im Topfe kultivirten *Rochea falcata*, in der Zwiebel von *Allium Cepa* und in vielen Kartoffelknollen. Wenn die Reaktion ausbleibt, so darf keineswegs geschlossen werden, dass die betreffende Pflanze Nitrate oder Nitrite überhaupt nie führt, denn offenbar wird man dieselben nur dann nachweisen können, wenn mehr davon aufgenommen als assimilirt wurde. Auch wird der Nitratgehalt der Pflanze im hohen Grade abhängig sein, von dem jeweiligen Gehalt im Boden. Er wird ein höchst wechselnder sein, je nach dem Substrat, auf welchem die Pflanze gedeiht. Um mich davon zu überzeugen, theilte ich eine bestimmte Menge von mit Wasser gereinigten Kressesamen (*Lepidium sativum*) in drei Partien. Die eine liess ich in schwarzer salpeterhaltiger Gartenerde ankeimen, die zweite im Sägemehl, das nur Spuren von Nitraten enthielt und die dritte Partie endlich in einer wohlgereinigten Platinschale auf wenig destillirtem Wasser. Als die Keimlinge eine Höhe von 4 Ctm. erreicht hatten, untersuchte ich die Stengel derselben: die erste Partie gab sehr schöne Reaktion, die zweite schwache und die dritte gar keine.

1) Vgl. Sachs, Handb. d. Experimentalphysiologie 1865. p. 140.

2) Bot. Jahresber. 1873, p. 319, ferner 1874, p. 861.

Ausser den 50 phanerogamen krautartigen Gewächsen prüfte ich auch einige *Cryptogamen*, nämlich *Agaricus campestris* (Strunk), *Marchantia polymorpha*, *Fegatella conica*, *Pteris serratula*, *Selaginella Martensii* (Stamm) und erhielt bei allen mit Diphenylamin schöne Blaufärbung.

Während die krautartigen Pflanzen gewöhnlich sehr schöne Reaktionen geben, blieben dieselben merkwürdiger Weise bei den untersuchten Baum- und Strauchzweigen vollständig aus. (*Syringa vulg.*, *Ulmus campestris*, *Philadelphus coronarius*, *Ampelopsis hederacea*, *Taxus baccata*, *Acer Pseudoplatanus*, *Robinia Pseudacacia*, *Celtis australis*, *Ailanthus glandulosa*). Da ich die meisten derselben im Winter, also in entlaubtem Zustande untersuchte, so wäre man vielleicht geneigt, in dem Mangel jeder stärkeren Saftleitung die Ursache des Ausbleibens der Reaktion zu suchen, allein Monteverde¹⁾ prüfte 10 Bäume im belaubten Zustande und fand den Salpeter ebenfalls nur bei einer einzigen Gattung (*Sambucus*). Wenn man erwägt, dass die obersten Schichten des Bodens vorzüglich Nitrate enthalten und dass diese in den tieferen zu Nitriten und diese schliesslich in noch tiefer gelegenen Bodenschichten zu Ammoniak reduziert werden, so erscheint es nicht unwahrscheinlich, dass die Bäume deshalb keinen Nitratgehalt aufweisen, weil diese mit ihren tiefgehenden Wurzeln zumeist nur Ammoniakverbindungen, aber keine Nitrate vorfinden.

Mittelst unserer beiden Reagentien lässt sich auch in höchst einfacher Weise konstatiren, dass in krautartigen Stengeln die Nitrat beziehungsweise Nitritmenge von unten nach oben abnimmt. Zur Untersuchung dienten *Phaseolus multiflorus*, *Pisum sativum*, *Solanum tuberosum*, *Hartwegia comosa*. Fertigt man aus dem Stamme der bezeichneten Pflanzen von unten nach oben vorschreitend Querschnitte an, legt dieselben am Objektträger in eine Reihe und behandelt sie mit Diphenylaminlösung, so werden die dem älteren Stammtheil entsprechenden Schnitte tiefblau, die darauf folgenden hellblau, die knapp unterhalb der Vegetationsspitze entnommenen dagegen nur ganz schwach bläulich oder bleiben ganz ungefärbt. Sowie nun die Menge der genannten anorganischen Stickstoffverbindungen in verschiedenen Höhen des Stammes eine verschiedene ist, so ist auch dieselbe über ein und denselben Querschnitt nicht gleichmässig verbreitet. Die mikrochemische Reaktion zeigt vielmehr, dass das Mark und das Rindenparenchym den eigentlichen Sammelpunkt für die Nitrate oder Nitrite bilden.

Es liesse sich noch Manches anführen, um zu zeigen, dass die empfohlenen Reagentien in mehr als einer Hinsicht von Nutzen sein

1) l. c.

werden; allein, da ich meine Beobachtungen im kommenden Sommer ohnedies fortzusetzen gedenke, so will ich die vorliegende kleine Arbeit, welche im pflanzenphysiologischen Institute der Wiener Universität ausgeführt wurde, einstweilen als eine vorläufige Mittheilung veröffentlichen.

19. K. Prantl: *Helminthostachys zeylanica* und ihre Beziehungen zu *Ophioglossum* und *Botrychium*.

Vorläufige Mittheilung.

Eingegangen am 25. März 1883.

Der Umstand, dass ich durch Herrn Grabowski aus Borneo einige Exemplare der *Helminthostachys zeylanica* erhielt (leider blieb mein Wunsch, dieselben in Alkohol conservirt zu bekommen, unerfüllt), war Veranlassung, diese Pflanze, von welcher bisher kaum mehr als der äussere Habitus bekannt war, einer möglichst eingehenden Untersuchung zu unterziehen und mit den beiden anderen, bisher allein genauer studirten Gattungen der *Ophioglosseae* in Vergleich zu setzen. Die Resultate meiner Untersuchungen sollen, mit zahlreichen Abbildungen versehen, an anderer Stelle ausführlicher veröffentlicht werden; hier erlaube ich mir nur auf einige Punkte aufmerksam zu machen, welche für das Verständniss der Morphologie der *Ophioglosseae* und ihrer systematischen Stellung besondere Beachtung verdienen dürften. Es sind dies erstens der Bau des Stammes und der die Knospe umschliessenden Hüllen, zweitens der Strangverlauf im sterilen und fertilen Blatte, drittens die Anordnung der Sporangien.

Während *Ophioglossum* und *Botrychium* multilaterale Blattstellung besitzen, ist *Helminthostachys* durch ihr dorsiventrales horizontal kriechendes Rhizom ausgezeichnet, welches auf dem Rücken zwei Zeilen einander sehr nahe gerückter Blätter, an den Flanken und der Bauchseite mehrere Reihen Wurzeln trägt. Wie bei vielen anderen *Ophioglosseae* wird hier jährlich nur ein einziges Blatt entfaltet; die für die beiden folgenden Jahre bestimmten Blätter sind schon äusserlich zwischen dem entfalteten Blatte und der Stammspitze deutlich sichtbar, indess ragen diese Blattanlagen auch hier nicht frei vor, sondern sind von der eigenthümlich gebauten Hülle umschlossen. Entsprechend dem

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft](#)

Jahr/Year: 1883

Band/Volume: [1](#)

Autor(en)/Author(s): Molisch Hans

Artikel/Article: [Ueber den mikrochemischen Nachweis von Nitraten und Nitriten in der Pflanze mittelst Diphenylamin oder Brucin. 150-155](#)