© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

Mitteilungen.

31. Friedrich Czapek: Zur Kenntnis der silberreduzierenden Zellsubstanzen in Laubblättern.

(Eingegangen am 26. 6. 1920.)

Im Verlaufe meiner Studien zur Biochemie des pflanzlichen Zellplasmas ergab sich die Notwendigkeit, auch auf die lange bekannte Eigentümlichkeit des lebenden Inhaltes vieler Pflanzenzellen näher einzugehen, Lösungen von Silbernitrat unter Bildung schwärzlicher Silbersole oder dunkler Niederschläge zu reduzieren. Bekanntlich hat sich OSKAR LOEW in Gemeinschaft mit TH. BOKORNY[1]) zuerst ausführlicher mit dieser auffallenden Reaktion befaßt und seine viel diskutierte Theorie von der aldehydischen Natur des „lebenden Eiweißes" daran geknüpft. In neuerer Zeit hat man sich wenig mit dieser Reaktion beschäftigt, und es ist eigentlich nur eine Arbeit von C. VAN WISSELINGH[2]) zu erwähnen, in der dieser Forscher es wahrscheinlich macht, daß die silberreduzierende Substanz der Spirogyrazellen chemische Beziehungen zu den Gerbstoffen hat.

Es ist ein Verdienst von H. MOLISCH[3]) in einer interessanten mikrochemischen Studie gezeigt zu haben, daß sich die Chloroplasten der meisten Pflanzen durch ein besonders starkes Reduktionsvermögen auszeichnen, besonders wenn man konzentriertere Silbernitratlösungen, als sie LOEW und BOKORNY verwendeten, einwirken läßt. Während die Lösung von LOEW eine ammoniakalische Silberlösung war, die nur 1 ccm einer 1 % Silbernitratlösung im Liter enthielt, wendete MOLISCH 0,1—1 % Silbernitrat ohne jeden Zusatz an und konnte damit besonders in der Epidermis der Blätter von Blütenpflanzen eine tiefschwarze Färbung der Chloroplasten erzielen. Bei *Spirogyra* schwärzen sich nur die Zacken des Chlorophyllbandes.

1) O. LOEW und TH. BOKORNY, Die chemische Kraftquelle im Protoplasma, München 1882. O. LOEW, Die chemische Energie der lebenden Zellen, München 1899. Kritik: W. PFEFFER, Flora, Bd. 47, p. 46 (1889).

2) C. VAN WISSELINGH, Beihefte zum bot. Centralbl. Bd. 32, I, p. 155 (1914).

3) H. MOLISCH, Sitzg.-Ber. d. Akad. d. Wiss. in Wien, Math. nat. Kl. Abt. I, Bd. 127, 6/7. Heft, Wien 1918, p. 449.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

Bezüglich der Ursache dieser Reaktion meint MOLISCH, daß es sich „um einen äußerst labilen Stoff handelt, der sein Reduktionsvermögen schon beim Absterben des Chlorophyllplasmas einbüßt". Er sagt weiter: „Wenn das tote Chlorophyllkorn mit Silbernitrat die Schwärzung nicht mehr zeigt, so ist das nicht etwa so zu erklären, daß der reduzierende Körper das tote Chlorophyllkorn verläßt und sich in das Protoplasma oder in den Zellsaft begibt, denn man kann sich leicht überzeugen, daß sehr oft außerhalb der toten Chlorophyllkörner weder im Protoplasma, noch im Zellkern, noch im Zellsaft irgend eine Spur einer Schwärzung eintritt. Der reduzierende Körper muß also im Chlorophyllkorn selbst im Momente des Todes eine Wandlung erleiden, und dabei seine reduzierende Fähigkeit gegenüber dem Silbersalze einbüßen". MOLISCH schien der Parallelismus der Erscheinung, daß mit dem Tode der Chlorophyllkörner das Vermögen Kohlensäure zu reduzieren, ebenso verloren geht, wie die Fähigkeit Silber abzuscheiden, zugunsten der Auffassung zu sprechen, daß vielleicht der die Kohlensäure reduzierende und der Silber abscheidende Körper ein- und derselbe sei, oder mit der Kohlensäure-Assimilation in näherer Beziehung stehe. „Der Reduktor ist wegen seiner erstaunlichen Labilität unversehrt gar nicht makrochemisch zu packen und zu untersuchen". Die Frage nach der chemischen Natur der reduzierenden Substanz läßt MOLISCH offen.

Wir hätten also eine neue „Lebensreaktion", diesmal an den Chloroplasten, vor uns, wenn die Auffassung von MOLISCH richtig ist. Daß geschädigte Zellen der Schnitte die Silberreaktion der Chloroplasten nicht geben, läßt sich an vielen Blättern leicht zeigen; an dieser Tatsache ist nicht zu zweifeln. Nun war mir aber bereits aus früheren Studien über die Gerbstoffzellen von *Echeveria* bekannt, daß das Ausbleiben der Koffeinreaktion an nekrobiotisch veränderten Zellen auf nichts anderem beruht, als daß der Gerbstoff zum größten Teile oder ganz ausgetreten ist, und sich in der umgebenden Flüßigkeit nachweisen läßt[1]). Deshalb schien es mir auch hier an den Blattzellen nötig, das eigenartige Verhalten beim Absterben nochmals kritisch zu untersuchen. Es ist unbedingt zuzugeben, daß man abgesehen von der Silberreaktion an den Chloroplasten keine andere charakteristische mikrochemische Probe erhalten kann, welche bestimmte Schlüsse auf die Natur des fraglichen Stoffes gestatten würde. Nach Einlegen in 1%ige Osmiumsäure sieht man zwar

1) F. CZAPEK, Versuche über Exosmose aus Pflanzenzellen, Berichte der Deutsch. Bot. Ges. Jahrg. 1910, Bd. XXVIII, Heft 5, p. 159.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

meist eine leichte diffuse Schwärzung des Zellinhaltes auftreten; mit Eisenazetat beobachtet man gleichfalls in verschiedenen Zellen eine dunklere Färbung, ja bei *Aucuba*, *Ranunculus repens* u. a. glaubte ich bei Sodazusatz hier und da selbst einen Umschlag in eine rötliche Nüance zu erkennen. Ein leichtes Nachdunkeln ist auch mit Kaliumbichromat zu erhalten, und Anwendung von Uranylazetat, Ammoniummolybdat oder Ferricyankaliumlösung bewirkt ähnliche diffuse leichte Reaktionen im Zellinhalt. Ob aber diese Reaktionen auf die aus den Chloroplasten austretenden Stoffe zu beziehen sind, blieb fraglich, da man den Austritt nicht direkt nachweisen kann. Jedenfalls ist die Silberreduktion die einzige scharfe Reaktion, die man an den Chloroplasten erhalten kann.

Mithin muß ein anderer Weg eingeschlagen werden. Aus chemischen Gründen dachte ich zunächst an Beziehungen der fraglichen Substanz zum Brenzkatechin, das gleichfalls Silbernitrat in der Kälte reduziert. Brenzkatechin ist durch neutrales Bleiazetat fällbar, und ein gut ausgewaschenes, von freiem Brenzkatechin völlig freies Brenzkatechin-Bleisalz gibt noch immer nach einiger Zeit eine deutliche Silberreduktion. Macht man nun mit Schnitten von *Aucuba*-Blättern oder anderen passenden Objekten den Versuch, sie zuerst einige Stunden in Bleizuckerlösung zu legen, und nach Auswaschen des überschüssigen Bleisalzes die Silberreduktion einzuleiten, so sieht man leicht, daß die Reduktion gerade so gelingt, wie mit lebenden Zellen. Es handelt sich mithin um keine „Lebensreaktion", sondern um einen mit Bleiazetat fixierbaren (fällbaren) Stoff. Damit war auch der Weg gewiesen, die Ursache der Silberreduktion präparativ-chemisch zu erforschen. Man kann einmal so vorgehen, daß man das frische Blättermaterial in wässerige oder (besser) alkoholische Bleiazetatlösung (ich verwendete halbnormalige Lösung von neutralem Bleiazetat, die 38 g auf 200 g Wasser enthält) einlegt. Nach einigen Stunden oder länger, erschöpft man das Material mit absolutem Alkohol und mit Äther, so lange als Chlorophyll in Lösung geht, und extrahiert nach Verjagen des Äthers mit Wasser. Die wässerige Lösung nun gibt mit Silbernitrat bei den verschiedensten Blättern einen flockigen Niederschlag, der sich in der Kälte sofort oder nach wenigen Minuten bräunt und schwarz färbt. Es ist aber nicht nötig, erst mit Bleiazetat zu fixieren, wenn man ganz frische, feinzerschnittene Blätter verwendet. Dieselben werden rasch in einen Glaskolben gebracht, mit kochendem Wasser übergossen, um die Fermente zu inaktivieren, und dann 1—2 Stunden bei Wasserbadtemperatur digeriert. Sie liefern so ein klares gelbgrünliches Extrakt, welches genügend konzentriert ist, um sofort eine

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

starke Silberreduktion in der Kälte zu geben. So weit untersucht, verhalten sich die meisten Blätter, wie *Aucuba*, *Hedera*, *Vinca*, *Ligustrum*, *Aesculus*, *Aegopodium*, *Lamium album*, *Petasites*, *Sambucus*, *Syringa* u. a., reaktionell sehr ähnlich, sowohl hinsichtlich der Silberprobe, als in einigen anderen Reaktionen. Verdünnte Eisenchloridlösung erzeugt intensiv dunkelgrüne Färbung, die auf Zusatz von etwas Natriumkarbonat in Rotviolett umschlägt. Neutrales Bleiazetat liefert einen starken gelben Niederschlag. Alkalien färben die Probe intensiv gelb, ebenso Salpetersäure. Die MILLONsche Probe fällt bei *Syringa* positiv aus, schön rot, wie bei Tyrosin oder den Oxybenzoesäuren; sonst erhält man nur Gelbfärbung und Niederschlag beim Erwärmen. Kaliumbichromat erzeugt starkes Nachdunkeln. Osmiumsäure wird rasch reduziert. Mit dem FOLINschen Phenolreagenz (100 g Natriumwolframat, 20 g Phosphormolybdänsäure und 50 ccm Phosphorsäure auf 1 Liter Wasser) entsteht eine Rotfärbung vom Aussehen verdünnter Chromsäure. Der ganze Komplex dieser Reaktionen kehrt bei der Kaffeesäure und ihren Verwandten wieder. Insbesondere mußte ich an das Didepsid der Kaffeesäure mit Chinasäure denken, die von PAYEN entdeckte Chlorogensäure denken, welche GORTER[1]) in einer schönen Arbeit behandelt hat, und die neuestens durch FREUDENBERG[2]) als Depsid der Kaffeesäure mit Chinasäure definitiv bestätigt worden ist. GORTER nahm auf Grund einer Farbenreaktion: Kochen mit Mineralsäure, Ausäthern, Ausschütteln der blau fluoreszierenden Ätherlösung nacheinander mit Bikarbonatlösung, Wasser und verdünntem Eisenchlorid, wobei sich der Äther gelb, die Eisenchloridschicht schwach olivbraun, bei größerer Substanzmenge grauviolett färbt, an, daß die Chlorogensäure in Laubblättern sehr verbreitet vorkommt. Isoliert wurde sie allerdings, auch von GORTER, nur aus Kaffeebohnen, wo sie als Koffein-Kaliumsalz vorkommt, eine Verbindung, die offenbar der früher als „Kaffeegerbsäure" angegebenen Substanz zugrunde liegt. Dem Entgegenkommen von Herrn Kollegen Prof. Dr. FREUDENBERG in Kiel verdanke ich die Gelegenheit die Reaktionen und das sonstige Verhalten der reinen Chlorogensäure aus eigener Anschauung kennen zu lernen. Chlorogensäure erzeugt mit Silbernitrat versetzt keinen Niederschlag, sondern bräunt sich in der Kälte und scheidet beim Erwärmen

1) K. GORTER, Liebigs Annal. Bd. 358, p. 327, 1907. Bull. du Départm. de l' Agriculture aux Indes Néerland, Nr. 15, 1907. Ferner Archiv f. Pharmazie Bd. 247, p. 436 (1909).

2) KARL FREUDENBERG, Berichte d. deutsch. chem. Gesellsch. Jahrg. L III, Heft 2, p, 232. Berlin 1920.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

ähnlich wie Brenzkatechin einen intensiven Silberspiegel ab. Sonst sind die Reaktionen der Chlorogensäure analog den oben erwähnten in Blätterauszügen.

Die chemische Untersuchung der fraglichen Blattsubstanzen ist im vollen Gange und noch lange nicht abgeschlossen, so daß hierüber erst später berichtet werden kann. Ich bemerke nur, daß die silberreduzierende Substanz sehr leicht als kristallisiertes Rohpräparat zu erhalten ist, wenn man die in der oben beschriebenen Art hergestellten Blätterextrakte zur Trockene eindampft, den Rückstand mit einem Gemisch von gleichen Teilen Methylalkohol und 96% Äthylalkohol auskocht und sodann den Alkohol abdestiliert. Ebenso gewinnt man die in Rede stehenden Körper, wenn man die frischen filtrierten Wasserextrakte mit Bleiazetat fällt, den ausgewaschenen Bleiniederschlag mit Schwefelwasserstoff oder mit Schwefelsäure zerlegt, und den eingedampften Rückstand hiervon mit Methyl-Äthylalkoholmischung auszieht. Sollte da noch keine Krystallisation erfolgen, so gewinnt man die genügend reinen Substanzen durch eine weitere Extraktion mit 96% Äthylalkohol dem 10% Wasser zugesetzt sind, oder mit kochendem Alkohol, der 5% Wasser enthält. Aus dem letzteren fällt die Substanz beim Erkalten aus. Die Untersuchung hat gezeigt, daß es sich augenscheinlich um verschiedene komplexe aromatische Säuren, Depside, im Sinne EMIL FISCHERs handelt, und daß Chlorogensäure selbst in den bisher untersuchten Blättern nicht vorhanden war.

Da die isolierten Blätter-Depside sämtlich die oben angeführten Reaktionen: gelber Bleiniederschlag, Silberreduktion, Eisenreaktion wie Brenzkatechin, geben, so wird es sehr wahrscheinlich, daß die eingangs mitgeteilten mikrochemischen Reaktionen mit Eisenchlorid, Osmiumsäure, Kaliumbichromat, aber auch die Silberreduktionsprobe, sämtlich demselben Chloroplastenbestandteil angehören, und daß die so scharfe Lokalisation der Silberprobe daherrührt, daß sofort ein Silberniederschlag entsteht, der sich an Ort und Stelle schwärzt. Bei den anderen Reaktionen, auch bei der Osmiumprobe, hat der reduzierende Körper Zeit aus den Chloroplasten herauszudiffundieren, und man erhält im Zellumen die entsprechend schwachen „Gerbstoffreaktionen".

Es erscheint somit nachgewiesen, daß die Ursache der Silberreduktion der Chloroplasten in verschiedenen Depsiden zu suchen ist, welche wahrscheinlich mit dem Kohlensäure-Assimilationsprozeß nichts zu tun haben werden. Es ist aber nicht überflüssig zu bemerken, daß die starke Silberreduktion in der Kälte bei aromatischen Verbindungen recht verbreitet ist. Auch eine Aminosäure, das von

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

TORQUATI und GUGGENHEIM aus den Fruchtschalen der *Vicia Faba* isolierte Dioxyphenylalanin, verhält sich analog, und könnte noch in Blättern nachgewiesen werden.

Hinsichtlich der mikrochemischen Lokalisation fiel mir öfters auf, daß eine schalenförmige Partie in der Peripherie der Chloroplasten besonders stark reduziert. Doch braucht dies nicht auf eine periphere Lagerung der Depside bezogen zu werden, sondern könnte auch auf der raschen Bildung von Niederschlagshäutchen beim Eindringen der Lösung in die Chloroplasten beruhen. Bei der Untersuchung der Verbreitung und der relativen Intensität der Reaktion, die in den Wintermonaten vorgenommen wurde, sah ich, daß viele unserer Warmhauspflanzen, ja die meisten derselben, die Silberprobe schwächer zeigten, hingegen die Kalthausgewächse, und die überwinternden Blätter der Freilandpflanzen in der Regel sehr stark. Worauf dieser Unterschied beruht, vermag ich noch nicht zu sagen. Es könnte der im allgemeinen wenig günstige Ernährungszustand der Insassen des Warmhauses im Winter in Betracht kommen, aber auch ein tatsächlicher spezifischer Unterschied. Jedenfalls gelang es mir nicht, durch Einstellen kräftig reduzierender Kalthaus-Pflanzen in das Warmhaus, bis zu wochenlanger Dauer, die Silberreaktion abzuschwächen. An einen direkten Einfluß der Temperatur ist daher kaum zu denken.

Die bisher gänzlich übersehene, so große Verbreitung krystallisierbarer depsidartiger Verbindungen in Laubblättern legt den Verdacht nahe, daß viele dieser Stoffe den bisher angegebenen „Blättergerbstoffen" zugrundeliegen, nachdem anscheinend niemals anderes Material als getrocknete Blätter den Untersuchungen zur Basis diente. In der Tat konnte ich mich leicht überzeugen, wie schnell die krystallisierbaren Depside durch Enzymwirkungen verloren gehen, und wie leicht andererseits in den Blättern und Extrakten dunkle kolloide Produkte durch Kernkondensation und Polymerisierung entstehen. Legt man Blätter irgend einer passenden Pflanze, z. B. *Aegopodium Podagraria*, möglichst von den saftigen Stielteilen befreit, im Zimmer zum Trocknen auf, zerreibt das trockene, noch schön grün gefärbte Material und extrahiert mit siedendem Wasser, so ist trotzdem bereits ein Teil der Depside verloren. Besser ist die Ausbeute, wenn man die Blätter frisch zerschnitten in kaltes Wasser bringt, und nun auf dem Wasserbad allmählich erwärmt. Aber auch da ist weniger unversehrtes Depsid erhältlich, als aus Blättern die mit siedendem Wasser momentan auf 100 Grad erhitzt werden, offenbar, weil die Enzyme im ersten Falle Zeit genug haben um merklichen Umsatz zu bewirken.

© Biodiversity Heritage Library, http://www.biodiversitylibrary.org/; www.zobodat.at

Werden die Blätter in dünner Schicht im Thermostaten bei 55 Grad getrocknet, so genügt die kurze Zeit, da sie getötet und noch feucht liegen, um die Depsidreaktionen zu schwächen. Noch viel weniger der nativen Stoffe bleibt erhalten, wenn man die mit Glasstaub verriebenen Blätter 1—2 Tage lang bei mäßiger Wärme mit Wasser bedeckt stehen läßt, oder die ganzen Blätter in Chloroformdampf bei 55 Grad hält. Im letzteren Falle ist nach 2 Tagen die Eisenreaktion bis auf Spuren verschwunden, und die FOLINsche Probe negativ, wenn man die Methyl-Äthylalkoholextrakte in der oben angegebenen Weise prüft.

Prag, Pflanzenphysiol. Institut der Deutschen Universität.

---

32. M. Möbius: Die Entstehung der schwarzen Färbung bei den Pflanzen.

(Eingegangen am 14. Juli 1920.)

Je länger man sich mit den Farben der Pflanzen beschäftigt, um so mehr überzeugt man sich von der Mannigfaltigkeit der Mittel, mit denen die Natur diese Farben hervorbringt. Im besonderen Maße ist dies der Fall bei Weiß und Schwarz, die wir im physiologischen Sinne doch auch zu den Farben rechnen dürfen. Da eine ausführliche Darstellung dieser Verhältnisse noch nicht so bald erfolgen kann, möchte ich hier nur eine Übersicht der Ursachen geben, auf denen die schwarze Färbung bei den Pflanzen beruht, und zugleich auf einige neue Farbstoffe oder Farbstoffmodifikationen aufmerksam machen. Vorauszuschicken ist, daß es sich in den meisten Fällen nicht um einen wirklich schwarzen, sondern um einen blauen, roten oder braunen Farbstaff handelt, so daß noch andere histologische Momente, wie das Vorhandensein anderer Farben im darunterliegenden Gewebe oder durch Luft undurchsichtiger Unterlagen u. dergl. in Betracht kommen. Wir finden also folgendes:

I. Der Zellinhalt ist gefärbt, die Membran nicht:

1. Der Farbstoff ist an das Plasma gebunden: Die Räschen einiger fadenförmiger Cyanophyceen besitzen eine schwärzliche Färbung. So beobachtete ich im Gewächshaus auf

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft

Jahr/Year: 1920

Band/Volume: 38

Autor(en)/Author(s): Czapek Friedrich

Artikel/Article: Zur Kenntnis der silberreduzierenden Zellsubstanzen in Laubblättern. 246-252