

# Zur Keimungsgeschichte der Erbse

Von ERICH MUHLACK, Königsberg (Pr.)

Mit 3 Figuren

## Einleitung

„Corpora non agunt nisi fluida.“ Dieser in der Chemie bei erhöhter Reaktionsfähigkeit in flüssiger Phase häufig zitierte Satz ist für die Lebenstätigkeit der pflanzlichen Organismen im physiologischen Sinne von starrer Gesetzmäßigkeit. Chemische Reaktionen und Umsetzungen in fester Phase sind nach den Untersuchungen von TAMMANN in der Chemie durchaus erwiesen; eine aktive Lebenstätigkeit erfolgt schon bei einfachsten Lebewesen stets in kolloider Lösung, also stets in Gegenwart von Wasser. So ist auch die Voraussetzung für die Entwicklung einer Pflanze aus einem reifen trockenen Samen das Vorhandensein von Wasser; der erste Vorgang bei der Keimung also besteht in einer Wasseraufnahme, die zu einer Quellung des Samens führt. Dadurch ist der Weg für die weitere Entwicklung frei, der beim normal keimenden Samen wahrscheinlich über gesteigerte Fermentproduktion zur Mobilisierung von vorhandenem Reservematerial führt, wobei dann „aufbauende“ Fermente eine Weiterentwicklung durch Zellteilung und Zellwachstum ermöglichen. Das Primäre ist also bei der Samenentwicklung die Wasseraufnahme.

Versuche, die bei der analytischen Bearbeitung des Problems der Stickstoffabgabe von keimenden Erbsen gemacht wurden, und die in ihren Ergebnissen im nächsten Kapitel der vorliegenden Arbeit geschildert werden sollen, sowie Modellversuche zur Ermittlung der Permeabilität der Samenschale führten nun zu der Frage nach der Art der Wasseraufnahme durch den Samen, d. h. also: Ist diese für den Samen und auch für die Samenschale nur ein reiner Quellungsvorgang, oder liegen hier unter direkter Beteiligung der Samenschale andersartige Verhältnisse vor? Und ferner führt uns die Keimungsgeschichte eines Samens, wir wählten in unseren Versuchen die Erbse, zu den auf die Quellung folgenden oder auch schon während der Quellung einsetzenden Stoffwechselvorgängen. Hier erschien uns die Frage nach dem Stickstoffgehalt in den

einzelnen Stadien der Keimung bemerkenswert schon im Hinblick darauf, ob für den keimenden Samen ähnliche Verhältnisse vorliegen wie für die fertige grüne Pflanze, die außerordentlich sparsam mit dem so lebenswichtigen Stickstoff wirtschaftet.

Die Ergebnisse, die nun in diesem Abschnitt der Arbeit gewonnen wurden, bildeten für eine neue Frage eine Anregung, nämlich für die Frage nach der selektiven Permeabilität der Samenschale, die im dritten Abschnitt behandelt werden soll und für die im Zusammenhang damit sich ergebenden Fragen, die zum Schluß dieser Arbeit experimentell bearbeitet worden sind.

## Teil I

Legt man trockene Erbsen in stark verdünnte Farbstofflösungen (0,1 %) von Wasserblau oder Congorot, Farbstoffen, die, wie im dritten Abschnitt dieser Arbeit experimentell nachgewiesen ist, die Samenschale überhaupt nicht durchdringen, so findet man nach ungefähr 16 Stunden, nachdem die Hauptmenge des zur Quellung der Samen erforderlichen Wassers aufgenommen ist, folgendes Bild: In der Mikropyle und um die Mikropyle herum bemerkt man eine dunklere Färbung der Schale durch den Farbstoff als an den anderen Stellen, ja bei Wegnahme der Samenschale zeigen die gequollenen Kotyledonen nur an der Stelle unter der Mikropyle der Samenschale Farbflecke, deren Vorhandensein folgendermaßen erklärt werden kann: Bei der Wasseraufnahme des Samens wird in besonders starkem Maße Farbstofflösung durch die Öffnung der Mikropyle in das Sameninnere gelangen, wobei dort das Wasser zur Quellung von den Kotyledonen aufgenommen wird, während der schwer permeierende Farbstoff in der Gegend der Mikropyle infolge der Konzentrationserhöhung ausgefällt wird, und so die lokale dunklere Färbung der Schale und auch des Sameninneren bewirkt. Diese Tatsache und ihre Erklärung stehen im Einklang mit der verbreiteten Meinung, daß bei der Keimung des Samens die Hauptwasseraufnahme durch die Pforte der Mikropyle der Samenschale erfolgt.

Schon im Jahre 1911 zeigte aber SCHRÖDER (8) bei Keimungsversuchen an Erbsen, daß eine Wasseraufnahme und damit eine Quellung auch dann erfolgte, wenn er die Samen in feuchten Sand legte, wobei die Mikropyle nach oben aus dem Sand herausragte. SCHRÖDER schloß daraus, daß die Wasseraufnahme bei der Keimung

in diesem Falle durch die Samenschale erfolgte. Streng beweisend war nun dieser Versuch nicht, da ja das Wasser durch Adhäsionswirkung der Schale der Mikropyle hätte gelangen können, aber eigene Versuche mit Erbsen, deren Mikropyle mit Paraffin oder besser noch mit Canadabalsam verschlossen waren, führten ebenfalls zu einer Wasseraufnahme und Quellung des Sameninneren, die aber hier allein durch die Samenschale erfolgte. Diese Versuche wurden mehrfach wiederholt und verbreitert, derart, daß die Erbsen mit verschlossener Mikropyle auch in verdünnte Farbstofflösungen von die Samenschale nicht permeierenden Farbstoffen eingelegt wurden, und stets konnte das gleiche Bild der Wasseraufnahme durch die Schale beobachtet werden. Hierdurch wurde die mögliche Beeinflussung des Resultats durch etwaige in der Samenschale vorhandene Risse ausgeschlossen, weil derartige Risse in der Samenschale bei den Versuchen mit Farbstofflösungen ein ganz anderes Bild ergeben hätten. Da nur solche Versuche gewertet wurden, bei denen das Schalen- und das Sameninnere vollkommen ungefärbt waren, dienten diese nicht permeierenden Farbstofflösungen gleichzeitig als Kriterium für die Unverletztheit der Samenschale und für die absolute Dichtheit des Mikropylenverschlusses.

Aus diesen Versuchen folgt also, daß die Samenschale für Wasser permeabel ist. Es entsteht nun die Frage, wie erfolgt der Flüssigkeitsdurchgang durch die Samenschale, erleidet diese hierbei Veränderungen etwa durch Wasseraufnahme oder findet kein derartiger Einfluß des Wassers auf die Samenschale statt?

Um dies entscheiden zu können, vergegenwärtigen wir uns das anatomische Bild eines Querschnittes der Samenschale von *Pisum*: Die Epidermiszellen des Außeninteguments, also die äußerste Schicht der Samenschale, sind palissadenartig gestreckt, zeigen an ihrem äußeren Ende eine schmale Lichtzone und schließen lückenlos aneinander. Eine Kutikula oder jedenfalls eine solche im Sinne einer verkorkten Haut, wie MÖLLER (6) sie in seiner „Mikroskopie der Nahrungs- und Genußmittel“ angibt, ist nicht vorhanden, was noch später im zweiten Teil dieser Arbeit experimentell belegt werden soll. Das Lumen der Palissadenzellen ist nach innen hin verbreitert, wobei die Zellwandungen etwas gewellt und verdünnt sind. Die folgende Zellschicht der Sanduhr- oder Trägerzellen, auch als Hypoderm bezeichnet, gehört zu den Zwischenlagen im Außenintegument und zeigt, wie der Name schon sagt,

charakteristische Sanduhrform der Zellwände. Sie enthalten keine sichtbaren Kristalleinlagerungen.

Das alsdann zu beobachtende Schwammparenchym, die innerste Schicht der Samenschale, ist nach seiner Integumentzugehörigkeit fraglich. Nach den Angaben von NETOLITZKY (7) pflegt das zweite Integument zerdrückt zu werden. Wir konnten hier auch nicht einen Nachweis des Vorhandenseins einer Innenkutikula erbringen.

Betrachtet man einen derartigen Querschnitt einer Erbsenschale bei mittlerer Vergrößerung mit dem Vertikalilluminator in lufttrockenem Zustande, so bemerkt man, daß die Lumina der Palissadenzellen schwarz gefärbt sind, ein Bild, das beim Einlegen trockener Schnitte in Paraffinöl oder in Glyzerin noch viel deutlicher wird. Anders dagegen, wenn man zu einem trockenen Schnitt unter dem Deckglas seitlich Wasser zusetzt. Während bei Beobachtung in Paraffinöl oder in Glyzerin, bei letzterem in nicht zu langer Zeit, keine sichtbare Veränderung, abgesehen von einer geringen Entfaltung in radialer Richtung eintritt, ist jetzt eine sofort nach der Wasserzugabe eintretende sehr beträchtliche Volumenvergrößerung und stärkere Krümmung des vorher schwach gewölbten Schnittes zu beobachten. Die Wasseraufnahme, denn sie muß ja der Grund der Volumenänderung sein, hört nach einiger Zeit auf: das Volumen des gequollenen Schnittes ändert sich nicht mehr. Nachstehende Tabelle gibt nun zahlenmäßig die Größenverhältnisse eines Samenschalenschnittes in lufttrockenem Zustande und nach Zugabe von Wasser wieder. Die Messung erfolgte derart, daß mit Hilfe des ABBESCHEN Zeichenapparates der Schnitt vor und nach der Wasserzugabe gezeichnet wurde, wobei dann aus den Zeichnungen die Schnittlänge durch Abgreifen mittels einer in den Greifzirkel genommenen kleinen Meßstrecke auch für diese schwach gekrümmten Linien mit hinreichender Genauigkeit bestimmt wurde.

Tabelle über die gemessene Längenausdehnung von Schnitten der Samenschale in verschiedenen Medien

Objekt	Untersucht in	Längenausdehnung		
		I	II	IIa
2 Radialschnitte der Samenschale v. PISUM	Luft (mit Vertikal- illuminator)	10	10	17
Dieselben Schnitte	Wasser	12	13	22

Durchschnitt der Längenzunahme im Mittel:  $2,5 = \frac{1}{4}$  der Länge des trockenen Schnittes.

**Tabelle über die gemessene Änderung der Schnittbreite in verschiedenen Medien**

Objekt	Untersucht in	Mittelwerte der Breite	
2 Radialschnitte der Samenschale v. PISUM	Luft (Objektiv mit Vertikal- illuminator)	I	II
		Lichtzone .....	I I
		Stabzellen .....	19 19
		Sanduhrz. und Parenchym ..	5 8
Dieselben Schnitte	Wasser	Gesamtbreite	25 28
		Lichtzone .....	2 2
		Stabzellen .....	20 20
		Sanduhrz. und Parenchym ..	12 13
		Gesamtbreite	34 35

Hiernach beträgt die Längenausdehnung im Durchschnitt ein Viertel der trockenen Schale. Die Ausdehnung in radialer Richtung in bezug auf den ganzen Samen ist weniger beträchtlich. Auffallend ist hierbei die starke Quellung der Lichtzone und des Parenchymgewebes. Jedoch ist die Ausdehnung in radialer Richtung im Vergleich zur Ausdehnung in tangentialer Richtung, wie schon bemerkt, unerheblich. Eine einfache rechnerische Betrachtung soll dies erläutern. Machen wir von einer in zwei Hälften geteilten Erbse einen Schnitt, und zwar parallel der Teilfläche, so erhalten wir für die Samenschale einen Kreisring, der unter der praktisch berechtigten Annahme, daß die Erbse Kugelgestalt hat, einen Großkreis darstellt. Für einen solchen Großkreis beträgt die Längenausdehnung, also die Vergrößerung des Kreisumfanges durch Quellung, wie wir gesehen haben, ein Viertel der Länge des trockenen Kreisringes. Da nun der Umfang eines Kreises eine einfache Funktion des Radius ist, so wird sich in unserem Falle der Radius des Kreisringes um denselben Betrag, also um ein Viertel seiner früheren Länge bei der Quellung ausdehnen. Bei der sehr geringen Dicke der Samenschale (sie beträgt in trockenem Zustande  $\frac{1}{70}$  des Erbsenradius) wird eine Zunahme der Schalendicke um das Doppelte (sie reicht in Wirklichkeit nicht an den doppelten Wert heran, siehe Tabelle), erst  $\frac{1}{18}$  der der Zunahme des Kreisumfanges entsprechenden Längenzunahme des Erbsenradius betragen, also im Vergleich zu dieser unbeträchtlich sein. Oder m. a. W.: die Zunahme der Schalendicke =  $\frac{1}{70}$  des Radius und die bei unserem Versuch der der Ausdehnung in tangentialer Rich-

tung entsprechende Zunahme des Radius =  $\frac{1}{4}$  des ursprünglichen Radius, verhalten sich in unserem Versuche wie  $\frac{1}{70} : \frac{1}{4} = 1 : 17,5$ . Bei Betrachtung des Keimungsverlaufes zeigt sich uns eine Bestätigung der starken Längenausdehnung in tangentialer Richtung. Die Samenschale nimmt schnell Wasser auf und legt sich dabei in Falten, weil sie an einigen Stellen fest an den Kotyledonen adhäriert und sich erst nach längerer Zeit ablöst. Die Ausdehnung in tangentialer Richtung ist sehr viel größer als in radialer Richtung, da die Runzeln der Schale stets Hohlräume darstellen. Eine solche Faltenbildung ist außerdem nur deshalb möglich, weil das von der Schale umschlossene Volumen der Veränderung nicht Schritt hält, denn die Kotyledonen quellen sehr langsam. Es sei hier noch erwähnt, daß man die Quellung des Parenchyms bei nicht zu dünnen Schnitten messen muß, da es sich bei sehr dünnen Schnitten oft teilweise losgelöst hat und dann gar nicht gemessen wird.

Aber noch eine überaus wichtige Beobachtung kann man bei Wasserzugabe zu einem trockenen Schnitt machen, eine Beobachtung nämlich, die eine ganz besondere Art der Wasseraufnahme durch die Erbsenschale zu erkennen gibt:

Die in trockenem Zustande schwarz gefärbten Lumina der Palissadenzellen werden bei Einlegen in Wasser hell und durchsichtig, sie füllen sich also mit Wasser, ohne daß in einem von den zahllosen und auch leicht reproduzierbaren Versuchen ein Austritt von Luft in Gestalt von Luftbläschen bemerkt worden wäre. Aber ganz abgesehen davon, daß niemals Luftbläschen beobachtet worden sind, könnte Wasser, das ja in bezug auf Luft gesättigt ist, in lufterfüllte Zellräume gar nicht eindringen.

Das Lumen der Stabzellen, das in trockenen Präparaten infolge seiner Schwärze mit Luft erfüllt zu sein scheint, ist, das folgt zwingend aus den Versuchen, luftleer und mit Wasserdampf erfüllt, der bestenfalls gesättigt ist. Da nun die Dampfspannung für Wasser bei gleichem Druck abhängig von der Temperatur ist und diese bei gewöhnlicher Temperatur von  $15^{\circ} 13$  mm beträgt, so ist leicht ersichtlich, daß in den Lumina ein Unterdruck herrscht gegenüber dem Druck außen. Aus der Tatsache, daß ein Unterdruck in der trockenen Samenschale vorhanden ist und auch erhalten bleibt, folgt die Undurchlässigkeit der Schale für Luft; hingegen ist diese durchlässig für Wasser: Beweis hierfür die Wasseraufnahme bei verschlossener Mikropyle, wie wir sie vorher erwähnt haben.

Es liegen also hier in der Samenschale Verhältnisse vor, wie wir sie von einem Kohäsionsmechanismus her kennen. Auch hier ist die Voraussetzung eine für Luft undurchlässige Zellmembran, die für Wasser durchlässig ist und infolge ihrer Elastizität eine Deformierbarkeit zuläßt. Die durch die Kohäsionskraft des Wassers bewirkte Formänderung gewisser elastischer Membranstellen der einzelnen Zellen ergibt durch Summierung eine nach außen hin sichtbare Bewegungserscheinung. Da aber bei der Erbsenschale die Zellmembran der Palissadenzellen dick und fest ist und die Zellen durch Aneinanderlagerung eine Deformierbarkeit nicht zulassen die Palissadenzellen bilden ja nach Tschirch [10] ein mechanisches System, das auf Abwehr radialer Drucke eingestellt ist), spricht man hier besser von einem Saugmechanismus der Samenschale, bedingt durch den Unterdruck in dem Lumen der Palissadenzellen. In der Reversibilität des Saugmechanismus sehen wir ferner ebenfalls eine Übereinstimmung mit einem Kohäsionsmechanismus und namentlich mit einem Entfaltungsmechanismus. Legt man nämlich Schnitte, die eine Zeitlang in Wasser gelegen haben, in trockenes Glyzerin (durch Erhitzen auf 160° erhalten), das energisch Wasser anzieht, so sind die schwarzen Lumina der Stabzellen wieder erkennbar; ganz ebenso verläuft der Versuch beim Einlegen feuchter Schnitte in konzentrierte Chlorkalziumlösung. Es sei aber darauf aufmerksam gemacht, daß allmählich die schwarzen Lumina verschwinden, da im Verlaufe von einigen Stunden ein Füllen der Zellen durch die langsam permeierenden Flüssigkeiten stattfindet.

Die aus den vorliegenden Untersuchungen erhaltenen Ergebnisse liefern für den Gesamtorgang der Wasseraufnahme eines Erbsensamens folgendes interessante Bild:

Bei Berührung der Samenschale eines intakten normalen Samens wird die äußerste Schicht der Samenschale, namentlich die in der Zellmembran der Epidermiszellen nach außen gelegene Lichtzone, die uns durch ihre Quellungsfähigkeit bekannt geworden ist, Wasser aufnehmen. Alsdann wird sich der in der Palissadenzellschicht vorhandene Saugmechanismus dahin auswirken, daß Wasser in die Lumina der Palissadenzellen eingesogen wird, da ja im Innern dieser nur mit Wasserdampf gefüllten Zellen ein Unterdruck herrscht. Infolge der damit erzielten Vergrößerung der Berührungsfläche der Samenschale mit dem Wasser wird die Quellung der Radialwände, die inzwischen begonnen haben wird,

in ihrer Geschwindigkeit stark beschleunigt. Das Ergebnis der Wasseraufnahme durch Quellung ist eine beträchtliche Vergrößerung der Samenschale in tangentialer Richtung, die Längenzunahme des Schalenumfangs beträgt etwa ein Viertel der trockenen Schale. In radialer Richtung ist die Wirkung der Wasseraufnahme weniger bedeutend, der Längenzuwachs ist nur  $\frac{1}{18}$  der der Zunahme in tangentialer Richtung entsprechenden Verlängerung des Erbsenradius und wird hauptsächlich durch Entfaltung der Sanduhrzellen und des Parenchymgewebes hervorgerufen. Die so eingetretene Volumenvergrößerung der Samenschale (äußerlich an der Faltung der feuchten Schale sichtbar) bewirkt, da der Inhalt der Schale infolge viel langsamerer Quellung dieser Volumenvergrößerung nicht Schritt hält, ein Hereinsaugen des Wassers durch die Pforte der Mikropyle und auch durch die für Wasser durchlässige Samenschale; letzteres findet ausschließlich dann statt, wenn die Mikropyle durch Canadabalsam verschlossen ist.

Nunmehr kann die Quellung der Kotyledonen beginnen, da diese eine wasserdurchlässige Epidermis und hygroskopisch und osmotisch wirksamen Inhalt besitzen. Die Anschauung von Josr (2), daß bei der Quellung ein Entfaltungsmechanismus zwischen den im trockenen Zustande einander genäherten Kolloidteilchen bei der Wasseraufnahme wirksam wird, ist im Hinblick auf die Entdeckung eines ähnlich wirkenden Saugmechanismus für die Samenschale durchaus wahrscheinlich.

Die Runzelung der Schale wird allmählich durch die Quellung des Samens ausgeglichen, so daß nach Aufnahme der Hauptwassermenge, nach 16 Stunden, der Same wieder fest an der Schale liegt. Erst nachträglich führen die weitere Quellung der Kotyledonen (die Wasseraufnahme nach den ersten 16 Stunden hält noch, wenn auch in stark verminderter Maße an), die Entfaltungsbewegung und das Wachstum der Keimwurzel und Keimblätter zu einem Sprengen der Samenschale.

Die Samenschale bei *Pisum* spielt somit eine wesentliche Rolle bei der Wasseraufnahme und ist zu dieser Funktion durch einen toten Mechanismus befähigt.

## Teil II

Die Frage nach der Stickstoffbilanz einer keimenden Erbse, die uns in diesem Teil der Arbeit beschäftigen soll, steht in engem Zusammenhang mit der im vorigen Kapitel besprochenen Wasser-

aufnahme; denn eine derartige Frage setzt ja einen Stoffwechsel voraus, der in bezug auf die Eiweißverbindungen erst bei dem zu aktiver Lebenstätigkeit erwachten Organismus durch die in diesem Zustande erhöhte Fermentproduktion vorhanden ist. Es erschien uns außerordentlich interessant, diese Frage zu klären, nämlich ob bei dem Stoffumsatz der Stickstoffverbindungen eine Stickstoffabgabe, also ein Substanzerlust für die Keimpflanze stattfindet, wie er z. B. für den Kohlenstoff schon nach geringer Wasseraufnahme durch den trockenen Samen unter Veratmung kohlenstoffhaltiger Substanz zu gasförmiger Kohlensäure der Fall ist. Die autotrophe Pflanze geht, das haben eine Reihe von Arbeiten nachgewiesen, sehr haushälterisch mit dem Stickstoff um; ist ja doch der Eiweißstoffwechsel der autotrophen Pflanze dadurch charakterisiert (BENECKE-JOST, S. 338—339), daß Eiweiß aus anorganischen Stoffen aufgebaut wird. Eine Ausnahme bilden die Ruderalpflanzen, die mit Stickstoff überreich versehen sind. Aber hat nicht ein keimender Same, der seinen ganzen Nährstoffbedarf aus den gespeicherten Reservematerialien des Samens bezieht, in seiner Ernährungsweise Ähnlichkeit mit dem tierischen Organismus, der gleichfalls nur fertige, energetisch hochwertige Stoffe resorbiert?

Von diesem Standpunkt aus erscheint uns die analytische Kontrolle des Stickstoffgehaltes in aufeinanderfolgenden fortlaufenden Keimungsstadien durchaus nicht überflüssig, zumal ja das Tier in seinem Stoffwechsel stickstoffhaltige Endprodukte erzeugt, die es als nicht verwertbar ausscheidet.

In der einschlägigen Literatur hat der Eiweißstoffwechsel keimender Samen umfangreiche Bearbeitung gefunden, wobei der Abbau des Reserveeiweißes zu niederen Spaltprodukten (Literaturzusammenstellung CZAPEK [15], Bd. II S. 242—273) und die aus diesen erfolgende Synthese Gegenstand eingehender analytischer Untersuchungen geworden ist. Die Frage nach der Stickstoffbilanz (Literaturübersicht CASTORO [14], Lw. Vers.-St. 1904, S. 41—51) ist dabei meist im Hintergrund geblieben; oder die Ergebnisse sind infolge der Wahl ungeeigneter Bezugsgrößen zweifelhaft.

Eigene Untersuchungen des Kohlehydratstoffwechsels und des Stickstoffgehaltes keimender Sonnenblumensamen haben nämlich gezeigt, daß die peinlichsten und exaktesten Analysen bei physiologischen Untersuchungen in ihrem Wert und ihrer Richtigkeit in erster Linie abhängig sind von der Wahl der Bezugsgröße. Wenn so die Möglichkeit dieses Fehlers bei den üblichen physio-

logisch-chemischen Analysen besteht — daß er sich bemerkbar macht, soll sogleich an dem Beispiel des Stickstoffgehaltes auseinandergesetzt werden —, wo es doch meist nur auf die Änderung der Mengenverhältnisse verschiedener ineinander umwandelbarer Stoffe, also auf relative Größenverhältnisse ankommt, so ist ein derartiger Fehler in der Wahl der Bezugsgröße bei der Stickstoffbilanz pflanzlicher Objekte geradezu verhängnisvoll. Denn hierbei ist man, das muß ganz besonders hervorgehoben werden, bestrebt, absolute Werte zu erreichen, sich also möglichst frei von relativen Zahlen zu machen, die außerdem, wie wir sehen werden, infolge einer variablen Bezugsgröße ungenau werden können.

Da diese Frage grundlegend für unser Problem der Stickstoffbilanz ist, so sind die nachstehenden Zeilen einer kurzen kritischen Betrachtung der üblichen Bezugseinheiten bei physiologischen Untersuchungen vorbehalten.

Eine sehr gebräuchliche Bezugseinheit ist das Trockengewicht. Da dieses jedoch besonders bei Trocknungstemperaturen unter 100° nicht einer absolut wasserfreien Substanz entspricht, so ist es bei keimungsphysiologischen Versuchen üblich, die bei verschiedenen Entwicklungsstadien einer fortlaufenden Entwicklung vorhandenen Substanzmengen unter gleichen Bedingungen zu trocknen, d. h. also gleiche Zeit bei gleicher Temperatur. Anstatt hierdurch, wie es beabsichtigt ist, möglichste Gleichheit im Wassergehalt zu erreichen, begeht man einen Fehler, der oft nicht unerheblich ist. Man läßt nämlich außer acht, daß mit dem Stoffwechsel, wie er z. B. bei der Keimung auftritt, gerade qualitative und quantitative Stoffveränderungen einzelner Substanzkomponenten stattgefunden haben, während die vorhin genannten Trocknungsbedingungen gleiche Eigenschaften der zu trocknenden Substanzen voraussetzen. In der Tat zeigt sich auch bei den einzelnen Keimungsstadien eine weitgehende Verschiedenheit im Wasserverbindungsvermögen, wie an dem Beispiel von *Helianthus annuus* in nachstehender Tabelle ersichtlich ist. Es wurde hier die fettfreie Trockensubstanz verschiedener aufeinanderfolgender Keimungsstadien, die ein Jahr im gleichen, dicht schließenden Exsikkator frei über Chlorkalzium gestanden hatten, bei 80° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet (im ganzen acht Stunden) und dann weiter bei 101° ebenfalls bis zur Gewichtskonstanz. Hier sei bemerkt, daß die Trockensubstanzen der einzelnen Keimungsstadien sich in verschließbaren Wägegläschchen,

und zwar 1—3 g Substanz in jedem befanden.  $1\frac{1}{2}$ —2 Stunden nach dem Herausnehmen aus dem Trockenschrank wurde gewogen. Eine absolute Gewichtskonstanz ließ sich aber nicht erreichen, die Werte schwankten nach dem Trocknen um  $\pm 15\%$ , ein Differieren, daß auch durch weiteres Trocknen nicht zu beseitigen oder zu vermindern war. Auffallend ist die große Hygroskopizität der Trockensubstanzen: in verschlossenen Wägegläschen im dicht schließenden Exsikkator stehen gelassen, nahmen sie nach vierzehn Stunden bis zu 0,25% an Gewicht zu, ein Verhalten, das an die starke Hygroskopizität von gefälltem und geblühtem Aluminiumoxyd erinnert.

Die erste Horizontalreihe gibt das Alter der Keimungsstadien in Stunden an. In der zweiten Reihe sind die Werte der Gewichtsabnahme nach dem Trocknen bei  $80^\circ$  angegeben, und zwar ausgedrückt in Prozent der Anfangssubstanz, die ein Jahr frei im Chlorkalziumexsikkator gestanden hatte. Die dritte Horizontalreihe zeigt die nochmalige Gewichtsabnahme der Trockensubstanz der einzelnen bei  $80^\circ$  getrockneten Keimungsstadien an, die erfolgt, wenn man bei  $101^\circ$  bis zur Gewichtskonstanz trocknet, wobei die Gewichtsabnahme in Prozent der bei  $80^\circ$  getrockneten Trockensubstanz ausgedrückt ist.

Tabelle über das Wasserbindungsvermögen der fettfreien Keimlingstrockensubstanz von *Helianthus annuus*.

Keimungsdauer in Stunden	0	75	102	126	153	169	202	228	265	297
<i>Gewichtsabnahme</i>										
in % der Ausgangssubstanz nach 8 Std.										
Trocknen bei $80^\circ$	3,7	2,7	3,1	2,5	2,3	2,1	2,3	2,6	2,6	2,9
<i>Größte Differenz: 1,6.</i>										
<i>Weitere Gewichtsabnahme in % der Trockensubstanz von <math>80^\circ</math> nach 5 Std.</i>										
Trocknen bei $101^\circ$	0,8	1,1	1,7	2,0	2,6	2,8	3,6	2,7	3,3	3,8
<i>Größte Differenz: 3,0.</i>										

Das Trockengewicht von  $80^\circ$ , das sehr gebräuchlich ist, enthält, das folgt klar aus der dritten Zeile, in den einzelnen Keimungsstadien untereinander verschiedene Mengen Wasser, und zwar weichen der Höchstwert von dem niedrigsten Wert um 3% ab. Ein derartiger Fehler von 3% findet sich natürlich in Resultaten, die sich auf dieses Trockengewicht beziehen, wieder.

Für unsere Untersuchungen der Stickstoffbilanz muß also die Bezugseinheit des Trockengewichtes abgelehnt werden. Denn wenn man auch annehmen könnte, daß die bei 101° getrockneten Substanzen in ihrem Trockengewicht einen verhältnismäßig sicheren Wert darstellen, da auch bei dieser Temperatur die Differenz der Keimfraktionen im Wassergehalt wegfallen würde, so wird eine so hohe Trocknungstemperatur für die meisten physiologischen Untersuchungen des Keimungsstoffwechsels, namentlich für die Stickstoffbilanz ungeeignet sein. Hat doch eine Reihe von Untersuchungen erwiesen, daß bei der Autolyse von keimenden Samen Ammoniak gebildet wird, ja nach Versuchen von KIESEL (16, 12, 13) nach 25 Tagen bis 13,61% des Gesamtstickstoffs bei 2,4% im Kontrollversuch. Wenn es auch bei lebenden Keimpflanzen kaum zu einer derartigen Ammoniakanhäufung kommen wird, so folgt doch aus den Autolyseversuchen, daß Ammoniak als intermediäres Zwischenprodukt entstehen kann. PRIANISCHNIKOW (22) folgert auch aus dem parallelen Verlauf der Ammoniak- und Amidkurve beim Eiweißstoffwechsel an Keimlingen, daß die Bildung von Asparagin und anderen Amiden in engem Zusammenhang steht mit der primär erfolgenden Ammoniakbildung. Ähnliche Verhältnisse intermediärer Ammoniakbildung im Eiweißstoffwechsel von Blättern ausgearbeitet zu haben, ist das Verdienst von MOTHES (19).

Eine hohe Trocknungstemperatur würde also leicht zu Stickstoffverlusten infolge von Ammoniakverflüchtigung führen, da ja jedem Chemiker bekannt ist, daß aus wässrigen Ammoniumsalzen besonders solchen organischer Säuren, wo also Ammoniak sogar an Säure gebunden vorliegt, beim Eindampfen Ammoniak entweicht und die Lösungen sauer werden.

Weit besser als die Bezugseinheit des Trockengewichts zu wählen ist es, die Analysen bei physiologischen Untersuchungen auf das Einzelindividuum, den Samen oder Einkeimling zu beziehen. Man macht sich dabei auch z. B. bei Bestimmung des Stickstoffgehaltes unabhängig von dem relativen Wassergehalt eines Stadiums, da der Stickstoffgehalt eines Einkeimlings aus der Gleichung errechnet wird:

$$gN \text{ im Einkeimling} = \frac{g N \text{ i. Substanzmenge } s \times Eg.}{S.}$$

wobei bedeutet

Eg = Gewicht eines Einkeimlings in Gramm,  
S = analysierte Substanzmenge in Gramm.

In dieser Gleichung ändern sich bei Wasserabgabe durch Trocknen Einkeimlingsgewicht (im Zähler stehend) und die angewandte Substanzmenge (im Nenner) durch Multiplikation mit dem gleichen Faktor der Wasserabgabe im gleichen Verhältnis, wobei an dem Gesamtresultat nichts geändert wird. Hierdurch ist auch der verschiedene Wassergehalt der einzelnen Keimungsstadien entsprechend dem verschiedenen Wasserbindungsvermögen, der bei Verwendung der Bezugseinheit des Trockengewichts das Analysenresultat fehlerhaft beeinflussen konnte, durchaus belanglos.

Ich benutzte in meinen Untersuchungen über die Stickstoffbilanz von keimenden Erbsen die letztgenannte Bezugseinheit des Einkeimlings. Da aber ein Trocknen der Keimlinge, die mehr als ihr eigenes Samengewicht an Wasser aufgenommen hatten, aus dem vorhin genannten Grunde eines möglichen Stickstoffverlustes vermieden werden mußte, so wurde ein methodisch anderer Weg eingeschlagen. Die Stickstoffmenge der einzelnen Keimungsstadien wurde nämlich absolut bestimmt, d. h. sämtliche Samen eines Versuches wurden zur Bestimmung des Stickstoffs nach KJELDAHL aufgeschlossen. Bevor ich aber auf die experimentellen Einzelheiten der Versuchsanordnung eingehe, muß ich hervorheben, daß meine Versuche sich von ähnlichen der Literatur, die ebenfalls zur Feststellung der Stickstoffbilanz keimender Samen die Bezugseinheit des Einkeimlings benutzten (es sind dies neben Arbeiten der älteren Literatur in neuerer Zeit die viel zitierte Arbeit von CASTORO [14]), sich in einem anderen Punkte methodisch unterscheiden. M. E. ist dieser aber für die exakte Bearbeitung dieses Problems sehr wesentlich: nämlich die Keimung der optimal sterilisierten Samen unter sterilen Bedingungen, also die absolute Sterilität, die bei meinen Versuchen erstrebt wurde, und die auch in fast allen Fällen erreicht wurde, wie der Ausfall von Kontrollreaktionen gezeigt hat. Daß eine solche Forderung der absoluten Sterilität hier angebracht, lehrt uns folgende Beobachtung: Lassen wir Erbsen in destilliertem Wasser bei Zimmertemperatur keimen, so beobachten wir schon mit bloßem Auge nach etwa  $1\frac{1}{2}$  Tagen eine Trübung des überschüssigen Wassers, ja nach zwei Tagen ist dieses undurchsichtig und milchig trüb geworden. Es hat sich hier nämlich eine starke Bakterienflora entwickelt, da der Same organische Substanz abgegeben haben muß. Daß nun die analytische Untersuchung des Keimungsmediums, in obigem Beispiel Wasser, auf Stickstoff bei einer Stickstoffbilanz keimender Samen unerläss-

lich ist, brauchte ich nicht besonders hervorzuheben. Bei Vorhandensein von stickstoffbindenden Bakterien in dem Keimungsmedium würde man aber ein unrichtiges Bild gewinnen, man könnte also die Frage nach der Möglichkeit einer Stickstoffabgabe an das Keimungsmedium auf diesem Wege gar nicht exakt entscheiden.

Dank der bahnbrechenden und methodisch ausgezeichneten Arbeit von KLEIN und KISSEr (18) „Die sterile Aufzucht höherer Pflanzen“ war es nicht schwierig, für meine Versuche eine geeignete Sterilisationsmethode ausfindig zu machen. In der Vorbehandlung der Samen und der Sterilisationstechnik schloß ich mich außer einigen apparativen Änderungen an die Angaben der oben genannten Autoren an.

**Versuchsanordnung:** Die Samen von *Pisum sativum* der Sorte Buchsbaum wurden nach drei verschiedenen Größen ausgelesen, von der Mittelgröße nur solche Erbsen mit intakter, vollkommen gesunder und fleckenfreier Schale ebenfalls einzeln herausgelesen, — das Auslesen der fleckenfreien Erbsen ist für die Sterilität von großer Bedeutung — und das Gewicht von je 100 Samen bestimmt. Diese Gewichte von je 100 Stück der gleichmäßig kühle und trocken aufbewahrten Erbsen sind in der Tabelle S. 457 wiedergegeben; sie weichen, wie man sieht, wenig voneinander ab. Die Gewichtsdifferenz des höchsten und des niedrigsten Wertes beträgt 1,1 % des berechneten Mittelwertes.

**Sterilisation mit Brom:** Die zu je 100 Stück gezählten und gewogenen Erbsen konnten nun sterilisiert werden, und zwar verwendeten wir hierzu einprozentige wässrige Bromlösung. KLEIN und KISSEr haben nämlich in ihren vergleichenden Untersuchungen gefunden, daß dem Brom vor allen anderen Sterilisationsmitteln wie auch Sublimat, Wasserstoffperoxyd, Formaldehyd oder anderen die größte und sicherste Wirksamkeit kommt. Auch haben sie die Unschädlichkeit von einprozentiger Bromlösung auf die Keimkraft von *Phaseolus* experimentell nachgewiesen, dessen Samenschale anatomisch gleichen Bau und ganz analoge Permeabilitätsverhältnisse zeigt wie die der Erbse. Bei Einwirkungszeiten nämlich von 35—40 Minuten war für *Phaseolus* eine Schädigung der Keimkraft nicht festzustellen, wobei hervorzuheben ist, daß diese Zeitdauer sehr bedeutend über der wirk samen Zeit liegt, die zur vollständigen Sterilisation der Samen

notwendig ist. Die anderen *früheren* Arbeiten über die Sterilisation von Samen mit Brom gehen in ihrem Ergebnis auseinander (s. KLEIN und KISSE, S. 20—21). Während NABOKICH (20) und POLOWZOW (21) an den für uns wichtigen Objekten von *Phaseolus* und *Pisum* die relative Unschädlichkeit des Broms bei Konzentrationen von meist  $\frac{1}{2}\%$  für die Samen und die Güte der Sterilisationswirkung festgestellt haben, kommt DE ZEEUW (24) zu weniger guten Resultaten und ARCHICHOWSKIJ (11), der mit einprozentiger Bromlösung Erbsen sterilisierte, beschränkt die Unschädlichkeit dieser Lösung für Erbsen nur auf Sterilisation bei Temperaturen von 25—30° während 30 Minuten, wogegen bei einer Temperatur von 12° Infektion und Keimkraft im gleichen Maße geschädigt werden sollen.

Ich sterilisierte mit einprozentiger Bromlösung während 15 Minuten bei Zimmertemperatur, also viel kürzere Zeit als die meisten Autoren, ja nur die Hälfte der Zeit, die in den genannten Arbeiten als die für die Samen zeitlich ertragbare Grenze zu werten ist. In einem Vorversuch, zu dem 25 Erbsen unter den noch zu beschreibenden Einzelheiten der Vorbehandlung und des Nachwaschens mit einprozentiger wässriger Bromlösung während 15 Minuten sterilisiert wurden, konnte ich keinerlei Schädigung der Keimkraft feststellen. Von den 25 Erbsen, die in stickstofffreier Nährlösung steril in einem mit Wattestopfen versehenen ERLENMEYER-Kolben waren, hatten bei 23 Stück nach  $6\frac{1}{2}$  Tagen die Keimwürzelchen die Samenschale durchbrochen, und zwar waren die Keimwürzelchen verschieden lang von 0,3—2,5 cm. Diese Tatsache der ungleichmäßigen Keimung kann man auch bei gewöhnlicher Keimung beobachten; sie ist durch individuelle Verschiedenheit der Samen bedingt. Die beiden anderen noch nicht gekeimten, aber gequollenen Erbsen zeigten unterhalb der Schale bleigraue Flecke, es handelt sich hier um unter der Schale infizierte Exemplare, die in ihrer Keimkraft hinter den anderen zurückstanden. Ein derartiger Krankheitsbefall, den ich auch bei der Keimung unsterilisierter Samen beobachten konnte, veranlaßte mich, das Saatgut zu den Versuchen noch viel schärfer auszuwählen.

Ein anderes wesentliches Merkmal der Unschädlichkeit der Bromsterilisation unter den genannten Bedingungen für die Samen liegt in der mangelnden Zunahme der Stickstoffmenge, die sich im Keimungsmedium vorfindet, allerdings unter der Annahme, daß aufbauende Prozesse vom lebenden Organismus aus-

gehen. Ich werde hierauf noch später bei der Besprechung der Analysenresultate am Schluß dieses Teiles zurückkommen.

**Sterilisationstechnik und Vorbehandlung:** Die nochmals ausgelesenen, in ihrem Durchschnittsgewicht und ihrer Größe gut übereinstimmenden Erbsen wurden einzeln mit einer Bürste abgerieben, mit vierprozentiger neutraler Seifenlösung (*sapo medicatus*) zwei Minuten lang geschüttelt, einmal mit destilliertem Wasser nachgewaschen und zum Schluß mit Alkohol und Äther zwei Minuten gewaschen, alles dies nach den erprobten Vorschriften

von KLEIN und KISSEK.

Nach dieser Vorbehandlung kamen die Samen zu je 50 Stück in das Sterilisationsgefäß der jetzt näher zu beschreibenden Apparatur, die zur Sterilisation verwendet wurde.

Dieses wurde anschließend an den von KLEIN und KISSEK konstruierten Apparat, der in ihrem

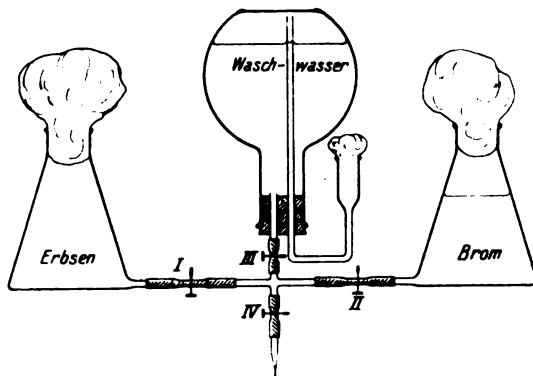


Fig. 1. Schnittzeichnung der Apparatur zur Sterilisation der Samen mit Brom

Buche (18) auf S. 52 abgebildet ist, zusammengestellt und weicht auch im Prinzip von diesem nicht ab. Ja der von uns benutzte Apparat stellt die auf S. 52 abgebildete Apparatur B in größere Dimensionen übertragen dar, ist dieser aber durch die Leichtigkeit in der Herstellung und Zusammenstellung überlegen und ist besonders zur fortlaufenden Sterilisation großer Samenmengen geeignet: An ein Kreuzstück aus Glasrohr sind an zwei Enden mit Gummischläuchen zwei ERLENMEYER-Kolben mit an jedem Kolbenboden seitlich vorhandenem Absatz verbunden. Von diesen Kolben nimmt der eine die zu sterilisierenden Samen auf, während der andere einprozentige Bromlösung (1 ccm auf 300 ccm Wasser) enthält. Beide ERLENMEYER-Kolben sind mit Wattestopfen versehen. Von dem dritten noch freien Ende des Vierwegestücks führt ein Verbindungsschlauch zu einer Waschflasche mit sterilem Wasser, während das vierte Ende durch ein Stück Gummischlauch mit einem zur Kapillare ausgezogenem Glasrohr

verbunden ist. Alle vier Schlauchstücke an dem Kreuzstück aus Giasrohr können durch Quetschhähne abgesperrt werden (siehe Figur 1).

Die so zusammengestellte leere Apparatur wurde im Autoklaven 15 Minuten bei 2 Atm. sterilisiert, und zwar Vierwegestück mit den zwei ERLENMEYER-Kolben mit Ansatz verbunden sowie die übrigen Schläuche tragend einerseits und die Zweiliter-Waschflasche mit destilliertem Wasser gefüllt andererseits. Die freien Schlauch- und Glasenden waren mit Wattestopfen versehen, über die Pergamentpapier gebunden war. Nach der Sterilisation im Autoklaven wurde die Apparatur zusammengesetzt, indem das zugehörige Schlauchende des Vierwegestücks nach Abflammen mit dem ebenfalls abgeflammten freien Ende des kurzen Glasrohres der Waschflasche verbunden, das mit dem anderen Ende aus dem durchbohrten Gummistopfen nur wenig in die Waschflasche hineinragt. Die andere Durchbohrung des Gummistopfens der Waschflasche trägt ein bis auf den Boden der Flasche reichendes zweimal rechtwinkelig gebogenes Rohr, das an dem äußeren Ende eine mit Watte gefüllte Erweiterung trägt. Durch Umkehren der Waschflasche, derart, daß der Kolbenhals nach unten zeigt, erreicht man nach dem Öffnen des zugehörigen Quetschhahns ein Ausfließen des Wassers in der Flasche unter dem Druck seines eigenen Gewichtes, wobei die dem Volumen des ausfließenden Wassers entsprechend hinzutretende Luft die Sterilität nicht beeinträchtigt, da sie ja durch das Wattefilter des langen Rohres filtriert wird. Es sei hier bemerkt, daß nach mehrfachem Sterilisieren der Apparatur unter Druck von 2 Atm. eine Erneuerung der Gummiteile erforderlich ist; bei Verwendung von besten Kautschukstopfen und nahtlosen Gummischläuchen, wie es bei diesen Versuchen der Fall war, war die Haltbarkeit sehr beträchtlich, so daß während der Dauer sämtlicher Versuche nur ein Gummistopfen ersetzt werden mußte. Ferner waren sämtliche Kolben der Apparatur aus Jenaer Glas gefertigt, das sich gegen die beim Abflammen einzelner Teile auftretenden Spannungen infolge von Temperaturdifferenzen als sehr widerstandsfähig erweist.

*Gang der Sterilisation.* Die Handhabung des Apparates bei der Sterilisation geschah folgendermaßen: 50 Erbsen gelangten nach der geschilderten Vorbehandlung in das Sterilisationsgefäß, dessen obere Öffnung abgeflammt und mit dem ebenfalls abgeflammten Wattestopfen verschlossen wurde. Hierauf wurde

durch Öffnen der beiden Quetschhähne, die zu den ERLENMEYER-Kolben gehörten, Bromlösung in das Sterilisationsgefäß mit den darin befindlichen Samen hineingelassen, und zwar bis zur halben Höhe des Sterilisationsgefäßes. Es wurde dann nach dem Zusperren der Quetschhähne das Sterilisationsgefäß während 15 Minuten geschüttelt, derart, daß der obere abgeflamme Teil mit dem Wattestopfen nicht benetzt wurde, da er ja bereits abgeflammt war und nicht mehr benetzt zu werden brauchte; daneben wirkt aber auch der Bromdampf auf diesen Teil ein. Der Olivenaufsatz von KLEIN und KISSEK mit Quetschhahnverschluß ist ja exakter, hat aber den Nachteil, daß Stauungen der fetichten, aneinanderhaftenden Samen beim Entleeren vorkommen können. Die größere Exaktheit wird durch eine größere Infektionsmöglichkeit infolge der längeren Dauer der Manipulationen bei geöffneten sterilen Gefäßern mehr als aufgehoben. Nach dieser Einwirkungszeit wurde die Bromlösung durch Öffnen der entsprechenden Quetschhähne aus der mit einem Ende des Vierwegestücks verbundenen Kapillare nach außen in Lauge abfließen gelassen; worauf eine gleiche Menge sterilen Wassers durch alleiniges Öffnen der Quetschhähne I und III in das Sterilisationsgefäß einfließen konnte. Nach ebenfalls eingehendem Schütteln wurde das Waschwasser wieder nach außen durch die Kapillare abgelassen und das Waschen mit intensivem Umschütteln noch viermal wiederholt. Alsdann erfolgte, nachdem auch die geringen Mengen Bromdampf in dem Wattestopfen sich restlos in dem Waschwasser gelöst hatten und weggeführt worden waren, die sterile Überführung der sterilisierten Samen in die für die Keimungsversuche bestimmten ERLENMEYER-Kolben, die mit steriler, stickstoffreier Nährlösung versehen und mit Wattestopfen verschlossen, 15 Minuten bei 2 Atm. sterilisiert worden waren. Das Überführen der an den Wandungen leicht haftenden Samen geschah mit Hilfe einer steril gemachten Drahtschlinge (durch Abflammen), wodurch die Zeit auf ein Minimum beschränkt wurde und Schütteln und Klopfen des Gefäßes nicht stattzufinden brauchte. Daß bei allen diesen Operationen aseptische Kautelen angewandt wurden, also Sterilisation von Händen und Armen sowie des Arbeitstisches mit zweiprozentiger Phenollösung und Entstauben des Arbeitsraumes durch Wasserdämpfe, versteht sich von selbst und soll hier nicht in allen Einzelheiten wiedergegeben werden. Oberteil und Wattebausch des Sterilisationsgefäßes wurden wieder abgeflammt, und die erneute Einführung der zu sterilisierenden Samen, wie oben beschrieben, konnte darauf erfolgen.

**Keimung der Samen:** Die Keimung von je 100 Samen erfolgte unter sterilen Bedingungen in zwei Gefäßen, also je 50 Stück in einem ERLENMEYER-Kolben, der stickstofffreie Nährösung nach HANSTEEN-CRANNER mit einem Zusatz von sekundärem Kalziumphosphat enthielt. Um die Aussichten, völlig sterile Kulturen zu erlangen, zu vergrößern, beschickte ich einen Kolben mit nur 50 Stück; denn je größer die Zahl der Samen in einem Kolben ist, um so größer ist die Gefahr der Infektion eines ganzen Kolbeninhalts durch Bakterien, die sich infolge ihrer unzugänglichen Lage in oder unter der Schale der Abtötung durch Brom entzogen haben könnten.

Zu einem Versuch wurden 200—300 Erbsen verwendet, wobei sich in der fortlaufenden Versuchsreihe ein Versuch von den vorhergehenden durch die längere Versuchsdauer von 24 Stunden unterscheidet. Der erste Versuch wurde nach 16 Stunden unterbrochen, einer Zeit, in der der Same die Hauptmenge an Wasser, nämlich mehr als sein Trockengewicht aufnimmt. Die weitere Wasseraufnahme ist dann im Vergleich hierzu minimal, was obenstehende Kurve (Fig. 2) der Wasseraufnahme veranschaulicht: 100 Samen wurden in destilliertem Wasser keimen gelassen; nach den auf der Abszissenachse in Stunden angegebenen Zeiten aus dem überschüssigen Wasser herausgenommen, zwischen Filterpapier oberflächlich abgetrocknet und das Gewicht bestimmt. Die auf der Abszissenachse dargestellten Zeiten entsprechenden Ordinaten geben die von einem Samen aufgenommene Wassermenge in mg an. Da nun die fortlaufend gesteigerte Wasseraufnahme aus der Nährösung zu Konzentrationserhöhungen dieser führen würde, wurde, um die Gleichmäßigkeit der Versuchs-

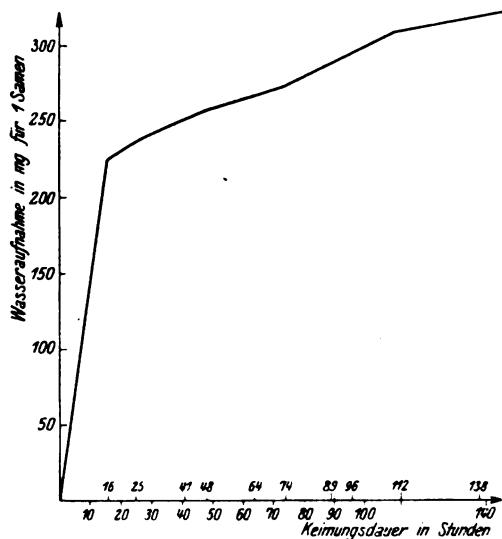


Fig. 2. Kurve der zeitlichen Wasseraufnahme keimender Erbsen

bedingungen bei allen Versuchen zu garantieren, also derartige Konzentrationserhöhungen zu vermeiden, folgendermaßen verfahren: Die während der Dauer eines Versuches von den Samen aufgenommene Wassermenge, die ja aus der Kurve ohne weiteres ablesbar ist, wurde zu Anfang des Versuches zu der Menge der Nährlösung von 25 ccm hinzugesetzt. Man erreicht dadurch, daß die Konzentration des Keimungsmediums am Ende jeden Versuches stets dieselbe ist, also gleich oder fast gleich der der stickstofffreien Nährlösung.

*Kontrollen auf Sterilität:* Von Versuch III, also nach zwei Tagen 16 Stunden, wurden zum Nachweis der absoluten Sterilität Kontrollen ausgeführt, indem kurz vor dem Aufarbeiten des Inhalts eines ERLENMEYER-Kolbens mit 50 Samen zwei Petrischalen mit Glukose-Pepton-Agar ( $\frac{1}{2}\%$  Glukose,  $\frac{1}{2}\%$  Pepton,  $1\frac{1}{2}\%$  Agar, als Flüssigkeit die stickstofffreie Nährlösung nach HANSTEEN-CRANNER) mit je einer Platinöse von dem Keimungsmedium eines Kolbens beimpft wurden. Diese Kontrollversuche wurden vier Tage lang im Brutschrank stehen gelassen. In Spalte VIII der großen Tabelle S. 458, die noch später genauer besprochen werden wird, sind die Ergebnisse der Kontrollversuche auf Sterilität der Lösung eingetragen. Eine frühere Kontrolle, also bei Versuch I nach 16 Stunden und Versuch II nach einem Tag und 16 Stunden, fand nicht statt, da in dieser kurzen Zeit nach der Sterilisation keine so starke Entwicklung von Bakterien erfolgt sein konnte, daß nennenswerte Stickstoffbindung stattgefunden hätte. Besonders solche stickstoffbindenden Bakterien sind in unseren Versuchen als Fehlerquelle zu bedenken. Die rein saprophytisch lebenden Bakterien dagegen sind für das Endergebnis nur gefährlich, wenn ihre Stoffwechselprodukte schädigend auf die Keimung wirken, was aber in so kurzer Zeit bei sterilisierten Versuchen nicht der Fall sein kann, zumal die Samen die Schale noch nicht durchbrochen hatten. In dem weiter unten auszuführenden Vergleich der an das Keimungsmedium abgegebenen Stickstoffmengen der absolut sterilen Versuche und derjenigen mit relativer Sterilität (Versuch I und II) zeigt sich auch die Richtigkeit unserer vorhin angestellten Überlegungen.

*Analytische Verarbeitung nach der KJELDAHL-Methode:* Nach der in Spalte 2 der Tabelle S. 458 angegebenen Zeitdauer eines Versuches unter gleichen Temperaturbedingungen von 17—18° und in Dunkelheit wurden die Samen von dem Keimungsmedium getrennt,

auf einen Trichter gesammelt und mehrfach mit destilliertem Wasser abgespült, und Filtrat und Waschwasser vereinigt nach Zusatz von 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure und einer Spur Sublimat zu weiteren Versuchen aufgehoben. Die abgespülten Erbsen wurden geschält, die Schalen unter Formalinzusatz ebenfalls aufbewahrt, und der Inhalt der Samenschale zur Bestimmung des Stickstoffgehaltes nach KJELDAHL weiter verarbeitet. Hier in *unserem Falle* zeigt sich die Überlegenheit der Stickstoffbestimmung nach KJELDAHL vor der Verbrennungsmethode nach DUMAS, bei der Stickstoff als Gas volumetrisch bestimmt wird; denn erstens ist eine *absolute Bestimmung* des Stickstoffgehaltes eines Teilversuches von 100 Stück Erbsen durch Verbrennung von ca. 46 g Substanzmenge ein Unding; wobei bemerkt sei, daß diese 46 g eines Versuches mehr als 50% Wasser enthalten, während die Verbrennungsmethode kleine Substanzmengen, nämlich 0,1—0,2 g zu einer Bestimmung verwendet und dazu Gewichtskonstanz der Substanz voraussetzt. Abgesehen von der Unmöglichkeit einer absoluten Bestimmung eines Teilversuches von 100 Samen ist die Stickstoffbestimmung einer aliquoten Menge infolge der Unmöglichkeit einer genauen Abwägbarkeit eines Breis mit etwa 50% Wasser einerseits und durch die Möglichkeit eines Stickstoffverlustes beim Trocknen, wie vorhin erwähnt, andererseits auf diesem Wege ebenfalls nicht angängig.

Vielmehr wurde die Gesamtsubstanz ohne vorheriges Trocknen direkt mit konzentrierter Schwefelsäure aufgeschlossen und der Stickstoff in einer aliquoten Menge durch Destillation nach KJELDAHL als Ammoniak bestimmt. Im einzelnen geschah dies folgendermaßen: 50 Samen eines Versuches, deren Schalen, wie erwähnt, entfernt worden waren, wurden in einer Reibschale verrieben und der Brei auf zwei KJELDAHL-Kolben verteilt. Die Reibschale wurde vier- bis fünfmal mit 5—10 ccm konzentrierter Schwefelsäure ausgespült, so daß der gesamte Inhalt quantitativ in die beiden Kolben übergeführt wurde. Ebenso geschah es mit den anderen 50 Samen, so daß also 100 Samen auf vier KJELDAHL-Kolben verteilt waren. In jeden Kolben wurden dann 40 ccm rauchende Schwefelsäure und stickstofffreies Quecksilberoxyd hinzugefügt und 24 Stunden bei Zimmertemperatur verschlossen stehen gelassen. Nach dieser Zeit, in der die Substanz vollständig mit Schwefelsäure durchtränkt war, begann der Aufschluß erst durch Erhitzen mit kleiner Flamme, bis ein Augenblick des Schäumens überwunden war, und

Tabelle des Stickstoffgehaltes der Samen

Versuch	Versuchs-dauer in Std.	Gewicht von 100 Samen	N-Gehalt von $\frac{1}{10}$ des Ver- suches $\frac{n}{5}$ HCl	% N	mg N in 1 Samen	N-Gehalt der Keimlösung $\frac{n}{5}$ HCl	In- fektion
I a	16	23,667	1. 28,12 2. 28,03	3,324	7,867	1,39	—
I b	16	23,859	1. 28,11 2. 28,17	3,304	7,883	1,73	—
II a	40	23,674	1. 27,61 2. 27,61	3,268	7,736	2,39	—
II b	40	23,822	1. 29,08 2. 29,26	3,402	8,104	1,64	—
III a	65	23,702	1. 27,91 2. 27,96	3,273	7,764	1,48	0
III b	65	23,885	1. 28,52 2. 28,60	3,321	7,932	1,75	0
IV	113	23,840	1. 27,92 2. 27,85	3,248	7,744	1,63	0
V a	113	23,630	Es konnte nur der N-Gehalt der sterilen Keimlösung bestimmt werden				1,62
V b	113	23,787	1. 29,09 2. 29,14	3,430	8,158	1,30	$\frac{1}{2}$
VI a	139	23,625	1. 28,04 2. 28,04	3,326	7,857	2,00	$\frac{1}{2}$
VI b	139	23,793	Es konnte hier nur der N-Gehalt der sterilen Keimlösung be- stimmt werden				1,44
Mittelwert .....		23,762		3,322	7,894		
Größte Differenz ..		0,260		0,182	0,422		
Prozent-Abweichung vom Mittelwert ..		1,1		5,5	5,3		

dann mit stärkerer Flamme lege artis bis zum völligen Klarwerden des Inhalts. Hierauf wurde mit Wasser verdünnt, und die Inhalte der vier Kolben, die also insgesamt 100 Samen entsprachen, quantitativ in einen 1-Liter-Maßkolben übergeführt und bei gleicher Temperatur von 15° des Kolbeninhalts zur Marke aufgefüllt. Die Destillation des Ammoniaks geschah (wie üblich) mit natrium-

sulfidhaltiger Natronlauge, und zwar wurde die Destillation im Doppelversuch mit je 100 ccm der stickstoffhaltigen Lösung gleich  $\frac{1}{10}$  des Gesamtaufschlusses aus dem 1-Liter-Maßkolben entnommen ausgeführt. Spalte 4 der Tabelle gibt die Analysenwerte aus zwei Parallelbestimmungen des Verbrauches von n/5 HCl durch den Ammoniakgehalt von 100 ccm der stickstoffhaltigen Lösung wieder.

Dabei zeigt sich folgendes interessante Ergebnis: Trotz gleicher Sorte, gleicher Größe und gleichen Gewichts der Samen finden wir im Vergleich der Stickstoffgehalte von je 100 Stück Schwankungen, die im Extrem 5,5% des aus sämtlichen Versuchen berechneten Mittelwertes betragen. Ja auch durch Ausschalten der Gewichtsunterschiede, die im Extrem 1,1% betragen, indem wir also den Stickstoffgehalt auf Milligramm Stickstoff in einem Samen umrechnen, bleibt eine Abweichung von 5,3% bestehen. Hieraus und aus der Regellosigkeit der Schwankungen von Gewicht und Stickstoffgehalt des Einkeimlings in den einzelnen Versuchen ersehen wir, daß der Stickstoffgehalt individuelle Schwankungen aufweist, die bei größerer Individuenzahl eines Versuches herabgemindert werden können (siehe Arbeit von CASTORO), die aber letzten Endes die Frage nach der Stickstoffbilanz an diesem sehr stickstoffreichen Objekt auf diesem Wege nicht lösen können. Dadurch wird ein interessantes Streiflicht auf andere ähnliche Versuche der Literatur geworfen. Die Tatsache, daß sich noch im Keimungsmedium geringe Stickstoffmengen befinden, die von den Samen im Laufe der Keimung abgegeben werden, ändert nichts an dem oben erhaltenen Ergebnis. In der Tabelle S. 458 bezieht sich die senkrechte Spalte 7 auf die Stickstoffmenge, die von 100 Samen an das Keimungsmedium abgegeben ist; diese schwankt jedoch bei allen Teilver suchen innerhalb kleiner Grenzen, ist also ziemlich konstant und ist außerdem so klein, daß sie das Resultat des Stickstoffgehaltes eines Teilver suches von 100 Samen nicht wesentlich beeinflußt.

**Zusammenfassung:** Zusammenfassend können wir also zu diesem Teil der Versuche folgendes sagen: Der Weg, die Stickstoffbilanz durch Messen am Reinmaterial zu ermitteln, muß als unzulänglich bezeichnet werden. Obwohl wir durch Auslesen der Samen und Stellen auf gleiches Samengewicht bei einer ziemlich einheitlichen Rasse die Stickstoffgehalte auf möglichst gleiche Höhe bringen wollten, bekamen wir so große Differenzen im Stickstoffgehalt von je 100 Stück, daß die Frage nach der Stickstoffbilanz infolge dieser individuellen Schwankungen unbeantwortbar wurde.

Eine mögliche partielle Umwandlung des Eiweißstickstoffes bei der Keimung in Nitratstickstoff, der in unserem Falle nach der KJELDAHL-Methode nicht bestimmt wird, trifft nach den Untersuchungen von E. SCHULZE (23) auch an Leguminosensamen nicht zu. Ein interessantes Nebenergebnis ist vielleicht das unabhängige Schwanken von Samengewicht und Stickstoffgehalt.

*Stickstoffabgabe an das Keimungsmedium:* War die Frage nach der Stickstoffbilanz keimender Erbsen nicht auf direktem Wege zu lösen, so sollte sie doch dahin entschieden werden können, daß ein Stickstoffverlust bei der Keimung stattfindet, der durch die Abgabe geringer stickstoffhaltiger Substanzmengen an das Keimungsmedium bedingt ist. Eine Abgabe von Stickstoff als Stickstoffgas liegt nicht in unserer Denkrichtung. Schon weiter oben wurde auf die in Spalte 7 der Tabelle zusammengestellten, gefundenen Stickstoffmengen in den Keimlösungen von je 100 Stück hingewiesen. Nach diesen analytischen Daten zu urteilen, findet also eine Stickstoffabgabe der Samen statt, doch ist hiermit diese Frage noch nicht endgültig entschieden, da der Beweis ein indirekter ist, und deshalb die bestehenden Möglichkeiten andersartiger Deutung entkräftet werden müssen.

Die Voraussetzung für den exakten Nachweis einer Stickstoffabgabe allein durch die Keimlinge war die Sterilität der Lösungen, in denen die Keimung stattfand. In den folgenden Ausführungen werden diese Lösungen stets als Keimlösungen bezeichnet werden. Die Sterilisation hatte in den meisten Fällen zu einer absoluten Sterilität geführt, die durch die doppelten Kontrollen gestützt wurde. Die anderen Versuche I und II, die infolge der kurzen Versuchsdauer nicht auf Sterilität geprüft wurden, und die übrigen zeigten zum mindesten die relative Sterilität. Durch die Ausführung der Kontrollen wurde auf die Möglichkeit einer Infektion trotz erfolgter Sterilisation Rücksicht genommen, wobei aber die Wahrscheinlichkeit sehr gering ist, daß sich stickstoffbindende Bakterien oder solche, die schädigend auf die Erbsenkeimung wirken, der Abtötung entzogen hätten. Die absolut sterilen Versuche sind unantastbar, die relativ sterilen sind dagegen bei der Auswertung mit Vorbehalt zu benutzen.

Der in den sterilen Keimlösungen tatsächlich vorhandene und quantitativ nach KJELDAHL bestimmte Stickstoffgehalt braucht nun aber nicht von den keimenden Samen allein abgegeben zu sein, er kann vielmehr aus den Samenschalen seinen Ursprung nehmen.

In der Tat weisen die Samenschalen einen beträchtlichen Stickstoffgehalt auf, wovon ein ganz bestimmter Teil, wie die nachstehenden Analysen zeigen, in Wasser leicht löslich ist. Es wurden zu diesen Versuchen ebenfalls ausgelesene Erbsen derselben Sorte, die auch das gleiche Durchschnittsgewicht wie die zu den Stickstoffabgabevorversuchen verwendeten zeigten, in einer Versuchsreihe ohne Vorbehandlung und ohne Sterilisation trocken geschält, während in einer anderen Versuchsreihe die Samen genau der gleichen Behandlung, wie sie bei der Sterilisation stattfand, unterlagen und dann nach dem Trocknen zwischen Fließpapier ebenfalls geschält wurden. Diese doppelten Versuche wurden gleichzeitig zu dem Zwecke unternommen, um einen möglichen Aufschluß oder eine Lösung von stickstoffhaltiger Substanz durch die Brombehandlung festzustellen. Die trockenen Schalen von je 100 Samen (das Schalengewicht war bei allen Versuchen fast konstant) wurden mit 80 ccm verdünnter stickstofffreier Nährlösung genau wie bei den Keimungsversuchen versetzt und 16 Stunden stehen gelassen. Danach fand, nachdem sie von der Lösung getrennt und viermal mit destilliertem Wasser gewaschen worden und an der Luft getrocknet waren, eine erneute Extraktion mit 80 ccm verdünnter stickstofffreier Nährlösung unter genau den gleichen Bedingungen wie bei der ersten Extraktion statt.

Tabelle des Stickstoffgehaltes trocken geschälter Samenschalen

100 Samenschalen	A. Unbehandelt					B. Samen mit Brom behandelt			
	I	II	III	IV	V	I	II	III	IV
N im I. Extrakt..	1,92	2,02	1,82			1,90	1,92	1,75	1,87
Mittel ....			1,92					1,86	
N im II. Extrakt .	0,42	0,29	0,36	0,36	0,31	0,36	0,31	0,31	0,36
Mittel ....			0,35					0,34	
N im III. Extrakt				0,21	0,16				
Mittel ....				0,19					
Unlös. Reststick- stoff nach 3 Ex- traktionen ....	4,68	4,49	4,41			4,50	4,44	4,48	4,48
Mittel ....			4,53					4,48	

Die Extrakte wurden mit 1 ccm Schwefelsäure und Quecksilberoxyd versetzt, eingedampft, mit 5 ccm konzentrierter Schwefelsäure aufgeschlossen und der Stickstoff durch Destillation als Ammoniak nach KJELDAHL bestimmt. In vorstehender Tabelle ist der

Stickstoffgehalt durch die Anzahl der bei der Ammoniakdestillation verbrauchten ccm n/10 HCl angegeben.

Dabei zeigt sich zwischen den sterilisierten und den unbehandelten Samen sehr gute Übereinstimmung sowohl im Stickstoffgehalt der Extrakte der Samenschalen als auch in dem in Wasser unlöslichen Reststickstoffgehalt der Samenschalen; woraus folgt, daß während der Sterilisation keine Abgabe stickstoffhaltiger Substanz, also weder durch Aufschluß noch Lösung stattfindet. Aus diesem und einem anderen Versuch, bei dem die trockenen Schalen zwei Minuten mit 30 ccm stickstofffreier Nährlösung geschüttelt wurden und dabei mehr als 30% ihres Stickstoffgehaltes der ersten Extraktion abgaben, folgt weiter, daß der von den Schalen abgegebene Stickstoff in leicht löslicher Form in der Innenseite der Samenschale sich vorfindet.

Nun zu der Bestimmung der Gesamtmenge des leichtlöslichen Stickstoffs der Samenschalen. Nach dreifacher Extraktion ist die auslaugbare Substanz erschöpft, sie entspricht nämlich im vierten Extrakt einer Menge von 0,05 ccm n/10 HCl und kann, da sie bereits in der Fehlergrenze liegt, vernachlässigt werden. Addieren wir die Stickstoffmengen der einzelnen aufeinanderfolgenden Extrakte ausgedrückt durch die jeweils verbrauchte Anzahl ccm n/10 HCl, so erhalten wir folgende Zahlen:

I.	Extrakt	Mittelwert aus 7 Versuchen	1,89 ccm n/10 HCl
II.	"	" 9 "	0,35 ccm " "
III.	"	" 2 "	0,19 ccm " "
Gesamtstickstoff in leichtlöslicher Form			<u>2,43 ccm n/10 HCl</u>

Um Vergleichsresultate zu haben, berechnen wir alle Stickstoffanalysen auf n/5 HCl.

Die gesamte, unter optimalen Bedingungen auslaugbare stickstoffhaltige Substanz entspricht einer Menge von 1,22 ccm n/5 HCl, während bei allen sterilen Versuchen die Keimlösung stets einen höheren Gehalt aufweist (siehe vorige Tabelle S. 458). Dieser Überschuß wird also, das folgt aus diesen Versuchen, von den keimenden Samen selbst abgegeben, wobei der Betrag der Stickstoffabgabe des Samens in Wirklichkeit noch viel höher ist, da niemals die gesamte Menge der leicht löslichen stickstoffhaltigen Extrakte der Samenschalen auf einmal abgegeben wird. Vielmehr entspricht diese etwa dem Betrag der ersten Extraktion, also etwa 0,96 ccm n/5 HCl, da sowohl bei den Keimungsversuchen als auch bei den

sterilisierten Schalenversuchen die Menge der Flüssigkeit 80 ccm verdünnte stickstofffreie Nährlösung betrug. Und selbst dieser Wert der ersten Extraktion ist noch zu hoch, da bei den Stickstoffabgabeversuchen der Samen die Auslaugung nur von einer Schalenseite, nämlich der Außenseite erfolgen kann.

Durch analytische Untersuchung des in der Samenschale vorhandenen unlöslichen Stickstoffs wurde noch ein letzter möglicher Einwand gegen die gewonnenen Resultate entkräftet, nämlich der, daß die bei den Keimungsversuchen in der Keimlösung befindliche Stickstoffmenge und von dieser namentlich der im Vergleich zu den Schalenversuchen festzustellende Stickstoffüberschuß aus dem unlöslichen Stickstoff stammt, der in den Samenschalen enthalten ist. Die in nachstehender Tabelle (S. 463) zusammengestellten Resultate widerlegen diesen Einwand aufs beste, da in den Keimungsversuchen der noch in den Schalen vorhandene Stickstoff, der sich aus in Wasser leicht löslichem (entsprechend der zweiten und dritten Extraktion) und in Wasser unlöslichem Stickstoff zusammensetzt, stets beträchtlich höher ist als die nach den Analysen der trockenen Schalen erhaltene Stickstoffmenge (2. + 3. Extraktion + unlöslicher Stickstoff der Samenschale).

Stickstoffgehalt der Samenschalen der sterilen Keimungsversuche

Versuch	N-Gehalt der Schalen gekeimter Erbsen $\frac{n}{10}$ HCl	Differenz gegen N-Gehalt trockener Schalen $\frac{n}{10}$ HCl	Vom Samen abgegebene Gesamtmenge N		
			$\frac{n}{10}$ HCl	$\frac{n}{5}$ HCl	in Proz. des N-Gehaltes von 100 Samen
I a	5,98	0,94	3,72	1,86	0,66
I b	5,82	0,78	4,23	2,12	0,75
II a	6,09	1,05	5,82	2,91	1,05
II b	5,63	0,59	3,86	1,93	0,67
III a	5,42	0,38	3,33	1,67	0,60
III b	5,42	0,38	3,88	1,94	0,68
IV	5,16	0,12	3,37	1,69	0,61
V a	5,57	0,53	3,77	1,89	—
V b	5,67	0,63	3,22	1,61	0,55
VI a	5,52	0,48	4,48	2,24	0,80
VI b	5,57	0,53	3,41	1,71	—

## Stickstoffgehalt der Keimlösungen

Ver- such	Versuchs- dauer in Std.	In- fek- tion	Proz. mit durchbroche- ner Samen- schale	N-Gehalt der Keimlösung $\frac{n}{5}$ HCl	N-Gehalt von 10 Samen $\frac{n}{5}$ HCl	Proz. N in der Keimlösung vom N-Gehalt 100 schalen- loser Samen
Ia	16	—	0	1,39	28,08	$\frac{139}{280,8} = 0,5$
Ib	16	—	0	1,73	28,14	$\frac{173}{281,4} = 0,62$
IIa	40	—	0	2,39	27,61	$\frac{239}{276,1} = 0,85$
IIb	40	—	0	1,64	28,83	$\frac{164}{288,3} = 0,57$
IIIa	65	0	24	1,48	27,69	$\frac{148}{276,9} = 0,54$
IIIb	65	0	22	1,75	28,31	$\frac{175}{283,1} = 0,62$
IV	113	0	59	1,63	27,64	$\frac{163}{276,4} = 0,59$
Va	113	0	83	1,62	—	,
Vb	113	$\frac{1}{2}$	86	1,30	29,12	$\frac{130}{291,2} = 0,45$
VIa	139	$\frac{1}{2}$	83	2,00	28,04	$\frac{200}{280,4} = 0,71$
VIb	139	0	86	1,44	—	

Der dem Stickstoffgehalt der Samenschalen der Keimungsversuche (Vertikalreihe II dieser Tabelle) entsprechende Wert im Stickstoffgehalt der *trockenen* Schalen errechnet sich aus Tabelle S. 462 zu 5,04 ccm n/10 HCl (Mittelwert aus sieben Versuchen). Vergleichen wir jetzt die an die Keimlösung von den Samen abgegebenen Stickstoffmengen (s. Tabelle S. 464), so ist hier das Gleichbleiben der Stickstoffgehalte der Keimlösungen sowohl bei den absolut sterilen Versuchen untereinander, als auch im Vergleich dieser mit den anderen Versuchen geradezu auffallend. Diese

Übereinstimmung wird dann klar ersichtlich, wenn man den Stickstoffgehalt der Keimlösung in Prozent des Stickstoffgehaltes der zugehörigen schalenfreien Samen bezieht, wie es in Spalte 7 der Tabelle S. 464 getan ist.

Die innerhalb der ersten 16 Stunden abgegebene Stickstoffmenge bleibt, abgesehen von geringen Schwankungen, konstant, selbst nach einer Zeitdauer von fünf Tagen 16 Stunden. Unsere Überlegungen über die geringe Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins von Stickstoffbindern oder die Erbsen schädigenden Bakterien bei den Versuchen mit relativer Sterilität werden durch den Vergleich und die Übereinstimmung des Stickstoffgehaltes der Keimlösungen dieser letzteren mit den absolut sterilen Versuchen gerechtfertigt. Nichtsdestoweniger ist zur exakten Lösung der Stickstoffbilanz nur sterile Kultur die Voraussetzung. Es ergibt sich aus diesen Untersuchungen, daß Stickstoff von den keimenden Samen schon in den ersten 16 Stunden der Keimung abgegeben wird, daß, um die in der Einteilung dieses Teils gezogene Parallele zum tierischen Organismus wieder aufzunehmen, die Pflanze sich also in dieser Zeit einem Tier nicht unähnlich verhält. Zwar soll damit nicht gesagt sein, daß die stickstoffhaltigen leicht löslichen Stoffe, die bei der Keimung jeder Pflanze entstehen und um die es sich hierbei handelt, im Stoffwechsel der Pflanze nicht mehr verwertbar sind bzw. später nicht mehr entstehen; vielmehr kann man aus der Tatsache, daß weiterhin keine Zunahme der Stickstoffmenge in den Keimlösungen stattfindet, annehmen, daß aus den leicht löslichen stickstoffhaltigen Stoffen mit Hilfe der inzwischen mobiliisierten Reservekohlehydrate der erst später einsetzende Aufbau höherer, nicht mehr löslicher Eiweiße stattfindet. Hierdurch können sich nicht stationär solche Massen von löslicher Substanz anhäufen, daß eine Abgabe erfolgen kann. Diese Anschauung wird nämlich dadurch gestützt, daß, wie im nächsten Teil der Arbeit erwiesen worden ist, im Keimungsverlaufe weder in der Schale noch in den Kotyledonen eine sich bildende Kutikula nachzuweisen ist, so daß eine Diffusion derartiger stationär angehäufter Stoffe durch die äußerste Schicht der Kotyledonen und durch die Samenschale nach außen ungehemmt erfolgen kann. Auch mit zunehmender Zahl derjenigen Erbsen, deren Keimwurzel die Samenschale durchbrochen haben, findet keine Stickstoffzunahme statt; eine Stickstoffabgabe durch junge Keimwurzeln ist also hiernach nicht erwiesen.

Zum Schluß noch einige Worte zu der Möglichkeit der Samenschädigung infolge der Brom-Sterilisation, eine Frage, die schon bei dem Abschnitt der Sterilisation mit Brom behandelt worden ist. Hätte eine Schädigung der Keimkraft der Erbsen durch die Einwirkung von Brom stattgefunden, so würde diese im Stoffwechsel einen nur partiellen oder sehr langsam verlaufenden Aufbau von Eiweiß aus den verfügbaren niederen Spaltprodukten bedeuten; denn bekanntlich werden aufbauende Prozesse immer eher und nachhaltiger geschädigt als abbauende, das Leben erhaltende. Beispiele sind hierfür die so häufig zu beobachtenden Fälle postmortaler Atmung. Bei den Keimungsversuchen würde eine derartige Schädigung sich in einer zunehmenden Anreicherung von Stickstoff in der Keimlösung bemerkbar machen, da in diesem Falle die abbauenden Prozesse, die zu einer Spaltung des Reserveeiweißes zu niederen Spaltprodukten führen, die aufbauenden überwiegen. Aus dem Schwanken der abgegebenen Stickstoffmengen innerhalb kleiner Grenzen, das aber niemals die Tendenz einer Zunahme erkennen läßt, muß also eine teilweise stattgehabte Schädigung der Samen durch Brom verneint werden.

*Zusammenfassung.* — In diesem letzten Abschnitt des zweiten Teiles der Arbeit wurde gezeigt, daß bei der Keimung von Erbsen in sterilen Versuchen eine Abgabe kleiner Mengen Stickstoff von den Samen — neben einer Abgabe von Stickstoff durch die Samenschale — an die Lösung erfolgt, in der die Keimung stattfand. Dieser für den Samen festgestellte Stickstoffverlust liegt zeitlich in der ersten Etappe der Samenkeimung, in der der Same unter Quellung die Hauptmenge des Wassers aufnimmt. Eine derartige Stickstoffabgabe wird natürlich auch in einem anderen, die Samen umgebenden Keimungsmedium stattfinden, sofern die Möglichkeit der Wasseraufnahme besteht. Die Menge des abgegebenen Stickstoffs ist unter Abzug des aus den Schalen stammenden Stickstoffs im Betrage der ersten Extraktion der Schalen etwa 0,2—0,7% des Gesamtstickstoffgehaltes der schalenlosen Samen. Die Tatsache, daß die einzelnen Versuche trotz verschieden langer Zeitspanne untereinander übereinstimmende Stickstoffmengen (in Prozent des Gesamtstickstoffgehaltes eines Versuches ausgedrückt) abgeben, läßt einen Einblick in die bei der Keimung stattfindenden Stoffwechselvorgänge zu.

Durch sämtliche neuen Arbeiten über die Eiweißresorption von keimenden Samen zieht sich als roter Faden der Abbau des Reserve-

eiweißes zu niederen ammoniakähnlichen Spaltprodukten. So werden auch, wie unsere Versuche zeigen, bei der mit der Wasser- aufnahme erfolgenden Keimung diese abbauenden Stoffwechsel- prozesse zunächst einsetzen. Bevor nun die viel verwickelteren Aufbauprozesse einsetzen, kommt es zu einem intermediären Anhäufen derartiger Körper, was dann einen geringen Verlust stickstoffhaltiger Substanz durch Diffusion nach sich zieht. Es wäre auch nicht unwahrscheinlich, daß in kleinstem Maße solche, das latente Leben erhaltenden Prozesse sich während der Samenreife, namentlich während der Zeit des Endreifens, abspielen. Es ergibt sich dann eine Erklärungsmöglichkeit für den in wasserlöslicher Form in der Samenschale vorhandenen Stickstoffgehalt.

### Teil III

Im vorigen Kapitel dieser Arbeit wurde erwähnt, daß im Verlaufe der Keimung die Bildung einer echten Kutikula in der Samenschale oder in der Oberfläche der Kotyledonen nicht nachgewiesen werden konnte. Diese Versuche seien jetzt eingehender geschildert und in ihrem Ergebnis an Hand einer Tabelle vor Augen geführt.

Tabelle

Keimungs- dauer	Schale		Kotyledonenschicht	
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Chromsäure	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Chromsäure
16 Std.	Auflösung	Auflösung	schwache geschichtete Grenzone	Auflösung
3 Tage	Auflösung	Auflösung	schwache geschichtete Grenzone	Auflösung
6 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Tage	Auflösung	Auflösung	schwache geschichtete Grenzone	Auflösung

Es wurden zu diesen Versuchen in destilliertem Wasser gekeimte Erbsen verwendet und von ihnen bei verschieden langer Keimungsdauer von 16 Stunden, 3 Tagen und 6<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Tagen Schnitte der Samenschale und Oberflächenschnitte der Kotyledonen auf das Vorhandensein einer Korkschicht mit konzentrierter Schwefelsäure und mit 25prozentiger Chromsäure geprüft. Während sich in allen drei Versuchen die Schale sowohl in konzentrierter Schwefelsäure wie auch in Chromsäure restlos auflöste — interessant ist hier der als Nebenresultat gefundene Kalziumgehalt der Samenschale an dem Auftreten von Gipskristallen mikrochemisch

sehr schön nachweisbar —, konnte man beim Behandeln des Oberflächenschnittes mit konzentrierter Schwefelsäure eine schwache Grenzzone durchsichtiger geschichteter Natur feststellen, während beim Einlegen eines Oberflächenschnittes in Chromsäure ebenfalls auch hier restlose Auflösung stattfand.

Das Vorhandensein einer Kutikula bei den Papilionaceen, also auch bei *Pisum* und *Phaseolus*, das SCHIPS (33) festgestellt haben will, ist nach seinen Versuchen zweifelhaft, da die von ihm angewandten Farb- und sonstigen Reaktionen keinen eindeutigen Nachweis einer Korkschicht erbringen.

Es ist für unsere früheren Untersuchungen und auch weiterhin sehr interessant, daß hier eine die Permeabilität der Samenschale einschränkende Korkschicht nicht besteht und auch nicht gebildet wird. Es ist also ferner anzunehmen, daß eine Diffusion der stickstoffhaltigen Substanz auch durch die Samenschale ungehemmt erfolgen kann, da der Stickstoff in leicht diffusibler Form vorliegt; denn bei der Destillation mit Magnesia findet er sich, wie ein qualitativer Versuch gezeigt hat, in dem Destillate. Daß nebenbei eine Diffusion durch die Öffnung der Mikropyle stattfinden kann, braucht nicht besonders hervorgehoben zu werden; eine alleinige Diffusion durch die Mikropyle ist unwahrscheinlich infolge der feinen Öffnung, die nur mit einem kleinen Teil der Samenoberfläche in Verbindung steht; außerdem dringt das Wasser durch die Mikropyle infolge der durch die Ausdehnung der Schale bedingten Saugwirkung (siehe Teil I) mit geringerem Widerstand ein als durch die Membran der Samenschale, die Diffusion von innen heraus wird also einem schnelleren Flüssigkeitsstrom in der Mikropyle entgegen wirkungsloser sein als einem im Vergleich hierzu langsameren in der Samenschale, wobei, wie schon oben angedeutet, hinzukommt, daß die Samenschale mit einer größeren Samenoberfläche in Verbindung steht als die feine Mikropylaröffnung, die zudem auf eine besonders Wasser ansaugende Radikula angewiesen ist. Es besteht also die Möglichkeit der Diffusion vom Schaleninhalt des Samens heraus durch die Samenschale. In der Literatur hat die Permeabilität der Samenschale ausgedehnte Bearbeitung gefunden, wobei hier die Permeabilität entweder auf leicht diffusible Körper von niedrigem Molekulargewicht oder sogar auf eine selektive Permeabilität besonders an dem Objekt der Bohnenschale beschränkt worden ist, was für uns um so interessanter ist, als die Bohnenschalen anatomisch prinzipiell

gleichen Bau wie die Samenschalen der Erbsen zeigen. Es erschien nun aussichtsreich zu sein im Hinblick auf die Wahrscheinlichkeit der Stickstoffabgabe des Samens durch die Schale, der Frage nachzugehen, wodurch die Permeabilität der Samenschale bedingt ist, und besonders welche Art von Permeabilität der Schale hier bei der Erbse und Bohne vorliegt. Wir wenden uns deshalb den hierzu angestellten Modellversuchen mit Farbstofflösungen zu.

**Modellversuche mit Farbstofflösungen:** Je vier Samen, von denen zwei Stück einen Verschluß der Mikropyle durch einen Tropfen Canadabalsam hatten, wurden in 0,1prozentige Farbstofflösungen der unten aufgeführten Reihe eingelegt und nach 16 Stunden, nachdem sie die Hauptmenge des zur Quellung erforderlichen Wassers aufgenommen hatten, herausgenommen und das Permeieren der Farbstoffe in beiden Versuchsreihen festgestellt, sowohl für die Samenschale als auch für die Kotyledonen (s. Tabelle S. 469/70).

#### Permeabilitätsversuche an Samenschalen von Pisum mit 0,1% Farbstofflösungen

Farbstoff	Mikropyle-ver-schluß	Anhef-tungs-stelle A	Chala za	Mikropyle M	Samen-schale S	Radiku-la R	Kotyle-donen K
<b>Methylgrün</b>	ohne	+	+	+	+	+	+
	mit	—	—	—	+	e	+
<b>Direktviolett R</b>	ohne	+	+	+	+	—	—
	mit	—	—	—	+	—	—
<b>Anilinblau</b>	ohne	+	+	+	+	e	e
	mit	—	—	—	e	—	—
<b>Methylengrün</b>	ohne	+	+	+	+	+	+
	mit	—	—	—	e	e	e
<b>Chicagoblau</b>	ohne	+	+	+	+	—	—
	mit	—	—	—	e	—	—
<b>Safranin</b>	ohne	+	+	+	+	+	+
	mit	—	—	—	+	e	+
<b>Congorot</b>	ohne	+	+	+	+	e	e
	mit	—	—	—	e	—	—
<b>Bismarckbraun</b>	ohne	+	+	+	+	e	e
	mit	—	—	—	+	—	e
<b>Eriozyanin</b>	ohne	+	+	+	+	+	+
	mit	—	—	—	+	e	+

+= Eindringen des Farbstoffs.

—= Kein Eindringen des Farbstoffs.

e = externe = schwache und stellenweise Anfärbung.

Farbstoff	Mikropyle-ver-schluß	Anhef-tungs-stelle A	Cha-laza Ch	Mikropyle M	Samen-schale S	Radi-kula R	Kotyle-donen K
Reinblau (Löffler)	ohne	+	+	+	+	e	+
	mit	—	—	—	+	—	—
Columbiaschwarz	ohne	+	+	+	+	—	—
	mit	—	—	—	e	—	—
Echtrot	ohne	+	+	+	+	—	e
	mit	—	—	—	+	—	e
Bibricher Scharlach	ohne	+	+	+	+	—	+
	mit	—	—	—	+	—	e
Methylgrün 00	ohne	+	+	+	+	+	+
	mit	—	—	—	+	+	+
Methylenblau	ohne	+	+	+	+	+	+
	mit	—	—	—	+	+	+
Chrysoidin	ohne	+	+	+	+	+	+
	mit	—	—	—	+	+	+
Cyanol extra	ohne	+	+	+	+	+	+
	mit	—	—	—	+	+	+
Palatinscharlach	ohne	+	+	+	+	+	+
	mit	—	—	—	+	e	e
Erythrosin	ohne	+	+	+	+	+	+
	mit	—	—	—	+	e	e
Fuchsin S	ohne	+	+	+	+	+	+
	mit	—	—	—	+	e	e
Neutralrot	ohne	+	+	+	+	+	+
	mit	—	—	—	+	+	+
Malachitgrün	ohne	+	+	+	+	+	+
	mit	—	—	—	+	+	+
Gallaminblau	ohne	+	+	+	+	—	—
	mit	—	—	—	e	—	—
Indulin B	ohne	+	+	+	—	—	—
	mit	—	—	—	—	—	—
Wasserblau 6 B	ohne	+	+	+	+	e	e
	mit	—	—	—	e	—	—
Cyanosin	ohne	+	+	+	+	—	e
	mit	—	—	—	+	—	—
Kristallviolett	ohne	+	+	+	+	+	+
	mit	—	—	—	+	+	+

+ = Eindringen des Farbstoffs.

— = Kein Eindringen des Farbstoffs.

e = externe = schwache und stellenweise Anfärbung.

In vorstehender Tabelle beziehen sich die 3 ersten Vertikalspalten mit den Symbolen auf die Permeabilität in der Gegend der Mikropyle. Es bedeuten dabei A = Anheftungsstelle des Samens, Ch =

Chalaza, M = Mikropyle. In den folgenden senkrechten Spalten bedeuten S = Samenschale, R = Radikula und K = Kotyledonen, ein Pluszeichen bedeutet Eindringen des Farbstoffs, Minuszeichen dagegen kein Eindringen des Farbstoffs in die Samenschale und die Kotyledonen, e bedeutet eine nur schwache, äußerliche, *stellenweise* Anfärbung.

Die Samenschale der Erbse nimmt in trockenem Zustande bei der Keimung Wasser auf, wobei eine beträchtliche Volumenvergrößerung eintritt, wie wir bereits im ersten Teil dieser Arbeit gesehen haben. Diese Tatsache der Quellung, also der Wasser-einlagerung in und zwischen die Mizellen der Zellmembran läßt voraussehen, daß die Membran in gequollenem Zustande gewisse Eigenschaften eines Gels haben muß. In der Tat wird diese Folgerung durch die Permeabilität mit Farbstoffen bestätigt. Ordnet man nämlich die verwendeten Farbstoffe nach ihrer abnehmenden Ausbreitung durch Diffusion im Gelatinegel (28) und trägt die gefundenen Ergebnisse der Permeabilität der Samenschalen daneben ein, wie in folgender Tabelle geschehen ist, so findet man zwischen beiden weitgehende Übereinstimmung, namentlich der Rückgang der Permeabilität ist bei den Farbstoffen bemerkbar, die auch keine Ausbreitung im Gelatinegel zeigen.

*Permeieren der nach ihrer Ausbreitung im Gelatinegel geordneten Farbstoffe durch Samenschale und Kotyledonen.*

Basische Farbstoffe:			Saure Farbstoffe:	
	Schale	Kotyled.	Schale	Kotyled.
Neutralrot	+	+	Zyanolextra	+
Methylenblau	+	+	Erioczanin	+
Methylengrün	e	+	Bibricher Scharlach	+
Malachitgrün	+	+	Erythrosin	+
Chrysoidin	+	+	Zyanosin	e
Pararosanilin	+	+	Direktviolett	—
Methylgrün	+	+	Congorot	e
Safranin	+	+	Wasserblau	e
Bismarckbraun	e	e	Anilinblau	e
Gallaminblau	e	—	Chicagoblau	e
(breitet sich über- haupt nicht aus)			Kolumbiaschwarz	e
			Indulin	—

Haben die zuletzt stehenden sauren Farbstoffe von Zyanosin ab sämtlich die Eigenschaft, nicht in Gelatinegel hereinzudiffundieren und gehören demnach zu der Kategorie hochmolekular gelöster Stoffe, so finden wir dieselben Verhältnisse für den Grad des

Permeierens der Samenschale und der Kotyledonen, mit Ausnahme von Zyanosin und Direktviolett, die die Samenschale durchdringen. Es zeigen sich jedoch hierbei graduell feinere Unterschiede.

Die Werte für die Kotyledonen entstammen den Permeabilitätsversuchen mit Farbstofflösungen an Erbsen mit unverschlossener Mikropyle, während die Werte für die Samenschale von Erbsen mit einem Mikropylarverschluß mit Canadabalsam herrühren.

Nach diesen Versuchen zu urteilen, zeigen die Samenschalen Permeabilitätsverhältnisse, die sich nach ihrer Übereinstimmung mit der Kapillardiffusion am besten durch eine Filterwirkung der Samenschale erklären lassen: d. h. solche Farbstoffe, die sich im Gelatinegel leicht ausbreiten, wie z. B. Neutralrot, Methylenblau, Zyanol und andere, die also in Lösung fein dispers sind, durchdringen leicht die Samenschale, während Farbstoffe wie Gallaminblau, Congorot, Wasserblau, die als größer disperse Stoffe in Lösung sich überhaupt nicht im Gelatinegel ausbreiten, ebenfalls auch nicht die Samenschale permeieren.

Um eine exaktere Methode für die Permeabilitätsmessungen der Samenschale anwenden zu können — die Samenschale ist nämlich durchscheinend und die Entscheidung namentlich bei etwas die Samenschale tingierenden Farbstoffen, ob ein geringer Durchgang der Farbstoffe stattgefunden hat, ist nicht immer einwandfrei festzustellen —, konstruierte ich einen kleinen Dialysator, der in Fig. 3 abgebildet ist. Mit seiner Hilfe konnte man gleichzeitig die in der Literatur verbreitete Anschauung über eine bestehende selektive Permeabilität der Samenschale der Leguminosen einer exakten Prüfung unterziehen.

Die Konstruktion dieses Mikrodialysators ist einfach, muß aber zur guten Wirkungsweise des Apparates exakt durchgeführt werden. Ein etwa 20 cm langes Glasrohr mit innerem Durchmesser

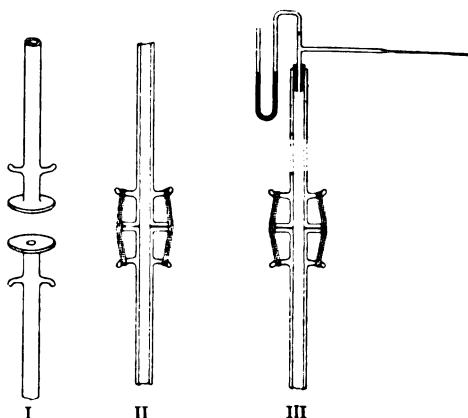


Fig. 3. Mikrodialysator  
I: auseinandergenommen    II: zusammengesetzt  
III: mit Manometeraufsatzt

von 4 mm und einer Wanddicke von 1—2 mm wird in der Mitte in ebener Fläche gerade durchgeschnitten und an den Schnittflächen die Ränder umgelegt, verbreitert und geschliffen, derart, daß an das innere Lumen mit scharfer Kante der Schliffrand ansetzt. Zwischen diese durch Schleifen auf Glas exakt plan-gemachten Schliffe wird die Membran gelegt, deren Permeabilitäts-verhältnisse geprüft werden sollen. Zum Schutz der Samenschale, namentlich der zarten Innenseite, vor Verletzungen durch den immerhin harten Schliff wurde auf jede Schliffseite ein dazu passender Kreisring aus dünnstem durchsichtigem Membrangummi gelegt und mit einer hauchdünnen Schicht von Canadabalsam auf den Schliff festgekittet. An jedem Schliffröhrchen befinden sich oberhalb des Schliffes zwei angeschmolzene Glashäkchen und beide Teile des Dialysators werden durch zwei zwischen den Glashäkchen ausgespannte Gummibänder fest aneinander gehalten. Die Erbsenschale wurde vor dem Einlegen zwischen die Schliffe angefeuchtet, wobei sie sich beträchtlich ausdehnt und außerdem leichter zwischenzulegen ist. In den oberen Teil des Dialysators oberhalb der Membran wurde die auf ihr permeieren zu untersuchende Lösung eingefüllt; das untere mit destilliertem Wasser blasenfrei angefüllte Röhrchen stand in einem Reagenzglas mit destilliertem Wasser. Die Permeabilität der Schale für bestimmte Stoffe wurde nun nach angegebener Versuchszeit durch Analyse des unteren Röhrchens auf das Vorkommen von Spuren der im oberen Teil befindlichen Stoffe bestimmt. Um etwa in den Samenschalen zufällig vorliegende Verletzungen und Undichtigkeiten an den Schliffen — solche letzteren sind bei meinen Versuchen zwar niemals vorgekommen — auszuschalten, die ein falsches Bild hätten geben können, wurde ein Versuch dreimal parallel in drei Mikrodialysatoren ausgeführt und nach dem Versuch nach mehrmaligem Auswaschen des Dialysators mit eingespannt gebliebener Membran das obere Dialysatorröhren bei allen drei Parallel-versuchen mit einem nicht permeierenden Farbstoff in 0,1% Lösung z. B. mit Anilinblau gefüllt und gegen destilliertes Wasser im unteren Röhrchen permeieren gelassen. In keinem Falle selbst nach Verlauf von 1—2 Wochen war bei allen Versuchen eine Spur von permeiertem Anilinblau auf kolorimetrischem Wege mit Hilfe einer Vergleichsskala festzustellen. Außerdem wurden sämtliche Versuche, um möglichen Einwänden zu begegnen, in zwei Versuchsreihen, und zwar mit Gummidichtung des Dialysators

und ohne solche angestellt und stets dabei identische Resultate erzielt.

Diese Art der Versuchsanstellung sei hier ausdrücklich hervorgehoben, da sie die Sicherheit und die Eindeutigkeit der gewonnenen Resultate vollkommen garantiert.

Nun zu den einzelnen Dialysatorversuchen selbst. Aus der Reihe der früher verwendeten Farbstoffe wurden einige charakteristische Vertreter herausgegriffen und vollkommene Bestätigung der auf voriger Tabelle (S. 471) gefundenen Resultate erzielt. Methylenblau, Methylengrün, Fuchsín S als leicht permeierende basische Farbstoffe durchdrangen, wenn sie in 0,1prozentiger Lösung im Oberteil des Dialysators sich befanden, leicht die eingespannte Samenschale und färbten schon nach 3—5 Stunden das im Unterteil des Dialysators befindliche destillierte Wasser derart, daß sie in ihrer Konzentration mit einer Farbenskala kolorimetrisch bis zu Verdünnungen von  $1/10\,000\%$  gut bestimmt werden konnten. Dagegen permeierten z. B. Congorot, Anilinblau, Wasserblau überhaupt nicht selbst nach mehrtägigem Stehenlassen.

**Versuche zur selektiven Permeabilität der Samenschale:** Mit Hilfe dieses Mikrodialysators konnten die erstgenannten Versuche über die Permeabilität der Samenschale für Farbstoffe nicht nur exakt bestätigt werden, sondern es ist uns auch möglich gemacht worden, einen Schritt weiterzugehen und eine der Samenschale allgemein zugesprochene Eigenschaft kritisch zu untersuchen, nämlich die in der Literatur meist als selbstverständlich hingestellte Tatsache der selektiven Permeabilität der Samenschale. Nichts ist aber hier unzulässiger als zu schematisieren, da der anatomische Bau und die morphologische Entwicklung der Samenschalen von verschiedenen Angiospermensamen durchaus voneinander abweichen. So spricht auch NETOLITZKY (7) von den „halb-durchlässigen Zollschanzen“, die die *Kutikularhäute* der Samenschale für den „Zellstaat des reifenden Samens mit eigener Wirtschaft“ darstellen und verlegt, wie wir sehen werden, mit gewisser Berechtigung den Sitz der selektiven Permeabilität der Samenschale in die Innenkutikula: er weist ferner darauf hin, daß bei der nach den Angaben von SHULL (35) als Verschlußhaut von Osmometern häufig verwendeten Bohnenschale eine Innenkutikula nicht vorhanden ist. Die auf Grund der Osmometerversuche als selektiv permeabel betrachtete Bohnenschale hat, so meint NETOLITZKY, das Augenmerk von der möglichen Wirksamkeit der Innenkutikula als selektiver Schicht abgelenkt.

VAN DER MAREL (7) hat nun in zeitlich früheren Versuchen an *Cucurbita* eine Hemmung von Methylenblaulösung durch die Innenkutikula feststellen können, wogegen bei Fehlen der Innenkutikula der Farbstoff permeierte. In Übereinstimmung mit dem Fehlen der Innenkutikula zeigte sich die Bohnenschale und auch die Erbsenschale für Methylenblaulösung permeabel. Es erscheint also nach diesen unseren Versuchen die selektive Permeabilität der Bohnenschale als fraglich oder zum mindesten als von der allgemeinen Regel der selektiven Permeabilität in gewisser Beziehung abweichend.

Hierzu sei nun ein eigener Dialysatorversuch mit Traubenzuckerlösung eingeschaltet. COLLANDER (27) hat nämlich für den Typ einer semipermeablen Membran, der TRAUBESCHEN Ferrozyan-Kupfermembran, die ja als Zeichen ihrer Semipermeabilität nur für Wasser durchlässig und für fast alle molekular gelösten Stoffe und auch für Elektrolyte impermeabel ist, gezeigt, daß dennoch diese Membran erst oberhalb einer gewissen Größe des Molekularkoeffizienten gelöster Stoffe für diese impermeabel ist. Ganz ähnliche Verhältnisse konnte auch MICHAELIS (30) für die von ihm beschriebene semipermeable Kollodiummembran feststellen. Beide zeigten nämlich, daß Stoffe mit kleinem Molekularkoeffizienten, wie Acetamid und Harnstoff, leicht permeierten, während Traubenzucker absolut nicht passierte.

Der Ausfall eines Dialysatorversuches einer Erbsenschale mit 0,1 Mol. Traubenzuckerlösung ließ nun erkennen, daß unsere Erbsenmembran nicht mit den beiden genannten semipermeablen Häuten übereinstimmte, denn die Zuckerlösung durchdrang die Schale und konnte schon nach drei Stunden im Dialysat nachgewiesen werden, wie folgender Versuch zeigte:

Anilin-blau	I		II		III	
	Wasser	$\frac{1}{10}$ Mol. Traubenz.	Dieselben Membranen	Wasser	Dieselben Membranen	Wasser
a)	nach 21 Std.		a)	nach 3 Std.	a)	nach 24 Std.
b)	—		b)	+	b)	—
c)	—		c)	+	c)	—

Diese im Vergleich zu den oben genannten semipermeablen Membranen vorhandene größere Durchlässigkeit der Samenschale der Erbsen (die Versuche wurden auch mit Bohnenschalen gemacht

und lieferten das gleiche Resultat) schränkte natürlich auch die Semipermeabilität stark ein, da, wie in neuester Zeit MICHAELIS (30) durch seine Untersuchungen an Membranen anschaulich gemacht hat, die selektive Permeabilität einer Membran in erster Linie von der Porenweite der Membran abhängig sein muß. Dennoch wäre es denkbar, daß eine für einzelne Ionen verschiedene Ionenpermeabilität bestände. Die in dieser Richtung unternommenen Versuche sind in folgender Tabelle angegeben, und zwar für verschiedene Salze mit verschiedenen Kationen und Anionen verschiedener Wertigkeit. Sie führten, das sei gleich vorweggenommen, zu dem Ergebnis, daß eine selektive Permeabilität bedingt durch eine verschiedene Ionenpermeabilität für die Samenschale der Erbse und auch der Bohne nicht besteht.

Tabelle über die Permeabilität der Erbsenschale für Salze

m Salze in $\frac{1}{10}$ Konz.	Durchlässigkeit der Schale	Untersucht nach Stunden	Kontrollversuch mit Anilinblau- lösung
			nach 24 Std.
NaCl	+	3	—
KCl	+	2	—
CaCl <sub>2</sub>	+	2	—
AgNO <sub>3</sub>	+	3	—
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	+	2	—

Sämtliche Versuche wurden ebenso mit Bohnenschalen gemacht, und ferner für jede Membranart Versuchsreihen ausgeführt, bei denen die Schliffe der Dialysatoren einmal frei und das andere Mal mit dünnsten Membrangummiringen bedeckt waren. Die Ergebnisse stimmten in allen Versuchsreihen an beiden Objekten stets überein. In den beschriebenen Versuchen wurden 0,1 Mol. Salzlösungen im Oberteil gegen destilliertes Wasser im Unterteil dialysiert. Nach Verlauf von 2—3 Stunden konnte im Unterteil das Salz, als sowohl Kation als auch Anion, direkt qualitativ nachgewiesen werden. Dieser im Vergleich zur potentiometrischen Methode grobe Nachweis war hier angebracht, da bei dieser für Traubenzucker durchlässigen Membran feinere Unterschiede im Diffusionspotential der einzelnen Ionen mit verschiedener Wertigkeit bei verschiedenem Grade von Ionenpermeabilität wohl vorhanden sein werden, die aber auch letzten Endes bei jeder Pergamentpapiermembran vorkommen und für uns nichts wesentlich Entscheidendes erbringen.

Zu beachten ist, daß bei der Dialyse namentlich mit konzentrierten Lösungen, also z. B. mol. Kochsalzlösung eine Vergrößerung des Volumens der Flüssigkeit im Oberteil stattfindet, das dann nach einer Zeit kaum mehr verändert wird; aber hieraus auf eine absolute Semipermeabilität schließen zu wollen, wie es z. B. aus den Versuchen von SHULL an *Xanthium* (35) hervorgeht, ist nicht angängig. Diese Volumenzunahme ist durch den größeren Diffusionswiderstand der Salzmoleküle gegenüber den kleineren Wassermolekülen zu erklären, und der meist eintretende stationäre Zustand durch das sich bald einstellende geringe Diffusionsgefälle, wodurch ein Ausgleich der Konzentrationen unmerklich langsam erfolgt. Daß er aber erfolgt, zeigt sich aus dem Versuch, daß selbst bei umgekehrter Flüssigkeitsbeschickung des Dialysators in den nun destilliertes Wasser enthaltenden Oberteil stets Salz hindendiffundiert war, also auch entgegen der Schwere.

SCHROEDERS (34) Ergebnisse der Durchlässigkeit der Erbsenschale für verschiedene Salze, die auf anderem Wege festgestellt wurde, werden entgegen der Anschauung von RIPPEL (32) auch durch diese Untersuchungen exakt bestätigt und verbreitert.

Zum Schluß noch einen Versuch, der für Permeabilitätsmessungen allgemein von großer Bedeutung ist, da er in seinem Endergebnis eine Abhängigkeit des Permeabilitätsgrades einer Membran von der Azidität der permeierenden Farbstofflösung zu erkennen gibt: 0,1prozentige Fuchsin-S-Lösung permeiert nämlich in schwachsaurer Lösung bei einer Azidität von  $\frac{1}{25}$  n HCl drei- bis viermal schneller, als wenn der Farbstoff nur in destilliertem Wasser gelöst vorliegt. Den ersten Teil dieses Versuches und den Schluß bilden die Permeabilitätsmessung von 0,1prozentiger Fuchsin - S - Lösung gegen destilliertes Wasser mit einer Erbsenschale als Dialysatormembran; der Betrag des permeierten Farbstoffs wird kolorimetrisch bestimmt und ist in nachstehender Tabelle verzeichnet. Die nach dem ersten Versuch durch mehrfaches tägliches Ausspülen und Stehenlassen mit destilliertem Wasser behandelten, keine Spur eines Farbstoffes abgebenden Membranen (auch nicht beim Stehenlassen mit  $\frac{1}{25}$  n HCl), die im Dialysator ausgespannt blieben, werden mit HCl saurer 0,1prozentiger Fuchsin-S-Lösung, die in bezug auf HCl  $\frac{1}{25}$  n ist, im Oberteil in Berührung gebracht, während unterhalb der Membran  $n/25$  HCl vorhanden ist, wobei ein drei- bis viermal schnelleres Permeieren stattfindet als im Versuch I. Der nun nach Versuch II,

wie oben angegeben, gesäuberte Apparat mit eingespannter Membran, der nach mehrmaligem Ausspülen und nach 24stündigem Stehenlassen mit destilliertem Wasser keine Spur einer Rotfärbung zeigte, ergibt, nachdem der Dialysator wieder wie bei Versuch I, also mit Farbstofflösung ohne HCl, gefüllt ist, auch wieder dasselbe Resultat des ersten Versuches in dem Permeieren der Farbstofflösung.

Tabelle über das verschiedene Permeieren in neutraler und in saurer Lösung

		Permeierter Farbstoff in Prozenten		
		nach 1 Std.	nach 2 Std.	nach $3\frac{1}{2}$ Std.
I Fuchsins	Wasser unten			
oben				
a)		—	Spur	0,0001
b)		—	„	> 0,0001; < 0,00025
c)		—	„	> 0,0001; < 0,00025
II Fuchsins				
in $\frac{n}{25}$ HCl	$\frac{n}{25}$ HCl			
a)		Spur	0,0001	0,0005
b)		„	0,0001	0,0005
c)		„	0,0001	0,0005
III Fuchsins	Wasser			
a)		—	Spur	0,0001
b)		—	„	> 0,0001; < 0,00025
c)		—	„	> 0,0001; < 0,00025

Hiermit wird gleichzeitig nachgewiesen, daß eine substanzliche Veränderung der Membran etwa durch Herauslösen eines für die Permeabilität maßgebenden Bestandteiles durch die Salzsäure nicht stattgefunden zu haben scheint. Wie eingangs angegeben, sind auch diese Versuche mit drei Mikrodialysatoren in drei Parallelversuchen für jeden Einzelversuch ausgeführt worden, und zwar auch in Versuchsreihen mit und ohne Gummidichtung des Dialysators stets mit demselben geschilderten Ergebnis. Zur kolorimetrischen Bestimmung für Versuch II waren die Vergleichslösungen der Farbstoffskala salzsauer im Betrage von  $\frac{1}{25}$  n HCl, also ebenfalls von gleicher Azidität wie die Versuchslösungen. Die Vergleichslösungen von Versuch II stimmten mit den entsprechenden neutralen Ver-

gleichslösungen von Versuch I und III in ihrem Farbton innerhalb kleiner meßbarer Grenzen überein. Diese kleinen Abweichungen wurden natürlich bei der Messung berücksichtigt, ändern aber infolge ihrer Kleinheit nichts an dem Gesamtergebnis.

Beim ersten Anschauen des Resultats denkt man an ähnliche Erscheinungen der bei verschiedener Wasserstoffionenkonzentration variablen Permeabilität einer Gelatinemembran, die allerdings, wie MICHAELIS (30) durch Diffusionspotentialmessungen festgestellt hat, nur für Ionen besteht. Man könnte somit zur Erklärung eine ähnliche Eigenschaft der Erbsenschalenmembran heranziehen. Ganz abgesehen davon, daß nun die Samenschale der Erbse von ganz anderer Beschaffenheit ist als die stickstoffreiche Gelatine oder Eiweißmembran von amphototerer Natur — der in Wasser unlösliche Stickstoffgehalt der Samenschale ist minimal, er beträgt 0,3% des Gewichts der Samenschale und dürfte sich auf den Zellinhalt der Zellen der Samenschale beziehen, während die Zellwände selbst von reinem Kohlehydratcharakter sind —, so ist auch noch eine andere Deutung des beschriebenen Versuches möglich. Nehmen wir die Membran als in saurer Lösung in ihrer Permeabilität unverändert an, so könnte dennoch der gleiche Effekt des schnelleren Permeierens der Fuchsins-S-Lösung dadurch zustande kommen, daß der Säuregehalt den Dispersitätsgrad des Farbstoffes in Lösung verändert, derart, daß eine feinere disperse Verteilung stattfindet und bei molekularen Lösungen etwa der gaskinetische Querschnitt eines Moleküls verändert bzw. verkleinert wird. Beide Deutungsmöglichkeiten haben natürlich die Annahme der Siebwirkung der Dialysatormembran der Erbsenschale zur Voraussetzung, eine Annahme, die auf Grund der früheren Versuchsergebnisse, die auch eine Übereinstimmung mit den Eigenschaften einer Pergamentpapiermembran zeigten, durchaus zulässig ist.

Gehen wir nun auf die erste Annahme zurück. Wenn die Erbsenschale in ihrer Permeabilität derart von der  $n/25$  Salzsäure beeinflußt wird, daß sie durchlässiger wird — hat doch KOTTE (29) an Zellmembranen von *Chaetomorpha* bei Plasmolyseversuchen eine starke Quellung der Zellmembran durch Säurezusatz festgestellt —, so müßte dieser Einfluß auch bei anderen, die Azidität der Lösung nicht ändernden gelösten Stoffen wie z. B. bei Neutralsalzen oder Nichtelektrolyten bestehen bleiben. Da aber bei derartigen Modellversuchen immer noch die Möglichkeit der Änderung des gaskinetischen Querschnitts der Ionen oder Moleküle

bestehen bleibt — übrigens eine rein physikalisch-chemische Frage —, so ist die Frage auf diesem Wege nicht einwandfrei zu entscheiden.

Dennoch war es mir möglich, eine Lösung zu finden, und zwar durch folgenden Versuch: Statt den Durchgang eines gelösten permeierenden Körpers in saurer und in neutraler Lösung zu messen, maß ich direkt die Durchgangsgeschwindigkeit der Lösungsmittel, also Wasser und n/25 HCl durch die Erbsenmembran im Dialysator bei konstanter Temperatur an der Steighöhe des Quecksilbers in einem auf den Dialysator aufgesetzten Manometer. Wohl ist hier zu beachten, daß die Filtrationsgeschwindigkeit nicht nur von der Durchlässigkeit der Membran gegenüber Wasser und n/25 HCl abhängt; sondern auch durch den unterschiedlichen Beitrag der Viskositäten von n/25 HCl und von Wasser bedingt ist.

Praktisch gestaltete sich der Versuch folgendermaßen: Auf jeden der drei Dialysatoren mit unverletzten Erbsenschalen als Dialysatormembran wurde nach dem Füllen mit der Versuchsfüssigkeit je ein Quecksilbermanometer mit Gummistopfen luftdicht aufgesetzt. Wie aus Abb. 3 des Dialysators ersichtlich ist, trägt dieses Manometer einen seitlichen Ansatz, der zu einer Kapillare ausgezogen ist. Dieser dient zum Druckausgleich, da sonst bei dem durch das Quecksilber geschlossenen Manometerrohr beim Aufsetzen des Manometers das Quecksilber in diesem steigen bzw. zum oberen Ende herausgedrückt werden würde. Daß in jeder Versuchsreihe Gleichheit der Versuchsbedingungen angestrebt wurde, also gleiche Höhe der Flüssigkeit im Oberteil des Dialysators und gleich weiters Eintauchen des unteren Rohres in einen unteren Flüssigkeitsbehälter, sei ebenfalls erwähnt. Nachdem die Apparate zusammengesetzt worden waren, wurden sie in einen Brutschrank gestellt, der genau eine Temperatur von 28° hatte und eine Stunde bei geöffneter Kapillare stehen gelassen. Nach dieser Zeit, nachdem also sämtliche Teile des Apparates die Temperatur des Thermostaten angenommen hatten, wurden in wenigen Sekunden die Kapillaren mit der Sparflamme eines Bunsenbrenners zugeschmolzen. Nach zweitägigem Stehenlassen im Thermostaten wurde die Niveaudifferenz beider Quecksilberkuppen je eines Manometers mit Hilfe eines Ablesemikroskops festgestellt und dieselben Apparate mit eingespannter Membran zum nächsten Versuch verwendet. Da eine Ablesung der Niveaudifferenz der Quecksilberkuppen bei dem Stande des Apparates direkt im Thermostaten

trotz mehrfach unternommener Versuche zu keinem einwandfreien Ergebnis führte, wurde der Apparat nach der Versuchszeit aus dem Thermostaten herausgenommen und sämtliche Ablesungen nach einstündigem Stehenlassen des Apparates bei gleichmäßiger Temperatur von 19,5° bei dieser Temperatur vorgenommen.

**Tabelle der Filtrationsgeschwindigkeit, gemessen durch die Differenz der Steighöhen in Millimeter**

	I 28° nach 48 Std.	II 28° nach 48 Std.	III Zimmertemp. 18° nach 120 Std.
Wasser . . . . .	34,1	30,0	16,9
n/25 HCl . . . . .	28,8	21,3	14,2

Es zeigte sich nun hierbei in allen Versuchen, wie obige Tabelle angibt, daß die salzsäuren Lösungen erheblich langsamer die Samenschale durchdrangen, daß also, da die innere Reibung von Wasser und n/25 Salzsäure voneinander praktisch gar nicht abweichen, die Membranen im Salzsäureversuch durchaus nicht durchlässiger gefunden wurden, ja im Gegenteil in ihrer Durchlässigkeit dem Werte des Wassers erheblich nachstehen. Hieraus folgt nun in klarer Weise, daß die Ursache des schnelleren Permeierens allein in einer Veränderung des Farbstoffmoleküls oder des Dispersitätsgrades des Farbstoffes durch die Säure zu suchen ist.

Es ist ja auch bekannt, daß Triphenylmethanfarbstoffe, zu denen ja auch Fuchsin-S gehört, durch Zusatz von Säuren die noch freien Valenzen der vorhandenen Stickstoffatome absättigen; sie gehen, das sehen wir an dem Beispiel des Fuchsin S, in einen Zustand über, der gegen den früheren salzartiger ist, worauf aus dem besseren Permeieren durch die für Salze leicht durchlässige Membran geschlossen werden kann.

„Pufferwirkung“ der Samenschale: In Zusammenhang mit der Permeabilität steht die Erscheinung der „Pufferwirkung“ der Samenschale. Nach einer privaten Mitteilung von Herrn Professor MITSCHERLICH ist der Same, solange er sich in der Samenschale befindet, relativ unempfindlich gegen Änderung der Wasserstoffionenkonzentration im Außenmedium; dagegen findet nach dem Durchbrechen der Samenschale bald bei niederen pH-Werten eine schädigende Beeinflussung des Wachstums der Keimpflanzen statt.

Man könnte daraufhin geneigt sein, anzunehmen, daß in der Samenschale eine chemische Schutzwirkung besteht, die nach Art

einer Pufferung beschaffen sein könnte. An die rein abschließende Wirkung der Samenschale ist hier weniger zu denken; gewiß verzögert die für Säuren permeable Samenschale die direkte Einwirkung auf das Sameninnere, andererseits wird aber die Außenlösung durch die Mikropyle und durch die Schale eingesogen und steht durch die freie Öffnung der Mikropyle direkt mit der Außenlösung in Verbindung.

Nehmen wir nun anderseits an, diese chemische Schutzwirkung in der Samenschale besteht in dem Vorhandensein von in Wasser unlöslichen Salzen schwacher Säuren, so spricht die Tatsache dafür, daß die dreimal mit Wasser extrahierten Samenschalen von 100 Stück trocken geschälten Erben bei Zugabe von Salzsäure tatsächlich einen Säureverbrauch aufweisen, wobei aber bei Titration gegen Methylorange kein scharfer Neutralisationspunkt, sondern eine ganz allmähliche Zunahme der Azidität der Lösung erfolgt: Nach Zugabe von 2,8 ccm n/10 HCl entspricht die Azidität der Lösung einem Tropfen n/10 HCl Überschuß (auf 100 ccm Lösung).

Nach Zugabe von weiteren 0,4 ccm n/10 HCl entspricht die Azidität der Lösung zwei Tropfen n/10 HCl Überschuß in der Lösung von 100 ccm.

Bei weiterem Säurezusatz erhöht sich dann auch entsprechend der zugesetzten Säuremenge die Azidität der Lösung.

Eine ähnliche Eigenschaft einer diesmal aber eindeutigen *Pufferwirkung* geben die Samen mit ihrer wässrigen, stickstoffhaltigen Keimlösung selbst zu erkennen, da diese letztere von 100 Samen gegen Phenolphthalein sauer reagiert und 1,35 ccm n/10 karbonatfreie Natronlauge verbraucht und gegen Methylorange bei unscharfem Umschlag einen Verbrauch von etwa 3,0—3,2 ccm n/10 Salzsäure aufweist.

Es folgt hieraus: Nicht nur die Samenschale übt eine chemische Schutzwirkung bei relativ niederen  $p_{\text{H}}$ -Werten auf den Keimling aus, sondern auch die stickstoffhaltige wässrige Keimlösung, wobei diese eine direkte Pufferwirkung aufweist, da sie als schwach sauer reagierende Lösung bei Säurezusatz der Erhöhung der Wasserstoffionenkonzentration entgegen wirkt.

Betrachten wir also die Schutzwirkung der Samenschale auf das Sameninnere, so besteht sie neben der Schale selbst auch in dem Vorhandensein diffusibler leicht löslicher Stickstoffverbindungen, die gerade in der Zeit, in der der Same also noch von der Schale umgeben ist, entstehen, wie wir in Teil II gesehen haben.

und die zu dieser Zeit ihre Pufferwirkung entfalten können. Da die Stickstoffabgabe an die Keimlösung, wie wir ferner gesehen haben, im weiteren Keimungsverlauf nie die Tendenz einer Zunahme aufweist, da also nach dem Durchbrechen des Keimlings durch die Samenschale auch keine stickstoffhaltigen Substanzen mehr abgegeben werden, so ist zu dieser Zeit der Keimung auch die Pufferungsmöglichkeit gering, und der Same kann leichter geschädigt werden.

Zusammengefaßt übt also die Samenschale auf den für niedere  $p_{H^+}$ -Werte empfindlichen Keimling eine Schutzfunktion aus und wird dabei besonders durch die puffernde Wirkung der in der ersten Zeit der Keimung vom Samen abgegebenen stickstoffhaltigen Substanzen unterstützt.

### Schlußbetrachtung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit seien kurz zusammengefaßt dahin, daß im Keimungsverlauf bei der primär erfolgenden Wasseraufnahme durch den trockenen Samen die Samenschale aktiv beteiligt ist infolge eines bei Berührung mit Wasser in Funktion tretenden Saugmechanismus der Stabzellen der Samenschale, bedingt durch den Unterdruck im Lumen der Stabzellen selbst. Die Wasseraufnahme wird ferner durch die infolge starker und schneller Quellung bedingte Volumenvergrößerung der Samenschale unterstützt.

An Hand von sterilen Keimungsversuchen wurden ferner starke individuelle Schwankungen des Stickstoffgehaltes von je 100 Samen gleicher Sorte festgestellt, trotz gleicher Samengröße und gleichen Durchschnittsgewichts.

In den sterilen Keimlösungen wurde ein Stickstoffgehalt, durch Stickstoffabgabe der Schalen und der Samen bedingt, festgestellt, dessen Betrag für die Samen etwa 0,2–0,7% des Stickstoffgehaltes der schalenlosen Samen ist und der auch bei längerer Keimdauer stets innerhalb dieser Grenzen schwankt.

Die meist als selektiv permeabel betrachtete Samenschale der Erbse besitzt, wie Versuche mit Farbstofflösungen und Dialysatorversuche mit Elektrolyten ergeben haben, weder eine anatomisch nachweisbare Kutikula, noch kommt ihr die Eigenschaft der selektiven Permeabilität zu. Ein in salzsaurer Lösung schnelleres Permeieren von Fuchsin S als in neutraler Lösung erklärt sich durch eine Änderung des Verteilungsgrades des gelösten Farbstoffes durch die Säure. Eine mögliche größere Durchlässigkeit der

Membran in saurer Lösung konnte hierbei nicht nachgewiesen werden.

Die Samenschale der Erbse übt gemeinsam mit den vom Samen abgegebenen stickstoffhaltigen, puffernden Verbindungen eine Schutzwirkung bei niederen  $p_H$ -Werten auf den Keimling aus.

Vorstehende Arbeit wurde im Botanischen Institut der Universität Königsberg (Pr.) ausgeführt.

Für die wertvolle Anregung und Unterstützung, die mir durch Herrn Professor Dr. Mez und Herrn Privatdozent Dr. ZIEGENSPECK zuteil geworden ist, spreche ich hiermit meinen besten Dank aus.

### Abstract

In the process of germination of *Pisum* in the primary occurring absorption of water by dry seeds, the testa is actively concerned, owing to a sucking-mechanism of the columnar sclereids which as soon as it comes into contact with water begins to work, in consequence of the compression in the lumen of the columnar sclereids. The absorption of water is further supported by the enlargement of the volume of the testa, owing to a strong and quick swelling.

Based on sterile germination trials, trong individual deviations of the nitrogenous constituents of every 100 seeds of equal kind have been stated, despite an equal size of the seeds and the same average weight.

In the sterile germ-solutions a nitrogen-content has been ascertained which owing to loss of nitrogen by the seeds, represents about 0.1—0.5% of the nitrogen contents of the seeds without testa, and also in longer time of germination this is always deviating within these limits.

The seed testa of the pea, mostly supposed to be selectively permeable, possesses neither an anatomically traceable cuticula nor the property of selective permeability, as has been proved by trials with colouring solutions and dialysator tests with electrolytes. A quicker permeation of fuchsin S in a hydrochloric solution than in neutral solution may be explained by a change in the degree of dispersion of the dissolved colouring matter caused by the acid. It has not been possible to find an exceedingly great permeability of the membrane in acid solution.

The testa of the pea, together with the nitrogenous buffer-combinations, given up by the seeds, acts for the protection of the seedling in lower  $p_H$  constants.

### Literatur

1. BECK: Vergleichende Anatomie der Samen von *Vicia* und *Ervum*. Sitzungsber. d. Akad. Wien, 1878. Bd. 77, 1. Abteilung 545. — 2. BENECKE-JOST: Pflanzenphysiologie. Bd. II. Jena 1924. — 3. HABERLANDT: Physiologische Pflanzenanatomie. 4. Aufl. Leipzig 1909. — 4. HABERLANDT: Über die Entwicklungsgeschichte und den Bau der Samenschale bei der Gattung *Phaseolus*. Sitzungsber. d. Akad. Wien, 1877. Bd. 75, 1. Abteilung. — 5. KLEBS: Beiträge zur Morphologie und Biologie der Keimung. Untersuchungen aus dem Bot. Insti-

tut zu Tübingen. Bd. I. 1885. 536. — 6. MÖLLER: Mikroskopie der Nahrungs- und Genußmittel. 2. Aufl. Berlin 1905. — 7. NEJOLITZKY: Anatomie der Angiospermensamen. Bd. X vom Handbuch der Pflanzenanatomie. Berlin 1926. — 8. SCHROEDER: Über die selektiv permeable Hülle des Weizenkornes. Flora 1911, 102, S. 188. — 9. SEMPOLOWSKI: Über den Bau der Schale landwirtschaftlich wichtiger Samen. Landw. Jahrbücher. 1874, 3, 82. — 10. TSCHIRCH: Beiträge zur Kenntnis des mechanischen Systems. Pringsh. Jahrb. 16, 1885, S. 313. — 11. ARCHICHOWSKI: Über die Sterilisation der Samen mit Brom. Centralbl. f. Bakt. Bd. 37, 1913, S. 332. — 12. BUTKEWITSCH: Über das Vorkommen eines proteolitischen Enzyms bei der Keimung. 7. physiolog. Chemie. 1901. — 13. BUTKEWITSCH: Das Ammoniak als Umwandlungsprodukt stickstoffhaltiger Stoffe. Biochem. Ztschr. Bd. 16, S. 411. 1909. — 14. CASTORO: Untersuchungen über die Frage, ob die Keimung von Pflanzensamen mit einer Entwicklung von freiem Stickstoff verbunden ist. Landw. Versuchsstation. 1904. — 15. CZAPEK: Biochemie der Pflanzen. Bd. II. Jena 1920. S. 41—51. — 16. KIESEL: Über fermentative Ammoniakspaltung in höheren Pflanzen. Ztschr. f. physiolog. Chem. 60, 1909. 453. — 17. KIESEL: Über das Verhalten des Asparagins bei Autolyse von Pflanzen. I. c. S. 476. — 18. KLEIN und KISSEK: Die sterile Kultur der höheren Pflanzen. Jena 1924. Botanische Abhandlungen. Heft 2. — 19. MOTHES: Eiweißstoffwechsel von Laubblättern. Ber. Bot. Ges. 45, 7. 1927. — 20. NABOKICH: Über den Einfluß der Sterilisation der Samen auf die Atmung. Ber. Bot. Ges. 21, 1903. 279. — 21. POLOWZOW: Untersuchungen über die Pflanzenatmung. Bot. Centralbl. Bd. 93, 1903. 462. — 22. PRIANISCHNIKOW u. SCHULOW: Über die synthetische Asparaginbildung in den Pflanzen. Ber. Bot. Ges. 1910, S. 261. — 23. E. SCHULZE: Ztschr. physiolog. Chem. 22, 82. 1896. — 24. DE ZEEUW: The comparative viability of seeds. Fungi and Bacteria, when subjected to various chemical agents. Centralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. 31, 1904. 4. — 25. BROWN: On the existence of a semipermeable membrane enclosing the seeds of some of the Gramineae Ann. Bot. 21, 79. 1909. — 26. BROWN: The selective permeability of the coverings of the seeds of *Hordeum vulgare*. Proc. Roy. Soc. London. Bd. 81, 82—93. 1909. — 27. COLLANDER: Über die Durchlässigkeit der Kupferferrozyanidniederschlagsmembran für Nichtelektrolyte. Kolloidehem. Beihefte 1923, 19, 22—105. — 28. GRAFE: Anwendung von Adsorption und Kapillarität zur biochemischen Analyse. Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden von Abderhalden, Abt. XI, Teil II, Heft 1. Berlin 1920. — 29. KOTTE: Turgor und Membranquellung bei Meeresalgen. Wissenschaft. Meeresuntersuch. N. F. Bd. 17. — 30. MICHAELIS: Die Permeabilität von Membranen. Naturwissenschaft. 1926, Heft 3. S. 33—44. — 31. RIPPEL: Bemerkungen über die vermeintliche Widerstandsfähigkeit des trockenen pflanzlichen Protoplasmas gegen wasserfreien Alkohol, Äther und andere Anästhetika. (Beitrag zur Erkenntnis der Kolloideigenschaften pflanzlicher Membranen.) Biolog. Zentralbl. 37, 1917. 477. — 32. RIPPEL: Semipermeable Zellmembranen bei Pflanzen. Ber. bot. Ges. 36, 1918. 202. — 33. SCHIPS: Über die Cuticula und die Auskleidung der Intercellularen in den Samenschalen der Papilionaceen. Ber. bot. Ges. 1893, 11. 311. — 34. SCHROEDER: Über die Semipermeabilität von Zellwänden. Biol. Zentralbl. 1922, 42. 172. — 35. SHULL: Semipermeability of seed coats. Bot. Gaz. 1913, 56, 169. — 36. SHULL und DAVIS: Delayed germination and catalase activity in *Xanthium*. Bot. Gaz. 1923, 75, 268. — 37. WALTER: Protoplasma und Membranquellung bei Plasmolyse. Pringsh. Jahrb. 1923, 62, 145.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Botanisches Archiv. Zeitschrift für die gesamte Botanik](#)

Jahr/Year: 1929

Band/Volume: [26](#)

Autor(en)/Author(s): Muhlack Erich

Artikel/Article: [Zur Keimungsgeschichte der Erbse 437-485](#)