

## MIKROCHEMISCHE ANALYSE VON SAMEN OHNE VERLUST IHRER KEIMFÄHIGKEIT.

Von

NICOLAI N. IWANOFF.

Aus dem biochemischen Laboratorium des Instituts für Pflanzenbau in Leningrad.

*(Eingelangt am 4. September 1936.)*

Bis vor kurzem wurde bei der Pflanzenzucht die chemische Analyse nicht angewandt. Die Pflanzenzüchter bestimmten nach dem Geschmack den Zuckergehalt der Früchte, nach dem Geruch — die ätherischen Öle und urteilten nach dem Bruchaussehen des Kernes über den mehr oder weniger großen Gehalt an Protein und Stärke. Die früheren Züchter haben in der Geschichte der Selektion ihre nutzbringende Rolle erwiesen, wobei sogar L. BURBANK ohne Chemie auskam, der Züchter der Jetztzeit aber muß sich bei der Wahl der Sorten in bezug auf die Quantität und Qualität chemischer Stoffe in den Pflanzen auf die chemische Analyse stützen.

Der Züchter verlangt von dem Chemiker die Ausarbeitung einfacher Methoden zur Analyse einer großen Menge von Material in kurzer Zeit, wobei gewöhnlich eine Mittelprobe von Samen- oder Fruchtmaterial zur Untersuchung kommt. Die Chemiker werden mit dieser Aufgabe leicht fertig. Sie haben nur dafür zu sorgen, daß die der Analyse unterworfenen Probe tatsächlich das wiedergibt, was in dem zu untersuchenden Material vorhanden ist. Es können nämlich nicht nur Pflanzen einer Art und Sorte, sondern auch einzelne Früchte, sogar einzelne Samen, die von ein und derselben Pflanze genommen wurden, sich in chemischer Hinsicht ganz beträchtlich voneinander unterscheiden. Die individuelle Veränderlichkeit ist bisweilen so groß, daß wir gezwungen sind, in unserer Laboratoriums-Praxis bei Analysen eine mög-

lichst große Anzahl von Früchten vorzunehmen, damit die Analysen den tatsächlichen Stoffgehalt wiedergeben; zur Analyse der Wassermelone nehmen wir 5, bei der des Apfels — 10 Stück usw., da unsere Praxis uns zeigt, daß Früchte, die dem Aussehen nach gleich reif sind, in der Summe einzelner Zuckerarten und im Saccharose-Gehalt (1) beträchtliche Unterschiede aufweisen.

Mit der Verfeinerung der chemischen Methoden und der Anwendung der Mikrochemie erhebt sich indessen die Frage nach dem individuellen chemischen Studium der Früchte und Samen, sowie nach der Klarlegung der Gründe dieser Veränderlichkeit. Es ist in der Tat wichtig zu wissen, ob diese Erscheinung von äußeren Einflüssen (phänotypische Veränderlichkeit) abhängt, oder aber ob die chemischen Veränderungen einen genotypischen Charakter tragen. Bei dem Analysieren der Mittelproben von Samen und Früchten ist es uns nicht möglich, die für den Pflanzenzüchter sehr wichtigen individuellen chemischen Unterschiede festzustellen, welche z. B. durch Mutationen entstanden sein können.

Angesichts der Wichtigkeit der gestellten Aufgabe hat unser Laboratorium eine Reihe mikrochemischer Verfahren ausgearbeitet und angewandt, welche nicht nur die Analyse einzelner Samen möglich machen, sondern sogar gestatten, Proben zur Analyse zu nehmen, ohne dabei die Keimfähigkeit dieser Samen zu beeinträchtigen.

#### Das Feststellen alkaloidfreier Lupinus- Formen.

Die Anwesenheit von bitteren, der Ernährung der Tiere schadenden Alkaloiden galt immer für einen negativen Faktor, den die frühere Pflanzenzucht von jeher zu bekämpfen suchte. Bei der Auslese strebte man nach geringem Alkaloidgehalt, man erforschte den Einfluß einer Reihe erblicher Faktoren sowie den Einfluß der Bodenernährung auf die Bildung von Alkaloiden bei *Lupinus* (RÖHMER, 1917). Bei dieser Auslese wurde die Befürchtung ausgesprochen, daß die Zucht von Pflanzen mit herabgesetztem Alkaloidgehalt eine Verringerung des Proteingehaltes mit sich führen könnte, da nach den Angaben von GUILLAUME (2) die Stoffe, die begünstigend auf die Steigerung des Ernteertrags und des

Proteingehaltes wirken, gleichzeitig auch eine Vergrößerung der Alkaloidmenge hervorrufen. Doch die frühere Pflanzenzucht, welche sich auf die Wahl von Mittelproben stützte, hatte in dieser Frage keinen Erfolg. Von praktisch arbeitenden Züchtern wurde schon lange darauf hingewiesen, daß unter den gewöhnlichen bitteren Lupinus-Formen auch einzelne süße Samen vorkommen, doch eine solche Auslese auf Grund organoleptischer Merkmale durchzuführen, erwies sich als unmöglich. Von 1927 an wurde im Institut von ERWIN BAUR (Müncheberg i. Mark) von SENGBUSCH (3) die Methode der individuellen Auslese von süßen Lupinussamen an Hunderttausenden, sogar Millionen geprüfter Proben angewandt. Es erwies sich, daß süße Lupinus-Formen äußerst selten vorkommen; in einem Falle konnte unter 1,000.000 Proben nicht ein einziger alkaloidloser Same entdeckt werden. Die erhaltenen süßen Samen wurden eifrig vermehrt und machten es möglich, in Deutschland in großen Mengen Lupinus mit geringem Alkaloidgehalt (*L. angustifolius*, *L. luteus* und *L. albus*) zu erhalten. Indem wir das Feststellen alkaloidloser Lupinus-Formen in Deutschland als eine große praktische Errungenschaft anerkennen, müssen wir jedoch bemerken, daß die Arbeiten von SENGBUSCH in theoretischer und methodischer Hinsicht uns nicht genützt haben, da er keine Beschreibung davon gab, auf welche Weise er die Auslese der einzelnen Samen betreffs der Alkaloidlosigkeit bewerkstelligte, indem er versprach, im weiteren eine Aufklärung zu geben. Das Geheimhalten der Auslesemethode stand mit dem Umstande in Verbindung, daß das Erhalten süßer Lupinus-Formen in Deutschland sich zu einem kommerziellen Unternehmen umgestaltete.

Wir waren daher in U.S.S.R. gezwungen, selbständig alkaloidlose Lupinus-Formen zu entdecken und die Methode ihres Erhaltens zu beschreiben.

Unsere Hauptaufgabe war, die zur Analyse notwendigen Proben den einzelnen Lupinussamen so zu entnehmen, daß sie dabei ihre Keimfähigkeit nicht einbüßen. Es ist vollkommen klar, daß bei einer Massenauslese, wo Millionen von Proben zur Untersuchung kommen, nur die Methode der Farben-Reaktionen zur Alkaloidbestimmung angewandt werden konnte. Die Literatur verfügt über zahlreiche ausgearbeitete Alkaloidreaktionen, von denen wir gemeinsam mit M. I. SMIRNOVA diejenige wählten, welche unsern

Zwecken am meisten entsprach, und wandten sie nach einer Reihe von Versuchen zum schnellen Erkennen der Anwesenheit von Alkaloiden in *Lupinus* an (4).

#### Methodik der Alkaloid-Bestimmung von *Lupinus*.

Die an die Methodik der Alkaloidbestimmung gestellten Forderungen sind vollkommen klar — die Methode muß einfach und schnell ausführbar sein, sehr wenig Material beanspruchen und nicht nur für Samen, sondern auch für Blätter und Stengel der Lupine anwendbar sein. Unter allen von uns erprobten Reaktiven für Alkaloide blieben wir bei Jodlösung in Jod-Kalium stehen (Reaktiv von BUCHARD), welche in folgender Weise bereitet wird: 20 g KJ werden in 30 ccm Wasser gelöst, 13 g Jod hinzugegeben und nach dessen Lösung das Wasservolum bis auf 1 Liter gebracht. Das Reaktiv wurde mit Wasser verdünnt, bis es die Farbe von Portwein erhielt. Dieses Reaktiv prüften wir mit einer schwachen Lösung von Alkaloiden, welche nach MACH und LEDERLEY (1921) aus *Lupinus* erhalten worden waren. Die Reaktion erwies sich als sehr empfindlich, die Alkaloidlösung gab sogar bei Verdünnung von 0,005% mit dem Jodreaktiv einen rotbraunen Niederschlag. Nachdem wir die Sensibilität des Reaktivs erprobt hatten, benutzten wir es bei unseren Versuchen, die wir in folgender Weise ausführten: Wir schneiden mit einem Skalpell oder Messer einen kleinen Teil des Samens ab, jedoch so, daß der Keim dabei nicht berührt wird. Noch besser ist es, eine kleine Probe des Materials aus einem trockenen Samen zu nehmen, indem man mit einer Nadel die Schale aufschlitzt und eine geringe Gewebemenge auf ein Objektglas oder Uhrglas schabt; darauf zerdrücken wir das Material sorgfältig mit einem Glasstäbchen und fügen zwei Tropfen Jod-Jodkalium-Lösung hinzu — sofort erhalten wir einen charakteristischen rotbraunen Alkaloid-Niederschlag. Das Glas mit der Probe muß auf weißes Papier gelegt werden; indem wir eine nephelometrische quantitative Analyse der Lupine machen und die Intensität der Färbung mit derjenigen des Niederschlages vom Jod-Jodkalium-Reaktiv vergleichen, können wir nach der Intensität der Färbung annähernd über die Alkaloidmenge urteilen. Zum Vergleich der Fär-

bungen nehmen wir zur Kontrolle gewöhnlich zwei einzelne Reaktivtropfen auf ein Objekt- oder Uhrglas. Samen, die kein Alkaloid enthalten, geben keine spezifische Färbung. Die Untersuchungen bezüglich des Alkaloidgehalts können an den Würzelchen der Keimlinge oder an den Blättern des *Lupinus* vorgenommen werden, in denen trotz Vorhandensein von Chlorophyll eine deutliche Färbung durch das Reagens beobachtet werden kann, nach der wir auf einen mehr oder weniger großen Alkaloidgehalt der Samen schließen können. Diese Reaktionen geben die Möglichkeit, nicht nur den Alkaloidgehalt annähernd zu bestimmen, sondern auch die Teile des Samens festzustellen, in denen die Ansammlung von Alkaloid vor sich geht. Zu diesem Zwecke nahmen wir mikroskopische Schnitte. Wir ließen die Lupinussamen in Wasser weichen, machten dann mit einem scharfen Rasiermesser einen feinen Schnitt, brachten denselben auf das Objektglas und fügten 1—2 Tropfen des Reaktivs hinzu. Unter dem Mikroskop sehen wir den Rückstand eines derivaten Alkaloids in Gestalt von rötlichen Körnchen in Zellen, welche hauptsächlich an der Peripherie der Zellen oder auch außerhalb derselben gelegen sind. An den Keimblättern, den Würzelchen und Stengeln sind auch durch Wirkung des Jods die Alkaloidkörnchen unter dem Mikroskop gut sichtbar. Diese mikroskopischen Beobachtungen geben die Möglichkeit, selbst sehr geringe Alkaloidmengen zu erkennen; bei dem Erhalten des alkaloidarmen *Lupinus* haben sie auch eine wichtige Rolle gespielt<sup>1</sup>.

Bei der Auslese der Lupinussamen, welche den Zweck hatte, ohne Verlust der Keimfähigkeit alkaloidlose Samen auszusondern, schlossen wir gewöhnlich alle diejenigen Samen aus, die nach Bearbeitung mit Jod eine intensive Färbung gaben; bei schwacher Färbung unterwarfen wir das Material mikroskopischen Studien. Bei Rationalisierung der Arbeit mit dieser Reaktion machten unsere Pflanzenzüchter FEDOTOW und SCHARAPOW an einem Arbeitstage über 1000 Alkaloidbestimmungen an Lupinussamen.

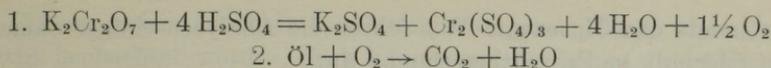
<sup>1</sup> Über die mikroskopische Bestimmung der Alkaloide ist eine große Literatur aus der bekannten Wiener Schule von Prof. H. MOLISCH hervorgegangen, insbesondere die Arbeit von G. KLEIN (s. *Österreichische Bot. Zeitschr.* 78, 67 [1929] und andere).

Die Resultate der Auslese der Samen von alkaloidlosen Lupinen sind jetzt allgemein bekannt. Infolge der Anwendung der iodometrischen Samenproben ohne Verlust der Keimfähigkeit haben wir in der U.d.S.S.R. hunderte von Hektar alkaloidarmer süßer Lupinusformen. Der Alkaloidgehalt fällt in einigen Partien von Lupinus bis auf 0,005%. Wir meinen, daß die Anwendung der mikrochemischen Methoden die Möglichkeit geben wird, unter den Lupinen auch proteinreiche Formen auszulesen.

#### Die Ölbestimmung in Samenteilten.

Eine gleichartige Aufgabe bot auch die Auslese ölreicher Samen. Die analytische Zucht der Sonnenblume hat bestimmte Erfolge erzielt, indem sie eine große Anzahl Samen von einer Pflanze sammelte und dann aus der Mittelprobe einen gesteigerten Ölertrag erhielt. So gab z. B. die Aussaat von Samen einer Mittelprobe, welche 64% Öl pro Kern enthielt, Früchte mit einem Ölgehalt, der dem ursprünglichen Gehalt von 64% annähernd gleich kam. Es ist jedoch klar, daß inmitten der Mittelprobe Samen mit noch größerem Ölgehalt vorkommen müssen, wobei die frühere Methodik nicht die Möglichkeit gab, die einzelnen Samen zu analysieren. Gegenwärtig hat A. I. ERMAKOW (6) in unserem Laboratorium zwei Methoden vorgeschlagen, von denen die eine es möglich machte, das Öl in einem Samen zu bestimmen, der nicht weniger als 0,20 g wog, wobei der Durchschnittsgehalt der Samen nicht weniger als 20% betrug. Die andere Methode gab die Möglichkeit, Proben von einzelnen Teilen der ölhaltigen Samen zu nehmen mit einem Gewicht von 4—5 mg, ohne dabei die Keimfähigkeit der Samen zu beeinträchtigen. ERMAKOW (6) benutzte zur Bestimmung geringer Ölmengen das Prinzip von IWATSURU und Mitarbeitern (7), sowie auch von KATSURA und T. HATAKEYAMA (8), deren Arbeiten die Bestimmung von Öl aus animalischen Objekten betrafen, doch schlug er eine originelle Methode der Ölextraktion aus Samenteilten vor.

Mikromethodik der Ölbestimmung. Das Öl wurde durch Äther extrahiert und, nachdem dieser durch Verdampfen sorgfältig entfernt war, einer Oxydierung durch Chrommischung bis auf Kohlensäure und Wasser unterworfen (nach NICLOUX).



Am besten verlief die Oxydierung bei Anwendung der Mischung  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  und  $\text{Ag}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  im Verhältnis 1 : 4.

Die Bestimmung ging in folgender Weise vor sich. Die Samen oder Samentheile 2,0—20 mg schwer, werden 2,5 Stunden bei 100 bis 105° C im Thermostat getrocknet; der Schnitt wird in ein Stückchen Filtrierpapier gewickelt, wobei das Papier keinesfalls ange- drückt werden darf, um ein Auspressen des Öls zu verhüten; man trocknet dann den Schnitt im Wiegegläschen und wiegt ihn auf der Mikrowaage mit einer Genauigkeit auf 0,01 mg. Die Schnitte werden zwischen besonderen kleinen Reibern zerrieben, welche mit dem Material in die Extraktoren kommen, wo ein 5maliges Ziehen mit je 4 ccm Äther stattfindet. Das erstmalige Ziehen dauert 1,5 Stunden, die übrigen je 0,5 Stunden. Der Ätherextrakt wird in einen Meßkolben von 25 ccm gegossen, von wo nach Durchmischen drei Proben à 5 ccm in ERLÉNMEYER'sche Kolben genommen werden. Aus diesen Proben wird durch Erwärmen bis 60° C der Äther bis auf die letzten Spuren entfernt und darauf 2—4 ccm oxydierender Mischung beigefügt und bei einer Temperatur von 105—110° C für 1—1,5 Stunden in den Thermostat gestellt, darauf werden die Proben herausgenommen, gekühlt, 20 ccm Wasser hinzugegossen und nach Abkühlung 5 ccm 10% KJ beigefügt, worauf das frei gewordene Jod mit n/10 Hyposulfit aus einer Mikrobürette titriert wird. 1 mg Sonnenblumenöl braucht 3,48 ccm n/10 Hyposulfit. Es wurde immer ein Kontrollversuch angeordnet.

Anwendung der Methode. ERMAKOW führte die Ölbestimmung in 32 einzelnen Samen von *Arachis hypogea* durch und fand im Ölgehalt Schwankungen von 49,10 bis 58,42%. In Samen, die von verschiedenen Ricinuspflanzen reiner Linie genommen waren, wurde im Ölgehalt ein Schwanken von 59,0—73,7% beobachtet.

Bei Benutzung des reinen Materials der Sonnenblumensamen des in Sotschi erhaltenen Ernteertrags von 1927 nahm ERMAKOW von den 43 Samen mit einem Rasiermesser (nach Entfernung der Schale) Schnitte an der dem Keime entgegengesetzten Seite und

bestimmte das Ölprozent. Wir führen die Analysen einiger Samen auf Ölgehalt in Prozentberechnung an:

1 — 35,7	21 — 48,9	41 — 60,3
2 — 37,3	22 — 48,5	42 — 65,0
3 — 37,5	23 — 48,7	43 — 65,2

Die Samen, von denen Schnitte zur Ölbestimmung genommen waren, keimten gut und ergaben normale Pflanzen. Einzelne Samen dieser Sonnenblumenpflanzen werden gegenwärtig der Analyse unterworfen. Es mußte nur noch gezeigt werden, daß die aus dem oberen Teile des Samens genommenen Schnitte den Durchschnittsölgehalt der ganzen Samen wiedergeben.

Die Analyse gab folgende Resultate:

Nr. der Schnitte	Samenteile, von denen die Schnitte genommen wurden	Stoffmenge in mg	Ölprozent
1	Keim mit umgebendem Gewebe	5,34	48,2
2	Erster Querschnitt vom Keim	11,41	49,0
3	Zweiter Querschnitt vom Keim	13,62	49,1
4	Dritter Querschnitt vom Keim	8,71	49,0
5	Äußerer Querschnitt vom Keim	5,45	48,0

Auf diese Weise gibt die Schnittprobe den Ölgehalt des Samens wieder, so daß diese Methode zur Auslese öltreicher Samen benutzt werden kann.

Die iodometrische Methode gibt auch die Möglichkeit, einzelne Flachssamen zu analysieren, welche ein Gewicht von 4—7 mg haben. Nachdem ERMAKOW 87 einzelne Flachssamen (Zwischensorte der Stawropoler Station) mit einem Durchschnittsölgehalt von 44,51% analysiert hatte, fand er, daß die einzelnen Samen sich wesentlich voneinander unterscheiden.

Nr. der Samen	Gewicht der Samen in mg	Ölprozent
1	6,29	37,5
2	4,91	37,1
3	6,01	38,2
85	5,89	50,2
86	5,43	50,4
87	6,01	53,5

Ein so hoher Ölgehalt in Mittelproben von Flachs war noch nicht beobachtet worden, doch können solche Samen zur Aussaat nicht benutzt werden, da sie vollzählig zur Analyse verwandt werden. ERMAKOW hat nachgewiesen, daß sogar Samen, die aus einer Kapsel genommen waren, sich voneinander unterschieden, und bloß zwei Samenkörner, die aus einem Fach stammen, ein genaueres Übereinstimmen offenbaren. Dieser Umstand kann bei der Auslese öltreicher Formen ausgenutzt werden, d. h. der eine Same kann der Analyse, der andere dem Keimen überlassen werden.

#### Proteinbestimmung in Samenteilcn.

Es ist klar, daß der Pflanzenzüchter bei dem Lösen des Proteinproblems nach den proteinreichsten Pflanzensorten streben muß. Die Biochemiker wissen, daß solche Pflanzen unter den Getreidearten und den Leguminosae zu finden sind. Es gibt Erbsensorten, welche 20,5—21,4% (Victoria Heine) und 34,9% (Wunder Amerikas) Protein enthalten. Wir haben Gelegenheit zu zeigen, daß viele Leguminosen (Erbse, Bohne, Linse, Wicke) in ihrem chemischen Bastarde als ziemlich konstant erscheinen und von den Boden- und Klimafaktoren wenig abhängig sind, da sie überhaupt des Bodenstickstoffs nicht bedürfen (9). Da wir von dem geringen Einfluß äußerer Faktoren auf den Chemismus der Erbsensamen unterrichtet waren, erwarteten wir keine bedeutende Veränderlichkeit im Proteingehalt bei den einzelnen Erbsensamen, es erwies sich jedoch, daß diese Erscheinung bei einigen Sorten auftritt, bei andern dagegen — nicht.

M. I. KNJAGINITSCHEW (10, 11) fand kürzlich, indem er die mikrochemische Methode der Stickstoffbestimmung anwandte, daß in den einzelnen Erbsensamen ein und derselben Sorte in bezug auf Proteingehalt folgende Schwankungen stattfinden.

Sorte	Protein % in den einzelnen Samen	Schwankungsweite der Veränderlichkeit in den Grenzen der reinen Linie
Victoria Heine	20,5 — 21,4	0,9
Red Stipula	12,0 — 21,8	9,8
Wunder Amerikas		
Linie 493/1	22,5 — 34,6	12,1
Linie 2414	33,4 — 46,0	12,6

Diese Schwankungen in den einzelnen Erbsensamen erwiesen sich bedeutend größer als diejenigen, welche KOPECKY und ALMENDINGER (12) beobachtet hatten, als sie die Proteinschwankungen in den Erbsensamen einer Schote bestimmten. Eine solche Veränderlichkeit im Chemismus der Samen innerhalb einer reinen Linie mußte unsere Aufmerksamkeit auf sich lenken. Es erweist sich, daß zur Wiedergabe des chemischen Mittelbestandes einer reinen Erbsenlinie wir uns nicht auf einzelne Samen beschränken dürfen, sondern unsere Mittelprobe aus einer großen Anzahl von Samen nehmen müssen.

Andererseits wird durch dieses Nichtübereinstimmen die Frage nach den Ursachen der Veränderlichkeit einzelner Samen angeregt. Wenn diese Erscheinung mit phänotypischen Faktoren (Reifegrad, Zufuhr von Nahrungsstoffen) usw. in Verbindung steht, so ist es klar, daß Samen mit gesteigertem Proteingehalt bei der Aussaat Samen mit einem Mittelgehalt von Protein ergeben werden; wenn aber dieser große Proteingehalt auf genotypischen Ursachen beruht, so müssen wir aus solchen Samen in hohem Grade proteinreiche Formen erhalten oder eine Spaltung dieses Merkmals beobachten, wenn wir es mit heterozygotischem Material zu tun haben.

Ogleich die Morphologen oft nach äußeren Merkmalen das Erbsenmaterial reinling anerkennen, kann die chemische Analyse doch eine große Schwankung der Veränderlichkeit zwischen den einzelnen Samen finden, und der Biochemiker erhält das Recht zu behaupten, daß das Material von seiten der Chemie nicht für rein-sortig gehalten werden kann.

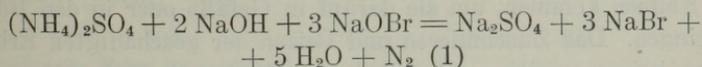
Um aber darüber urteilen zu können, ob die chemischen Veränderungen phänotypischen oder genotypischen Ursprungs sind, muß man so weit kommen, den chemischen Bestand der Samen in bezug auf Protein so zu bestimmen, daß die Keimfähigkeit der untersuchten Samen dabei nicht eingebüßt wird.

Mikrochemische Methodik der Proteinbestimmung bei Erbsen. M. I. KNJAGNITSCHEW hat eine Methode ausgearbeitet (10), welche es gestattet, kleine Proben aus größeren Samen von Bohnen, Lupinus, Linse, Kichererbse und Erbse zu nehmen. Er benutzt zum Probenehmen die gewöhnliche Zahnbohrmaschine, die durch einen Elektromotor in Bewegung gesetzt wird.

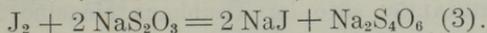
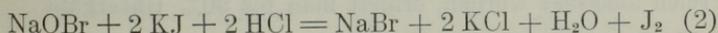
In den Ansatz der Maschinenschnur werden gewöhnliche Zahnbohrer eingesteckt, die bei verschiedenem Durchmesser und verschiedener Kerbung die Möglichkeit geben, sich an die Größe der einzelnen Samen anzupassen. Der Versuch mit den Erbsensamen wurde auf folgende Weise ausgeführt. Die Samen wurden im Laufe einer Nacht bei  $t^0$  von 30—35° C angetrocknet, wobei an der Stelle, wo die Probe zur Analyse genommen werden sollte, ein kleiner Teil der Schale vorläufig mit einer scharfen Lanzette abgelöst wurde. Darauf wurde mit großer Vorsicht, um den Keim nicht zu schädigen, eine Probe herausgebohrt. Das erhaltene Mehl hatte eine feine Konsistenz. Wenn wir annehmen, daß ein Erbsensame 4,5% Stickstoff enthält, so genügt es, für eine einzelne Probe 10—12 mg Mehl herauszubohren; wenn es aber wünschenswert ist, zwei Parallelanalysen zu machen, so müssen 20—25 mg Material erhalten werden. Das Wiegen gibt jedesmal gegen 0,5 mg Stickstoff, was zur Stickstoffbestimmung nach Mikrokjeldahl vollkommen genügend ist.

KNJAGINITSCHEW hat der Mikrostickstoffbestimmung die hypobromide Methode (s. TREADWELL, Kursus der analytischen Chemie) angepaßt, welche bei Bestimmung von 0,25 mg Stickstoff pro Probe gute Resultate gab. So erhielt er in einem Falle bei dem Wiegen von 18,8 mg Erbse nach der hypobromiden Methode 4,0% Stickstoff, nach Mikrokjeldahl 4,05%.

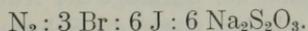
Die Grundreaktion, nach der die Ausscheidung von Stickstoff aus den schwefelsauren Ammoniaksalzen stattfindet, verläuft in folgender Weise:



Das unzerlegt zurückbleibende Hypobromid wird jodometrisch nach folgenden Gleichungen bestimmt:



Zwischen Stickstoff und anderen reagierenden Stoffen entstehen folgende Beziehungen:



Um berechtigt zu sein, nach den genommenen Proben über die

Stickstoff- und Proteinmenge im ganzen Samen zu urteilen, führte KNJAGINITSCHEW Analysen von solchen Proben aus, die von verschiedenen Stellen ein und desselben Samens genommen waren (Sorte „Golden“), indem er von der Oberfläche aus zum Zentrum kegelförmig Teilstücke herausbohrte; die jedesmaligen Gewichtsmengen betragen von 9—25 mg. In den einzelnen Erbsen-Proben wurde an Stickstoff in Prozenten erhalten:

Nr.	1	2	3	4	5
Stickstoff in %	3,61	3,64	3,78	3,54	3,69

Diese Zahlen sprechen dafür, daß die beschriebene Methode des Probenehmens für Stickstoffanalyse bei der Charakteristik einzelner Samen angewendet werden kann. Die Schwankungen zwischen den äußersten Abweichungen sind verhältnismäßig nicht groß, besonders, wenn wir den Mittelwert von zwei Bestimmungen nehmen.

Anwendung der Methode. Solche Erbsensamen, aus denen Proben zur Proteinbestimmung genommen worden waren, ließ man keimen und sie gaben einen Ernteertrag.

Wie zu erwarten war, erwiesen sich die Erbsensamen mit geschädigter Schale nach dem Herausnehmen von Proben aus ihren Keimblättern bei der Aussaat in den Boden als äußerst empfindlich gegen Schädigungen durch Bakterien, Pilze und Insekten.

Im Hinblick auf diesen Umstand ließ KNJAGINITSCHEW zur Verhütung von Fäulnis solche Samen auf feuchtem Filtrierpapier zum Keimen kommen, um sie darauf in Gefäße oder in den Boden zu bringen. Das Zuschmieren und Beizen der geschädigten Erbsen hat zu keinen positiven Resultaten geführt.

Wenn aber solche beschädigte Samen ohne Vorsichtsmaßregeln im Freien ausgesät wurden, erhielt man bis 90% Untergang.

E. N. SCHURALEW säte im Treibhaus einzelne Erbsensamen, welche auf Proteingehalt analysiert worden waren, erhielt einen Ernteertrag und verglich den Proteingehalt der Samen mit demjenigen des Ausgangssamens. So lange der Autor es mit der reinen Sorte „Golden“ zu tun hatte, waren die Schwankungen hinsichtlich des Proteingehaltes in den erhaltenen Erbsen nicht groß.

Versuch 1.	Protein %	
Ausgangssame Erbse der Sorte „Golden“, Ernteertrag 1933	20,13	
<hr/>		
Die von dieser Erbse erhaltenen einzelnen Samen des Ernteertrags 1934	20,37	In den zur Analyse genommenen 11 Samen waren die äußersten Schwankungen 18,44 und 22,85% Protein, durchschnittlich wurden 21,31% Protein erhalten — ein Wert, der sich von dem Ausgangssamen des Ernteertrags von 1933 wenig unterscheidet.
	22,27	
	18,44	
	20,94	
	22,00	
	20,25	
	22,37	
	22,85	
	22,31	
	21,13	
	21,44	

Versuch 2.	Protein %	
Ausgangssame Erbse der Sorte „Golden“, Ernteertrag 1933	19,17	
<hr/>		
Die von dieser Erbse erhaltenen Samen des Ernteertrags 1934	22,75	Bei 7 analysierten Samen wurden Schwankungen zwischen 18,13 und 22,75% Protein beobachtet. Durchschnittlich wurden 19,66% erhalten, d. h. beinahe ebenso viel wie im Ausgangssamen.
	19,19	
	20,00	
	18,22	
	18,13	
	18,32	
	20,99	

Ganz andere Beziehungen wurden in dem Falle beobachtet, wo zum Versuch ein Bastard von „Wunder Amerikas“ und „Golden“ angewandt wurde.

Versuch 3.	F <sub>1</sub>	
Ausgangssame Erbse Bastard von „Wunder Amerikas“ × „Golden“, Ernteertrag 1933	29,87	
<hr/>		
Die von dieser Erbse erhaltenen Samen, Ernteertrag 1934	F <sub>2</sub> 32,45	Schwankungen des Proteingehalts bei den einzelnen Samen — 21,85—35,31%; durchschnittlich 31,74% Protein.
	32,41	
	35,18	
	31,37	
	33,62	
	35,31	
	21,81	

Im letzten Beispiel sehen wir, daß in der zweiten Generation eine Spaltung des Bastards in eine proteinreiche (35,31%) und eine proteinarme (21,8%) Form stattfindet. Bei der Auslese dieser Samen und bei ihrem Aussäen könnten wir ein homozygotisches Material mit einem konstanten chemischen Bestande erhalten.

### Z u s a m m e n f a s s u n g.

Aus den angeführten Beispielen ist ersichtlich, daß in großen Samen in betreff des Proteingehaltes individuelle Veränderungen festgestellt werden können. Die beschriebenen Methoden geben die Möglichkeit, die Ursache dieser Veränderungen festzustellen und eine Antwort auf die Frage zu geben, ob diese Faktoren, welche diese Veränderungen hervorrufen, genotypischer Art sind und daher vererbt werden können und ob ein Festlegen des nützlichen Merkmals stattfindet, oder aber ob eine weitere Spaltung beobachtet wird?

Bei dem Studium der Genetik chemischer Merkmale kann diese Methode, welche die Analyse von Samenteilern ermöglicht, eine besondere Bedeutung haben. Wenn wir sogar in den Grenzen reiner Linien auf so große Schwankungen in Öl- und Proteingehalt der einzelnen Samen stoßen, so können wir selbstverständlich bei Samen, welche Populationen vertreten, eine noch vielmal größere Amplitude beobachten. Der alkaloidlose *Lupinus* war aus Populationen ausgelesen. Natürlich können unter einzelnen Samen dieses Materials auch proteinreiche Formen erhalten werden. Wir hatten Gelegenheit, in einzelnen Proben von gelben *Lupinus* bis 54% Protein ( $N \times 6,25$ ) zu finden; es ist klar, daß wir bei Anwendung individueller chemischer Analyse in einzelnen Samen noch höher stehende proteinreiche Formen finden können. Nur bei Anwendung dieser Methode werden wir solche chemische Veränderungen nicht unbeachtet lassen, welche durch die infolge des Mutationsprozesses entstandenen Erscheinungen hervorgerufen sind. Diese Methode ist für Massenbestimmungen noch ziemlich kompliziert, doch könnte hier durch Mikroskopieren der Samensorten geholfen werden, sowie auch durch das wenn auch nur annähernde Bestimmen des Stoffgehalts nach mikrochemischen Reaktionen; danach könnte man zu der komplizierteren chemischen Bestimmung des Stoffes nach oben beschriebener Methode übergehen.

Das Probennehmen aus einzelnen Samen kann auch für andere Stoffe, z. B. für Zucker in den Samen der Zuckerrerbse, für Pigmente, Vitamine und sogar Fermente angewandt werden, da für die Bestimmung der letzteren in der Literatur mikrochemischer Reaktionen ausgearbeitet sind. Natürlich können die Proben nicht nur aus Samen genommen werden; diese Methode läßt sich noch leichter anwenden, wenn wir es mit Knollen oder Zwiebeln zu tun haben. Wir müssen uns nur bei jedem bestimmten Objekte davon überzeugen, daß die von uns genommene Probe den tatsächlichen Stoffgehalt des zu untersuchenden Materials wiedergibt.

Die Literatur über die Physiologie der Samen gibt uns Beispiele, daß das Abschneiden eines Teiles des Endosperms und der Kotyledonen sich in der Entwicklung der Pflanze geltend macht. Deshalb müssen wir voraussetzen, daß jede Schädigung des Samens und das Entnehmen der Probe auf das Wachstum des Keimlings in gewissem Maße einwirken kann; jedoch ist diese Wirkung, wie aus den obigen Beispielen ersichtlich, nicht groß genug, um den chemischen Bestand der zu erhaltenden Pflanze zu verändern. Wir meinen, daß die Methode der individuellen mikrochemischen Analyse der Samen ohne Verlust der Keimfähigkeit der Verbreitung würdig ist, und daß sie bei dem Studium von Fragen chemischer Genetik dem Forscher zweifellos behilflich sein wird.

#### Literatur.

1. N. N. IWANOFF, Biochemische Grundlage der Pflanzenzüchtung. Theoretische Grundlage der Züchtung. B. I, 1935, Sselhosgis (Russisch). Bioch. Ztschr. 250, 430 (1932).
2. A. GUILLAUME, Recherches expérimentales sur le lupin. Paris, 1930.
3. R. v. SENGBUSCH, Bitterstoffarme Lupinen. Züchter H. 1. 1930; H. 4, 1931.
4. N. N. IWANOFF und M. I. SMIRNOVA, Directions for the use of colour reaction in the search of alkaloidless lupins. Problem of the alkaloidless Lupin, Leningrad (1932).
5. M. I. SMIRNOVA, Biochemie des Lupinus (im Druck).
6. A. I. ERMAKOW, Von der Methodik der Selektion in bezug auf Qualität. Pflanzenbau in U. S. S. R. Nr. 3 (1933). Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant-breeding. Ser. 3, Nr. 3 (1934).
7. R. IWATSURU, M. MORIMOTO und M. TAMURA, Biochem. Ztschr. 224, 477 (1930).
8. KATSURA und HATAKEYAMÁ, Biochem. Ztschr. 234, 456 (1931).

9. N. N. IWANOFF, Von der Stabilität des chemischen Bestandes bei den Leguminosae und bei Mais. Bulletin of Applied Botany, Genetics and Plant-breeding. Ser. 3, Nr. 5, 273 (1934).
  10. M. I. KNJAGINITSCHEW, Jodometrische Mikromethode der Bestimmung des allgemeinen Stickstoffs. Bull. of Applied Botany, Genetics and Plant-breeding. Ser. 3, Nr. 5, 273 (1934).
  11. M. I. KNJAGINITSCHEW, Veränderlichkeit des Proteingehalts in einzelnen Samen bei verschiedenen Erbsensorten. Pflanzenbau in U.S.S.R., Nr. 14, 1935.
  12. KOPECKY und V. ALMENDINGER, Sbornik Československé Ak. Zemědělské I, 68 (1930).
  13. E. M. SCHURAWLEW, Veränderlichkeit und Vererbung des Proteingehaltes in Erbsensamen (im Druck).
-