

Findet man in Pflanzensamen und in Keimpflanzen anorganische Phosphate?

Von

E. Schulze und N. Castoro.

(Aus dem agrikulturchemischen Laboratorium des Polytechnikums in Zürich.)

(Der Redaktion zugegangen am 7. April 1904.)

Bekanntlich war man früher der Ansicht, daß in den Pflanzensamen der Phosphor größtenteils in Form anorganischer Phosphate sich vorfinde.¹⁾ Diese Ansicht mußte modifiziert werden, nachdem man in den Samen mancherlei Verbindungen der Phosphorsäure mit organischen Atomkomplexen gefunden hatte; als solche Verbindungen nenne ich die Lecithine, die Nucleine, die Nucleoproteide und die bei der Spaltung Inosit liefernde gepaarte Phosphorsäure, welche zuletzt von Posternak²⁾ untersucht und als Anhydrooxymethylendiphosphorsäure bezeichnet worden ist. Immerhin war auch jetzt noch die Meinung zu finden, daß ein Teil des Phosphors der Samen anorganischen Phosphaten angehöre, und man suchte diesen Teil quantitativ zu bestimmen, indem man ein in geeigneter Weise dargestelltes Extrakt mit einer Lösung von molybdän-saurem Ammon in Salpetersäure erwärmte und den dabei erhaltenen gelben Niederschlag sodann nach der gewöhnlichen Vorschrift behandelte. In der gleichen Weise suchte man auch den Gehalt von Keimpflanzen an anorganischen Phosphaten zu bestimmen;³⁾ aus den dabei erhaltenen Resultaten zog man die Schlußfolgerung, daß während der bei Lichtabschluß er-

¹⁾ Wie z. B. aus den von O. Löw in seiner Abhandlung: «Über die physiologischen Funktionen der Phosphorsäure» (Biolog. Zentralblatt, 1891, Bd. 11, Nr. 9 und 10) auf S. 270 gemachten Angaben sich ersehen läßt.

²⁾ Comptes rendus, vol. CXXXVII (1903).

³⁾ Solche Bestimmungen sind von Zalesky und von Iwanoff ausgeführt worden; ihre Abhandlungen sind zitiert in dieser Zeitschrift, Bd. XL, S. 118.

folgenden Keimung ein sehr beträchtlicher Teil des in den Samen in organischer Verbindung enthaltenen Phosphors in anorganische Phosphate übergeführt werde. Vor kurzem haben aber E. B. Hart und W. H. Andrews¹⁾ die in solcher Weise erhaltenen Zahlen auf Grund der von ihnen ausgeführten Versuche für ganz unrichtig erklärt; sie fanden, daß man weit niedrigere Resultate erhält, wenn man die bei Ausführung der Bestimmung zugesetzte Salpetersäurequantität verringert. Zur Erklärung dieser Erscheinung nehmen sie an, daß durch die Salpetersäure aus organischen Phosphorsäureverbindungen Phosphorsäure abgespalten wird. Fügt man nur das für die Ausführung der Bestimmung erforderliche Minimum an Salpetersäure zu, so erhält man aus den Samenextrakten nur so geringe Phosphorsäuremengen, daß man die Samen für frei oder fast frei von anorganischen Phosphaten erklären muß. Auch aus Keimpflanzen des Weizens, des Roggens und des Hafers, welche 2 Wochen lang bei Lichtabschluß sich entwickelt hatten, erhielten die genannten Autoren bei Anwendung des gleichen Verfahrens nur minimale Phosphorsäuremengen; sie nehmen an, daß in solchen Keimpflanzen zwar ein beträchtlicher Teil des Phosphors in lösliche Verbindungen, aber nicht in anorganische Phosphate übergeht.

Ohne Zweifel sind die von Hart und Andrews aus den erwähnten Untersuchungen abgeleiteten Schlußfolgerungen sehr beachtenswert, aber die Beweisführung, welche ihnen zugrunde liegt, scheint uns doch nicht völlig einwurfsfrei zu sein. Denn man kann die Frage stellen, ob die von den genannten Forschern der Lösung zugesetzte kleine Salpetersäuremenge hinreichte, um die in Form anorganischer Phosphate etwa vorhandene Phosphorsäure bei Gegenwart organischer Substanzen im Molybdänsäureniederschlag zur Ausscheidung zu bringen.²⁾ Es wäre vielleicht

¹⁾ American Chemical Journal, t. XXX, Nr. 6, Dezember 1903; sowie Bulletin Nr. 238 der New York Agricultural Experiment Station.

²⁾ Bei Titration der Phosphorsäure mit Molybdänlösung und Leim nach dem Verfahren von E. A. Grete (man vergleiche J. König, Die Untersuchung landwirtschaftlich und gewerblich wichtiger Stoffe, 2. Auflage, S. 147) muß man viel Salpetersäure zusetzen, um die Ausscheidung der Phosphorsäure in Form ihrer Molybdänsäureverbindung zu erreichen.

möglich gewesen, diese Frage zu entscheiden indem man einem als frei von anorganischen Phosphaten erkannten Untersuchungsobjekt ein bestimmtes Quantum eines solchen Phosphats zusetze und dann prüft, ob letzteres im Niederschlag wieder zum Vorschein kam; ein solcher Versuch ist aber, so viel wir wissen, bis jetzt nicht ausgeführt worden.

Um zu prüfen, ob Samen und Keimpflanzen anorganische Phosphate enthalten, haben wir einen andern Weg eingeschlagen. Unser Verfahren gründet sich auf die bekannte Tatsache, daß sowohl frisch gefälltes Tricalciumphosphat als auch Dicalciumphosphat in einer neutralen Lösung von Ammonicitrat löslich ist und daß man die Phosphorsäure aus dieser Lösung durch Magnesiamixtur¹⁾ ausfällen kann. Wir behandelten ein abgewogenes Quantum (in der Regel 9—10 g) der fein gepulverten lufttrockenen Samen oder Keimpflanzen bei Zimmertemperatur mit ca. 100 ccm 1%iger Salzsäure. Nach ca. 2stündiger Einwirkung der Säure wurde das Extrakt durch Filtration vom Ungelösten getrennt und sodann mit Chlorcalcium und Ammoniak versetzt. Es war anzunehmen, daß durch diesen Zusatz die durch die Salzsäure in Lösung gebrachte Phosphorsäure als Calciumphosphat gefällt wurde; allerdings liegt es im Bereich der Möglichkeit, daß dem Niederschlag auch Magnesiumphosphat beigemischt war. Der durch Chlorcalcium und Ammoniak erzeugte Niederschlag wurde nun abfiltriert und ausgewaschen, hierauf mit ca. 50 ccm Ammonicitratlösung übergossen. Wir ließen das Gemisch mindestens 24 Stunden lang bei Zimmertemperatur stehen, dann wurde die Lösung durch Filtration vom Rückstand getrennt und nun mit Magnesiamixtur versetzt, um die von dem Citrat gelöste Phosphorsäure als Ammoniummagnesiumphosphat zu fällen. Damit diese Verbindung genügende Zeit zur Ausscheidung hatte, ließen wir die mit der Magnesiamixtur versetzte Flüssigkeit mindestens 2 Tage lang stehen. Nach diesem Verfahren untersuchten wir folgende Samenarten: ²⁾

¹⁾ Mit diesem Namen bezeichnen wir der Kürze halber die bekannte Mischung von Chlormagnesium, Chlorammonium und Ammoniak.

²⁾ Die Koniferensamen wurden vor der Behandlung mit 1%iger Salzsäure mit Hilfe von Äther entfettet.

- Samen von *Lupinus angustifolius* (blaue Lupine), entschält;
 » » *Lens esculenta* (Linse);
 » » *Vicia Faba* (Ackerbohne);
 » » *Zea Mais* (Mais);
 » » *Picea excelsa* (Rottanne);
 » » *Pinus Laricio* (Schwarzkiefer);
 » » *Pinus Strobis* (Weymutskiefer);
 » » *Pinus Cembra* (Arve), entschält.

Nur die Samen von *Pinus Strobis* lieferten eine Ausscheidung von Ammoniummagnesiumphosphat, deren Quantität jedoch ganz unbedeutend war. Alle übrigen Samenarten lieferten kein Ammoniummagnesiumphosphat. In diesen Objekten ließen sich also nach unserem Verfahren keine anorganischen Phosphate nachweisen, ein Ergebnis, welches im Einklang mit den von Hart und Andrews gemachten Beobachtungen steht.

Anders war es bei etiolierten Keimpflanzen; hier erhielten wir Niederschläge von Ammoniummagnesiumphosphat von nicht unbedeutendem Gewicht. Für unsere Versuche verwendeten wir zunächst 12tägige Keimpflanzen von *Lens esculenta*, *Vicia Faba* und *Zea Mais*, gewachsen auf Gaze netzen, die über flache, mit destilliertem Wasser gefüllte Gefäße gespannt waren; nach der Ernte waren die Pflänzchen im Trockenschrank bei ca. 60° getrocknet worden. Später verwendeten wir noch für unsere Untersuchung 3wöchentliche Keimpflanzen von *Lupinus albus* und 4wöchentliche Keimpflanzen von *Vicia sativa*. Diese Pflänzchen wurden nicht im Trockenschrank getrocknet, sondern in absoluten Alkohol geworfen, nachdem sie zuvor durch 24stündiges Liegen an der Luft einen Teil ihres Vegetationswassers verloren hatten; nach mehrtägigem Verweilen unter dem Alkohol wurden sie herausgenommen und nun zuerst über Schwefelsäure, dann bei einer Temperatur von 25—30° getrocknet.¹⁾ Die bei Untersuchung dieser Keimpflanzen nach den von uns

¹⁾ Das Trocknen bei erhöhter Temperatur geschah nur, um die Pflänzchen leichter zerreiben zu können. Der alkoholische Extrakt, der sich beim Übergießen der Pflänzchen mit absolutem Alkohol bildete, wurde nicht auf Phosphate untersucht; wir bestimmten aber seinen Gehalt an Trockensubstanz und berücksichtigten letztere bei Berechnung des für die Bestimmungen verwendeten Quantum von Keimpflanzentrockensubstanz.

beschriebenen Verfahren erhaltenen Resultate teilen wir im folgenden mit, erwähnen aber zuvor noch, daß die durch Magnesiummischung hervorgebrachten Fällungen im Aussehen mit Ammoniummagnesiumphosphat übereinstimmten und Phosphorsäure enthielten, wie mit Hilfe von Molybdänsäurelösung nachgewiesen wurde:¹⁾

Zwölftägige Keimpflanzen von *Zea Mais*:

9,360 g Trockensubstanz gaben 0,0115 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,077\%$ P_2O_5 ;

Zwölftägige Keimpflanzen von *Vicia Faba*:

9,447 g Trockensubstanz gaben 0,0340 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,23\%$ P_2O_5 ;

Zwölftägige Keimpflanzen von *Lens esculenta*:

9,300 g Trockensubstanz gaben 0,0480 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,32\%$ P_2O_5 ;

Dreiwöchentliche Keimpflanzen von *Lupinus albus*:

7,430 g Trockensubstanz²⁾ gaben 0,050 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,42\%$ P_2O_5 ;

Vierwöchentliche Keimpflanzen von *Vicia sativa*:

8,540 g Trockensubstanz gaben 0,0670 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,49\%$ P_2O_5 .

Die aus dem Gewicht der Niederschläge berechneten Phosphorsäurequantitäten sind nicht unbedeutend, wie sich aus einem Vergleich dieser Quantitäten mit dem durchschnittlichen Gehalt der betreffenden Samen an Phosphorsäure ergibt. Der letztere beträgt z. B. für die Samen der Wicke 1,17%, für die Lupinensamen 1,64%, für die Samen der Ackerbohne 1,39%, für die Maiskörner 0,69%.³⁾

Entstammt aber die im Magnesianiederschlag zur Ausscheidung gebrachte Phosphorsäure wirklich anorganischen Phosphaten? Diese Frage muß doch wohl bejaht werden. Wollte man annehmen, daß jene Phosphorsäure durch die 1%ige Salzsäure aus organischen Verbindungen abgespalten worden sei, so wäre es auffallend, daß bei den ungekeimten Samen nicht das Gleiche eingetreten ist. Um jedoch noch eine weitere Stütze für unsere Ansicht zu erhalten, haben wir noch einige Versuche in folgender Weise angestellt: Ein abgewogenes

¹⁾ Es liegt im Bereich der Möglichkeit, daß diese Niederschläge Beimengungen in kleiner Quantität eingeschlossen haben. Auch wenn dies der Fall gewesen sein sollte, würden die aus unseren Versuchen abgeleiteten Schlußfolgerungen nicht zu modifizieren sein.

²⁾ Man vgl. die Anmerkung auf der vorigen Seite.

³⁾ Wir entnehmen diese Zahlen den von E. v. Wolff herrührenden Zusammenstellungen.

Quantum der fein gepulverten Keimpflanzen wurde mit soviel verdünnter Chlorcalciumlösung übergossen, daß die Masse von der Flüssigkeit durchfeuchtet war; nach 24 Stunden setzten wir dann ca. 50 ccm Ammoncitratlösung zu, trennten nach 24stündiger Einwirkung die Flüssigkeit vom Ungelösten und versetzten sie nun mit Magnesiamixtur. Auch in diesem Falle erhielten wir Magnesiumphosphatniederschläge, deren Gewicht allerdings meistens etwas geringer war, als bei Anwendung des zuerst beschriebenen Verfahrens, wie aus folgenden Angaben zu ersehen ist:

Zwölftägige Keimpflanzen von *Zea Mais*:

9,360 g Trockensubstanz gaben 0,0110 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,074\%$ P_2O_5 ;

Zwölftägige Keimpflanzen von *Vicia Faba*:

9,4470 g Trockensubstanz gaben 0,0340 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,23\%$ P_2O_5 ;

Zwölftägige Keimpflanzen von *Lens esculenta*:

8,360 g Trockensubstanz gaben 0,0370 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,28\%$ P_2O_5 ;

Dreiwöchentliche Keimpflanzen von *Lupinus albus*:

7,430 g Trockensubstanz gaben 0,0375 g $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,32\%$ P_2O_5 .

Gegen die Annahme, daß die in diesen Versuchen in Form der Ammoniummagnesiumverbindung zur Ausscheidung gebrachte Phosphorsäure anorganischen Phosphaten entstammte, die in den Untersuchungsobjekten enthalten waren, wird wohl ein Einwurf noch weniger zu erheben sein, als gegen die aus den ersten Versuchen abgeleitete Schlußfolgerung. Selbstverständlich aber können die nach dem einen wie nach dem anderen Verfahren erhaltenen Zahlen zu niedrig sein. Wenn man die anorganischen Phosphate mit verdünnter Salzsäure in Lösung bringt und diese Lösung sodann mit Chlorcalcium und Ammoniak versetzt, so kann neben Calciumphosphat auch Magnesiumphosphat sich ausscheiden; letzteres aber löst sich bekanntlich nicht in Ammoncitrat auf. Auch wenn man die zerriebenen Keimpflanzen mit Chlorcalciumlösung anfeuchtet und dann Ammoncitratlösung zufügt, kann das Vorhandensein einer Magnesiumverbindung bewirken, daß die Phosphorsäure der anorganischen Phosphate nicht vollständig in die Citratlösung eingeht.¹⁾

¹⁾ Bekanntlich ist die Asche der Pflanzensamen relativ reich an Magnesia. Der Gehalt daran ist fast immer viel größer als der Kalkgehalt.

Unsere Versuche führen zu der Schlußfolgerung, daß etiolierte Keimpflanzen im Gegensatz zu den ungekeimten Samen anorganische Phosphate in beträchtlicher Menge enthalten und daß also in den bei Lichtabschluß sich entwickelnden Keimpflanzen Phosphorsäure aus organischen in anorganische Verbindungen übergeht. Daß die diesem Schicksal verfallende Phosphorsäuremenge eine beträchtliche ist, läßt sich aus den Ergebnissen unserer Versuche schließen, wenn letztere auch nicht als eine Grundlage für genaue Berechnungen angesehen werden können.

Bekanntlich gehören die Samen zu den an Proteinstoffen und an Phosphorsäureverbindungen reichsten Pflanzenteilen. Man darf behaupten, daß im allgemeinen der Phosphorsäuregehalt der Samen mit ihrem Proteingehalt steigt und fällt, wenn freilich auch ein bestimmtes Mengenverhältnis der Phosphorsäure zum Stickstoff nicht besteht.

Man wollte der Phosphorsäure eine Rolle bei der Bildung der Proteinstoffe zuschreiben; doch kann dies nur insoweit, als es sich um die Bildung phosphorhaltiger Proteinstoffe handelt, für zutreffend gelten.¹⁾ Neben solchen Stoffen finden sich in den Samen noch manche andere organische Phosphorsäureverbindungen vor, unter denen die bei der Spaltung Inosit liefernde gepaarte Phosphorsäure der Quantität nach oft zu prävalieren scheint. Diese Stoffe dienen, wie man annehmen darf, als Reservematerial; sie liefern dem in der Entwicklung begriffenen Embryo die zur Bildung von Nuclein, Lecithin usw. erforderliche Phosphorsäure. Im Einklang mit dieser Anschauung steht auch die Tatsache, daß die Samenschalen sehr arm an Phosphorsäure sind, während in den nach Entfernung der Schalen übrig bleibenden Teilen der Samen viel Phosphorsäure sich findet. Wir erhielten z. B. für die Samen von *Pinus Cembra* und *Pinus maritima* folgende Zahlen:

<i>Pinus Cembra</i>	{	entschälte Samen	1,60 % P_2O_5
		Schalen	0,066 % »
<i>Pinus maritima</i>	{	Samen mit Schalen	1,26 % »
		Schalen	0,083 % »

¹⁾ Man vergleiche in bezug auf diese Fragen auch die oben zitierte Abhandlung O. Loews.

Die Phosphorsäure findet sich also vorzugsweise in denjenigen Samentteilen vor, in welchen auch die als Reservematerial dienenden Proteinstoffe, Fette und Kohlenhydrate enthalten sind. Daß mit der Quantität der Reserveproteinstoffe auch die Phosphorsäuremenge steigt und fällt, ist ohne Zweifel vorteilhaft für den sich entwickelnden Embryo und kann als eine Anpassungserscheinung betrachtet werden.

Man glaubte früher, daß in den Samen anorganische Phosphate als Reservestoffe aufgespeichert seien; jetzt müssen wir aber annehmen, daß vorzugsweise oder ausschließlich organische Phosphorsäureverbindungen als Reservematerial fungieren.¹⁾ Läßt man die Keimpflanzen sich unter Lichtabschluß längere Zeit entwickeln, so geht, wie aus den von uns mitgeteilten Versuchsergebnissen zu schließen ist, ein Teil der Phosphorsäure aus organischen in anorganische Verbindungen über. Diese Umwandlung wird vermutlich nur in sehr geringem Maße eintreten, falls die Keimpflanzen unter normalen Verhältnissen sich entwickeln. Zu den Verbindungen, die im letzteren Falle auf Kosten des phosphorsäurehaltigen Reservematerials sich bilden, sind auch die Lecithine zu rechnen; denn nach den Versuchen W. Maxwells²⁾ und J. Stoklasas³⁾ tritt in den am Licht sich entwickelnden Keimpflanzen eine starke Zunahme des Lecithingehalts ein.

¹⁾ Man vgl. auch die Arbeit von Lilienfeld und Monti über die mikrochemische Lokalisation des Phosphors in den Geweben, Referat im Chem. Zentralblatt, 1893, S. 50—51.

²⁾ American Chem. Journal, 1891, Bd. 13, S. 16.

³⁾ Bull. de la Soc. Chim., Paris (3), Bd. 17, S. 520.
