

Zeitschrift: Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse
Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft
Band: 58 (1948)

Artikel: Über die Nikotinbildung in der Tabakpflanze
Autor: Schmid, Helmut
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-41302>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 02.02.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Über die Nikotinbildung in der Tabakpflanze

Von *Helmut Schmid*

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Eidg. Techn. Hochschule in Zürich)

Eingegangen am 2. Oktober 1947

	Seite
A. Einleitung	5
B. Die Bildungsstätte des Nikotins	8
1. Fütterungsversuche	8
a) Ergebnisse früherer Versuche	8
b) Vakuuminfiltration von Blättern	10
2. Chemische Untersuchung der Blutungssäfte	14
a) Allgemeines	14
b) Die Stickstofffraktionen im Blutungssaft	16
c) Die zeitliche Veränderung der Stickstofffraktionen	22
d) Die Stickstoffbilanz	27
e) Stickstoffernährung und Nikotinbildung	28
C. Der Wanderweg des Nikotins	30
D. Die Nikotinbildung bei der Keimung	32
1. Chemische Untersuchung von Samen	32
2. Nikotinbestimmungen in Keimlingen	33
3. Fluoreszenzoptischer Nikotinnachweis	36
E. Schlußbetrachtungen	39
F. Zusammenfassung	42
Literaturverzeichnis	43

A. Einleitung

In der Literatur finden sich zahlreiche Hypothesen über Entstehung und physiologische Funktion der Alkaloide. Die meisten Autoren nehmen an, daß die Alkaloidbildung mit dem Eiweißstoffwechsel eng verknüpft sei. Die chemische Verwandtschaft gewisser Aminosäuren und biogener Amine mit den Alkaloiden legt einen solchen Schluß nahe. Theorien dieser Art, denen hauptsächlich chemische Betrachtungen zugrunde liegen, wurden besonders von Pictet (1906), Trier (1912), Robinson (1917) sowie Frey-Wyßling (1938) entwickelt. Letzterer zeigte, daß durch gleichzeitige Dekarboxylierung und partielle Desaminierung basischer Aminosäuren Alkaloide entstehen können. Von Dunstan (1887) wurden auch Zusammenhänge mit dem Kohlehydratstoffwechsel in Betracht gezogen.

Über die physiologische Funktion der Alkaloide wurden ebenfalls verschiedene Ansichten geäußert. Die Annahme von Errera und Clautriau (1906), daß es sich um Schutzstoffe gegen Tierfraß handle, wird durch die Erfahrung widerlegt. Auf Grund des Verhaltens

einiger Alkaloide (Koffein, Strychnin, Nikotin, Theobromin u. a.) bei der Keimung kommen einige Autoren wie H e c k e l (1890), um den ältesten zu nennen, zum Schluß, es handle sich um Reservestoffe, ähnlich dem Reserveeiweiß. Nach neueren Untersuchungen kommt dem Hordenin eine ähnliche Funktion zu (R a o u l, 1937). Zahlreiche Autoren sehen in den Alkaloiden Neben- oder Abfallprodukte des Eiweißstoffwechsels, die einen des Eiweißaufbaues (T s c h i r c h, 1923, G a d a m e r, 1926), andere des Abbaues (C l a u t r i a u, 1902, P i c t e t, 1906). Nach ihnen wären die Alkaloide somit bei den Exkreten einzureihen. Endlich werden gewissen Alkaloiden auch Hormonfunktionen zugeschrieben (C i a m i c i a n und R a v e n n a, 1920). Neuerdings wird diese Möglichkeit von D a w s o n (1946) für das Nikotin in Betracht gezogen.

Trotz der großen Zahl von Arbeiten, die sich mit diesen Fragen beschäftigen, ist man auch heute noch von deren endgültiger Lösung weit entfernt. Die angeführten Theorien wurden meist auf Grund des Verhaltens einzelner Alkaloide aufgestellt. Da die physiologische Einheitlichkeit der Alkaloide fragwürdig ist, muß man sich vor allzu weitgehenden Verallgemeinerungen hüten.

Die älteren physiologischen Arbeiten über den Nikotinstoffwechsel gingen von der Annahme aus, das Alkaloid werde in den oberirdischen Teilen gebildet, vorwiegend an Orten gesteigerter Lebenstätigkeit, also in peripheren Organen und im Mesophyll der Blätter; ebenso glaubte man, daß Bildungs- und Ablagerungsstätte identisch seien. Es ergab sich (M o t h e s, 1928), daß der Nikotinstoffwechsel sehr träge und durch äußere Faktoren nur schwer beeinflussbar ist. Direkte Zusammenhänge zwischen dem Eiweißstoffwechsel und der Nikotinbildung waren keine ersichtlich. Ebenso übten verschiedene Belichtung, Narkose, Variation in der Zusammensetzung der Nährlösung u. a. keinen nennenswerten Einfluß aus. Da das Nikotin auch bei extremem Hungerstoffwechsel nicht abgebaut wird, so kann man nach M o t h e s mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß es kein Reservestoff ist. Allerdings zeigen ältere Blätter eine geringe Nikotinabnahme; ob diese auf Auswanderung oder Abbau zurückzuführen ist, bleibt ungeklärt. Ebenso stellte C h a z e (1932) fest, daß das Nikotin in Keimlingen, die auf feuchtem Filterpapier gezogen wurden, nach Aufhören des Wachstums allmählich wieder verschwindet.

J l j i n (1929, 1930, 1933) hingegen fand, daß sich in reifenden und keimenden Samen Nikotin und Reserveeiweiß reziprok verhalten, d. h. das Auftreten des einen ist mit dem Verschwinden des andern verbunden und umgekehrt. Auf Grund dieser Ergebnisse und des Verhaltens von Blättern in Narkose betrachtet er das Nikotin als eine Form der Stickstoffreserve, ähnlich wie das Asparagin.

K l e i n und L i n s e r (1933), D a w s o n (1939) und G o r t e r (1936) prüften T r i e r s Hypothese (1912) über den Bildungsmecha-

nismus des Nikotins, indem sie abgeschnittene Tabakpflanzen mit Prolin fütterten. Während erstere eine beträchtliche Nikotinzunahme feststellten und folgerten, daß die Sprosse aus der genannten Aminosäure Nikotin zu synthetisieren vermöchten, konnte G o r t e r diesen Befund nicht bestätigen.

Ein völlig neues Licht auf das Problem der Alkaloidbildung warfen die während des letzten Jahrzehntes bekanntgewordenen Pfropfversuche. Mit ihrer Hilfe ließ sich zeigen, daß die Wurzel einen maßgebenden Einfluß ausübt. H a s e g a w a (1937) pfropfte einerseits Tabakreis auf Tomatenunterlagen und stellte fest, daß das Propfreis nach kurzer Zeit nikotinfrei war. Andererseits führte ein auf Tabakunterlage gepfropftes Tomatenreis nach sechs Monaten 2 % Nikotin. Entsprechende Ergebnisse erhielten S c h m u c k, S m i r n o w, J l j i n (1941). Sie pfropften *Solanum nigrum*, *Solanum lycopersicum* und *Datura stramonium* auf Tabakunterlage und konnten in den Pfropfreisern bis 2,2 % Nikotin feststellen. Wurde hingegen umgekehrt Tabakreis auf die erwähnten Pflanzen als Unterlage gepfropft, so verschwand das Nikotin, und die der Unterlage eigenen Alkaloide traten an seine Stelle. Das Pfropfreis führt immer dasjenige Alkaloid, das der Unterlage eigen ist. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch M o s h k o v und S m i r n o v a (1939), H i e k e (1942), D a w s o n (1942) und C r o m w e l l (1943).

Pfropfversuche zur Aufklärung des Alkaloidstoffwechsels waren schon vor den erwähnten Autoren von mehreren Forschern ausgeführt worden. Die Ergebnisse waren jedoch zum Teil widersprechend oder wurden nicht ihrer Bedeutung entsprechend beachtet.

Es erhebt sich nun die Frage, welche Rolle das Wurzelsystem bei der Alkaloidbildung spielt. Folgende drei Möglichkeiten sind denkbar:

1. das Alkaloid wird in der Wurzel gebildet und wandert mit dem Saftstrom in die oberirdischen Teile;
2. die Wurzel bildet Vorstufen des Alkaloides, welche in den Sproß gelangen und dort in das fertige Alkaloid umgewandelt werden;
3. die Wurzel steuert den Alkaloidstoffwechsel des Sprosses, z. B. hormonal.

Unter Umständen könnten diese Möglichkeiten auch kombiniert sein, indem beispielsweise die Wurzel gleichzeitig Alkaloid und Vorstufen produziert.

Zur Abklärung dieser Fragen liegen bereits einige experimentelle Arbeiten vor. S c h m u c k, K o s t o f f und B o r o z d i n a (1939) verwendeten *N. tabacum* und *N. glauca* als Pfropfpartner. *N. glauca* ist nikotinfrei und enthält als Hauptalkaloid das dem Nikotin nahe verwandte Anabasin (Methylpyrrolidinring des Nikotins durch Piperidinring ersetzt), während dieses bei *N. tabacum* nur in minimalen Mengen vorkommt. *N. tabacum*-Reis, auf *N. glauca*-Unterlage gepfropft, enthielt

nur Anabasin, während umgekehrt *N.-glauca*-Reis auf *N.-tabacum*-Unterlage sowohl Anabasin wie Nikotin enthielt. Aus dieser gegenseitigen Beeinflussung schlossen sie, die Verdrängung des Nikotins beruhe nicht auf Wanderung des Anabasins, sondern auf der völligen Änderung des Alkaloidstoffwechsels des Pfropfreises unter dem Einfluß der Unterlage. Kerkis und Pigulevskaya (1941), welche mit *Solanum lycopersicum* und *Atropa belladonna* arbeiteten, gelangten zur gleichen Auffassung.

Zu gegensätzlichen Anschauungen kamen Cromwell (1943), der im Blutungssaft von *Atropa belladonna* Hyoscyamin nachwies, und Mothes und Hieke (1943), die im Blutungssaft von *N. tabacum* Nikotin fanden, ohne allerdings quantitative Angaben darüber zu machen. Diese Autoren vertreten die Ansicht, daß das Alkaloid in der Wurzel gebildet werde.

Das Ziel eigener Untersuchungen war nun, nähern Einblick in die durch die verschiedenen widersprechenden Ergebnisse unübersichtlichen Bildungsverhältnisse des Nikotins zu erhalten. Vorerst war zu prüfen, ob die Wurzel die alleinige Bildungsstätte sei oder ob auch die oberirdischen Teile imstande seien, Nikotin zu erzeugen, eventuell mit Hilfe von Vorstufen, die von der Wurzel geliefert würden. Dann war der Wanderweg des Alkaloides oder seiner Vorstufen festzustellen. Ebenso mußte versucht werden, Einblick in den Bildungsmechanismus oder die Funktion des Nikotins zu erhalten.

B. Die Bildungsstätte des Nikotins

1. Fütterungsversuche

a) Ergebnisse früherer Versuche

In der Tierphysiologie werden Fütterungsversuche zur Aufklärung des Stoffwechsels seit langem mit großem Erfolg angewendet. In der pflanzenphysiologischen Literatur begegnen wir ihnen nur vereinzelt, und ihre Anwendung ist meist auf niedrige Organismen beschränkt. Den Grund dazu bilden die unvergleichlich größeren Schwierigkeiten, die sich dabei bieten. Während beim Tier die einzelnen Funktionen auf bestimmte Organe lokalisiert sind, spielen sich in der Pflanze überall gleichzeitig die verschiedenartigsten Vorgänge ab. Beim Tierversuch lassen sich die Stoffe leicht durch den Verdauungstrakt oder das Gefäßsystem applizieren, bei der Pflanze hingegen stößt man auf Schwierigkeiten. Größere organische Moleküle werden im allgemeinen von der Wurzel entweder abgebaut oder gar nicht aufgenommen. So werden beispielsweise Aminosäuren in der Wurzel desaminiert. Deshalb lassen sich Fütterungsversuche meist nicht an unverletzten Pflanzen durch-

führen. Man ist gezwungen, die Nährlösung durch den Transpirationsstrom abgeschnittener Sprosse oder überlebender Blätter zuzuführen. Bei der durch die Trägheit des Nikotinstoffwechsels bedingten längeren Versuchsdauer befinden sich die Pflanzen in einem mehr oder weniger subletalen Zustand, was die Auswertung der Ergebnisse erschwert. So ergaben die bis jetzt bekannt gewordenen Fütterungsversuche bei *Nicotiana* widersprechende Resultate.

Die drei Aminosäuren Prolin, Glutaminsäure und Ornithin sind einander nahe verwandt und können leicht ineinander übergehen. Nach Trier (1912) kann man das Nikotin aus einer einzigen dieser Aminosäuren ableiten, indem beispielsweise das Prolin über α -oxy- δ -amino-valeriansäure durch Kondensation mit Ameisensäure und nachfolgendem Ringschluß in Pyridin-, bzw. Nikotinsäurederivate übergehen könnte; gleichzeitig könnte das Prolin auch den Pyrrolring des Nikotins liefern. Durch oxydativen Zusammenschluß dieser beiden Kerne würde das Alkaloid gebildet.

Die Autoren Klein und Linser (1933) fütterten abgeschnittene Tabakpflanzen durch Einstellen in 1-%-Lösungen der genannten drei Aminosäuren. Als Bezugsgröße wählten sie ein « ideales Individuum von 100 g Trockengewicht ». Die Veränderung des Nikotingehaltes bezogen sie auf eine in Wasser eingestellte Kontrollpflanze. Bei den mit Prolin gefütterten Pflanzen fanden sie nach acht- bis vierzehntägiger Versuchsdauer eine Nikotinzunahme von 18 bis 190 %. Geringere Zunahmen wiesen die mit Ornithin und Glutaminsäure behandelten Pflanzen auf.

Gorter (1936) kritisierte diese Versuche. Sie benützte als Bezugsgröße den Nikotingehalt pro dm² Blattfläche und bezog die Veränderung auf den Nikotingehalt einer zu Versuchsbeginn direkt verarbeiteten Pflanze. Sie stellte fest, daß eine im Versuch mitgeführte, in Nährlösung ohne Aminosäurezusatz eingestellte Pflanze (also entsprechend der Bezugspflanze von Klein und Linser) bei Versuchsende einen um fast 50 % geringeren Nikotingehalt besaß. Die mit Prolin gefütterten Pflanzen zeigten eine geringere Abnahme. Sie folgerte, daß Prolinfütterung keine Zunahme, sondern eine geringere Abnahme des Nikotingehaltes bewirke.

Dawson (1939) endlich benützte als Bezugsgröße ein Individuum. Er verglich die Veränderung des Nikotingehaltes mit einer Pflanze bei Versuchsbeginn, einer im Versuch mitgeführten Wasserkontrollpflanze und einer normalen, bewurzelten Pflanze bei Versuchsende. Starke Nikotinzunahmen, bezogen auf die Wasserkontrollen, zeigten die mit Prolin und Nikotinsäure gefütterten Pflanzen. Letztere bewirkte außerdem eine starke Vermehrung des Trockengewichtes, so daß der Autor schloß, die Nikotinsäure sei nicht als Nikotinvorstufe zu betrachten, sondern sie könne bei der Nikotinsynthese als Katalysator

wirken, bzw. sie sei ein allgemeines Wachstumsstimulans. Bezogen auf die Kontrollpflanzen bei Versuchsbeginn, sind die von Dawson beobachteten Zunahmen jedoch so gering, daß sie innerhalb der von Gorter festgestellten individuellen Streuung des Nikotingehaltes von äußerlich gleichen Pflanzen liegen.

Aus dem Gesagten ist ersichtlich, daß eine Entscheidung über die Frage, ob die genannten Stoffe wirklich eine Neubildung von Nikotin bewirken, weitgehend von der Wahl der Bezugsgröße abhängig ist. Ebenso gestaltet die während der relativ langen Versuchsdauer eintretende Nikotinabnahme der Wasserkontrollpflanzen die Verhältnisse unübersichtlich.

Wir wiederholten deshalb die Fütterungsversuche mit einer Methode, die eine einwandfreie Vergleichsgröße liefert und bei der der Einfluß der dissimilatorischen Vorgänge durch die kurze Versuchsdauer zurückgedrängt wird.

b) Vakuuminfiltration von Blättern

Eine zweckmäßige Fütterungsmethode muß in der Hauptsache folgende zwei Voraussetzungen erfüllen: Alle Zellen müssen möglichst rasch und gleichmäßig vom gefütterten Stoff erreicht werden. Dadurch erreicht man eine kurze Versuchsdauer und vermindert die Gefahr der bakteriellen Zersetzung von empfindlichen Stoffen, bevor sie ihren Bestimmungsort erreicht haben. Die Methode, der Pflanze gelöste Stoffe mit dem Transpirationsstrom zuzuführen, weist in dieser Hinsicht große Mängel auf. Außerdem ist die sterile Kultur von größeren Pflanzen ziemlich schwierig und gestattet meist nur ein Arbeiten mit einer kleinen Zahl von Versuchspflanzen.

Die Methode der Vakuuminfiltration von Blatthälften ist nicht mit diesen Mängeln behaftet. Mit ihrer Hilfe gelingt es, dem Blattgewebe innert zwei bis drei Stunden beträchtliche, genau meßbare Stoffmengen in sehr gleichmäßiger Verteilung zuzuführen. Nach Mothes (1933) ist diese Methode für Ernährungsversuche an Blättern sehr geeignet, sofern man bei ihrer Anwendung gewisse Vorsichtsmaßnahmen beachtet. Es gelang ihm, innert kurzer Zeit im Blatt Synthesen von einem solchen Ausmaß zu erzwingen, daß die neugebildeten Stoffe die ursprünglich vorhandenen in der Menge um ein Vielfaches übertrafen. Die Blatthälftenmethode liefert außerdem eine einwandfreie Bezugsgröße und gestattet, die individuellen Fehler weitgehend auszuschalten. Bei ihrer Anwendung wurde folgendermaßen verfahren:

Es wurden je 0,03molare Lösungen folgender Stoffe imbibiert: l-Prolin, Ornithindihydrochlorid, Asparaginsäure und Nikotinsäure, teilweise mit Zusatz von Urotropin als methylierendes Agens und Glukose.

Alle Lösungen wurden auf pH 5,7, die Azidität des Blattpreßsaftes, gebracht.

Frische Tabakblätter wurden längs der Mittelrippe halbiert und kurz belichtet, damit die Spaltöffnungen geöffnet waren. Die eine Hälfte der Blätter wurde in die zu imbibierende Flüssigkeit, die andere zur Kontrolle in Wasser getaucht, und zwar so, daß die Blätter vollständig mit Flüssigkeit bedeckt waren. Dann wurde unter einem Rezipienten innert 15 Minuten bis auf einen Druck von 50 bis 60 mm Hg evakuiert und anschließend innerhalb einer halben Stunde auf Normaldruck entspannt. Während dieser Zeit imbibierten sich die Blätter vollständig, was an der dunkelgrünen, transparenten Farbe der Blätter leicht festgestellt werden konnte. Dann wurden die Blätter mit Filterpapier abgetrocknet und die Gewichtszunahme festgestellt. Diese gab ein Maß für die aufgenommene Stoffmenge. Anschließend wurden die Blätter 2 bis 3 Stunden mit der Unterseite nach oben an diffuses Tageslicht gelegt. Nach dieser Zeit zeigten sie wieder normales Aussehen und Gewicht. Geschädigte Blätter blieben imbibiert und erschienen trotz hohem Wassergehalt welk. Nun wurden sie während 14 bis 44 Stunden in den mit nassem Filterpapier ausgelegten Thermostaten gebracht; nachher wurde der Nikotingehalt bestimmt. Während dieser kurzen Versuchszeit trat in den mit Wasser imbibierten Kontrollblatthälften keine Nikotinabnahme ein.

Für die Nikotinbestimmungen wurde die *Kieselwolfram-Methode* nach der Vorschrift des schweizerischen Lebensmittelbuches benutzt. Als Alkalisierungsmittel wurde jedoch an Stelle der Natronlauge das mildere Kaliumkarbonat verwendet. Wo es auf genaue Identifizierung des Nikotins ankam, wurde auch die Pikratmethode von P f y l und S c h m i d t (1927) angewandt und hierauf das Pikrat durch Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt mit reinem Nikotinpikrat verifiziert. Die Tabellen 1 bis 3 zeigen die Ergebnisse.

Für jeden Versuch wurden je 20 Hälften von jungen Paesana-
blättern verwendet. Der Nikotingehalt wurde auf das Frischgewicht bei Versuchsbeginn bezogen. Beim ersten Versuch wurde er vergleichsweise auch auf die Blattfläche berechnet. Beide Bezugsgrößen ergaben praktisch übereinstimmende Resultate.

Bei keinem der obigen Versuche zeigte sich also eine wesentliche Veränderung des Nikotingehaltes der Blätter. Wir müssen also schließen, daß isolierte Blätter die genannten Stoffe nicht in Nikotin umwandeln können. Daß sie bei längerer Versuchsdauer den Abbau des Nikotins verhindern, bzw. verlangsamen, wie dies aus den Versuchen der drei vorgenannten Autoren hervorgeht, bleibt unbestritten. Auf irgendeine Weise scheinen sie den (wahrscheinlich auf dissimilatorische Prozesse beschränkten) Nikotinstoffwechsel der Blätter beeinflussen zu

können. Keinesfalls dürfen wir jedoch in den genannten Verbindungen auf Grund der Fütterungsversuche Zwischenstufen der Nikotinsynthese erblicken.

Tabelle 1

	Prolin	H ₂ O	Prolin + Urotropin	H ₂ O
g Frischgewicht vor Versuch	7,2	6,7	6,5	6,5
g Gewicht imbibierte	9,5	9,1	8,9	9,6
mg Nikotin . . .	10,4	11,2	9,8	10,4
mg Nikotin/ g Frischgewicht .	1,43	1,67	1,50	1,60
Veränderung . . .	— 14,4 %		— 6,2 %	
Versuchsdauer . .	40 Std. unbelichtet		44 Std. belichtet	

Tabelle 2.

	Ornithin + Urotropin	H ₂ O	Ornithin + Urotropin	H ₂ O	Asparagin- säure	H ₂ O
g Frischgewicht vor Versuch	20,59	20,31	19,33	18,89	17,30	17,25
g Gewicht imbibierte	29,00	29,00	26,00	27,20	24,10	25,10
mg Nikotin . . .	30,3	30,5	26,6	26,0	24,7	24,4
mg Nikotin/ g Frischgewicht .	1,47	1,50	1,37	1,37	1,43	1,42
Veränderung . . .	— 2 %		0 %		+ 0,7 %	
Versuchsdauer . .	18 Std. unbelichtet		36 Std. belichtet		20 Std. belichtet	

Tabelle 3

	Nikotin- säure	H ₂ O	Nikotin- säure + Urotropin	H ₂ O	Nikotin- säure + Glukose	H ₂ O
g Frischgewicht vor Versuch	14,90	14,20	24,80	24,20	20,22	20,42
g Gewicht imbibierte	18,10	16,80	31,50	30,50	27,50	29,00
mg Nikotin . . .	16,00	14,5	23,1	25,6	36,9	37,9
mg Nikotin/ g Frischgewicht .	1,07	1,02	0,93	1,05	1,83	1,85
Veränderung . . .	+ 4,9 %		— 11,4 %		— 1,1 %	
Versuchsdauer . .	44 Std. unbelichtet		44 Std. unbelichtet		18 Std. belichtet	

Gegen die Fütterungsversuche kann man einen prinzipiellen Einwand erheben. Beim natürlichen Stoffwechsel in der Pflanze werden die Synthesen durch enzymatische Aktionsfelder geleitet, wobei jedes Enzym eine Teilreaktion bewirkt. Der Aufbau einer Substanz vollzieht sich über verschiedene Zwischenstufen, wobei diese sofort nach ihrem Entstehen, also in *statu nascendi*, mit Hilfe der nächsten Enzyme über weitere Zwischenstufen bis zum Endprodukt umgewandelt werden. Die Zwischenprodukte einer Biosynthese treten also normalerweise im Stoffwechsel gar nicht auf. Von diesem Gesichtspunkt aus scheint es nicht unbedenklich, der Pflanze große Mengen von physiologisch aktiven Substanzen, wie Aminosäuren oder Nikotinsäure, zuzuführen, selbst wenn diese im natürlichen Stoffwechsel intermediär auftreten. Wenn der Organismus diese Stoffe nicht innert nützlicher Frist verarbeiten kann, könnten leicht Störungen im natürlichen Reaktionsablauf und Schädigungen auftreten. Folgendes Beispiel mag dies illustrieren: Die imbierten Blätter zeigten bis Versuchsende ein natürliches Aussehen, mit Ausnahme derjenigen, die mit Nikotinsäure gefüttert wurden; diese waren oft mehr oder weniger stark gewelkt.

Um diese Erscheinung näher zu überprüfen, wurden abgeschnittene, etwa vier Monate alte Pflanzen in Nikotinsäurelösung eingestellt. Hierbei zeigte es sich, daß die Nikotinsäure in relativ kleinen Konzentrationen Welken der Versuchspflanzen bewirkte. Deutlich konnte man feststellen, wie zuerst die untersten Blätter welk wurden und wie der Vorgang nach oben fortschritt. Tabelle 4 gibt eine Übersicht.

Tabelle 4
Tabakpflanzen in Nikotinsäurelösungen

Verdünnung	Nach 2 Tagen	Nach 5 Tagen
0,03molar	welk, Stengel welk	welk
0,02molar	angewelkt	welk
0,01molar	normal	untere Blätter welk
0,005molar	normal	untere Blätter welk

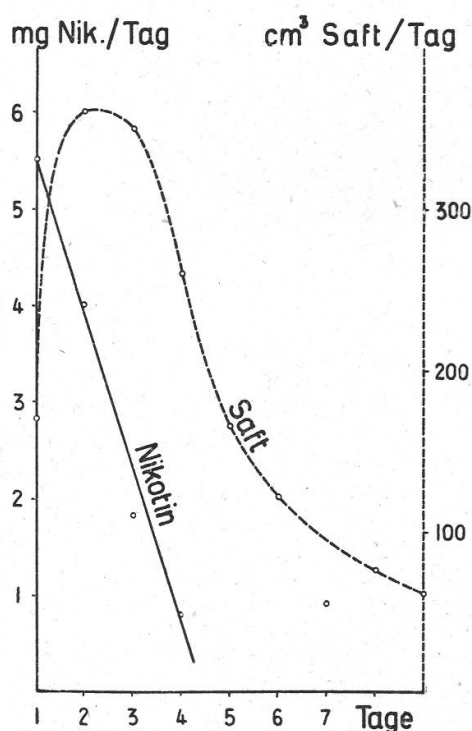
Eine Lösung von 0,6 g/Liter Nikotinsäure (0,005 mol) erzeugt also nach fünf Tagen bereits eine sichtbare Schädigung der Pflanzen.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß auch Pflanzen, die in Wurzelpreßsaft (pH 6,4) eingestellt wurden, bereits nach einer halben Stunde sehr starke Welkerscheinungen zeigten, bei einer Verdünnung 1 : 10 hingegen erst nach vier Tagen.

2. Chemische Untersuchung der Blutungssäfte

a) Allgemeines

Nachdem die Fütterungsversuche ergeben hatten, daß isolierte Blätter nicht imstande sind, ihren Nikotingehalt zu erhöhen, selbst wenn sie mit Stoffen gefüttert werden, die als Nikotinvorstufen betrachtet werden können, so wurde nun versucht, nähern Einblick in die Funktion der Wurzel bei der Alkaloidbildung zu erhalten. Als erstes mußte die Frage abgeklärt werden, ob das gesamte Nikotin in der Wur-



Figur 1
Zeitlicher Verlauf der Saft- und
Nikotinproduktion

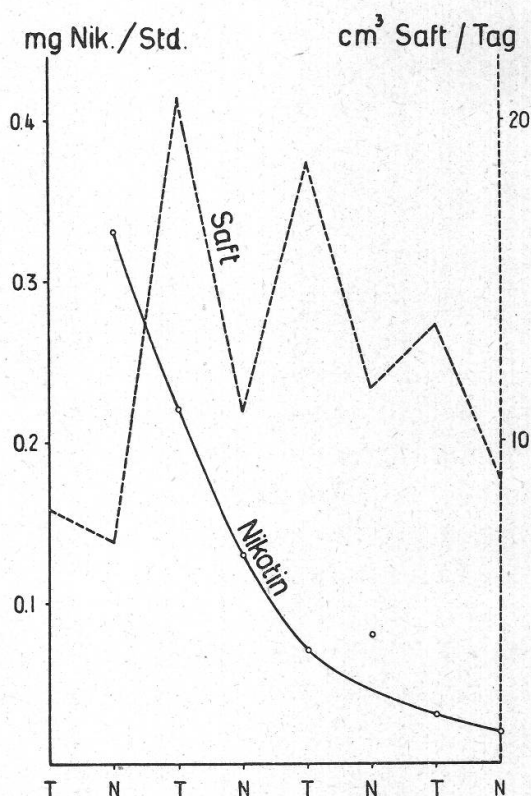
zel gebildet werde oder ob vielleicht auch Nikotinvorstufen von der Wurzel in die oberirdischen Teile gelangen, wo sie dann von den Blättern in Nikotin umgewandelt würden.

Ein geeignetes Mittel dazu schien die nähere Untersuchung der Blutungssäfte. Junge Tabakpflanzen, die sich in vollem Triebe befinden, liefern bis 20 cm³ Blutungssaft pro Tag, wenn der Boden kräftig feucht gehalten wird. Nach 2 bis 3 Tagen nimmt die Saftmenge merklich ab. Einzelne Pflanzen, die scheinbar gleichartig sind, zeigen sehr unterschiedliche Ergiebigkeit: die einen bluten länger als 14 Tage, die andern nur 2 bis 3 Tage.

Zur Entnahme des Blutungssaftes wurden die Pflanzen ungefähr 5 cm über dem Boden abgeschnitten und über den Stumpf ein Stück Gummischlauch gestülpt, in dem sich der Saft ansammeln konnte. Oben wurde der Schlauch mit einem Korkstopfen verschlossen, um Verluste

durch Verdunsten zu verhindern. Von Zeit zu Zeit wurde der Saft abpipettiert, zwecks Konservierung mit 0,4-%-Nipagin versetzt und im Kühltank bei $+0,5^{\circ}$ aufbewahrt. Für jeden Versuch wurden ungefähr 50 Pflanzen verwendet. Figur 1 zeigt den zeitlichen Verlauf der Saftproduktion. Das Maximum wurde hier erst am zweiten Tage erreicht; dann erfolgte während 4 Tagen ein starker, gleichmäßiger Abfall; später nahm die Saftmenge nur noch schwach ab. Bei den meisten Versuchen zeigte sich ein analoger Verlauf. Es kam jedoch auch vor, daß das Maximum schon am ersten Tage auftrat.

Figur 2
Tagesperiodische Schwankungen des
Blutungssaftes
T: Saft 0800—1800
N: Saft 1800—0800



Die Saftproduktion ist einer ausgesprochenen Tagesperiodizität unterworfen. Tagsüber wird bedeutend mehr Saft produziert als nachts. Figur 2 zeigt die tagesperiodischen Schwankungen der Saftmenge der gleichen Versuchspflanzen wie in Figur 1.

Da es sich um Freilandversuche handelte, war zu überprüfen, ob die beobachtete Periodizität nicht durch die Temperaturschwankungen bedingt war. Zu diesem Zwecke wurde die Menge des Blutungssaftes von eingetopften Pflanzen bei konstanter Temperatur mittels einer automatischen Tropfenzählvorrichtung registriert. Es zeigte sich, daß die Periodizität auch bei konstanter Temperatur auftritt. Das Blutungsminimum wird um 6 Uhr erreicht, das Maximum zwischen 12 und 14 Uhr. Ähnliche tagesperiodische Schwankungen des Wurzeldruckes oder des Blutungssaftes sind in der Literatur mehrmals beschrieben

worden, zuerst von Hofmeister (1862). An neueren Arbeiten seien diejenigen von White (1938) und Went (1944) über das Bluten bei Tomaten genannt.

Sehr interessant ist die Feststellung, daß die im Blutungssaft enthaltene Nikotinmenge diese Periodizität nicht mitmacht. Diese nimmt vielmehr kontinuierlich ab. Tagsüber, wenn die Saftproduktion groß ist, bleibt der Nikotingehalt relativ klein, während der Nacht jedoch, entsprechend der geringeren Saftmenge, relativ größer (siehe Figuren 1 und 2). Daraus ist ersichtlich, daß das im Blutungssaft enthaltene Nikotin nicht etwa nur passiv aus der durch das Abschneiden des Sprosses irgendwie geschädigten Wurzel herausgeschwemmt wird, sondern daß es sich um zwei unabhängige Vorgänge handelt. Das Nikotin läßt sich übrigens auch aus toten Wurzeln nicht auswaschen, denn durch tote Wurzeln hindurch filtrierte Wasser ist völlig nikotinfrei.

b) Die Stickstofffraktionen im Blutungssaft

Um einen etwas umfassenderen Einblick zu gewinnen, wurde nicht nur das Nikotin, sondern auch die andern Stickstofffraktionen bestimmt. Der Gesamtstickstoff wird gewöhnlich in Eiweißstickstoff und löslichen Stickstoff eingeteilt. Der lösliche Stickstoff seinerseits setzt sich zusammen aus der Summe des Ammoniak-N, Nitrat-N, Aminosäure-N, Amid-N und Alkaloid-N. Die Differenz zwischen dem Gesamtstickstoff und der Summe von Eiweiß- und löslichem Stickstoff heißt Reststickstoff. Er enthält Basen, Stickstoff unbekannter Bindungsart usw.

Die Blutungssäfte enthalten keinen Eiweißstickstoff, denn die Lösungen ergaben mit Eiweißfällungsmitteln wie Essigsäure und Sulfosalizylsäure keine Trübungen oder Niederschläge. Da die Säfte nur geringe Stickstoffmengen enthalten und bloß beschränkte Mengen davon zur Verfügung standen, ergaben sich einige methodische Schwierigkeiten.

Methodisches ¹

Gesamtstickstoff. Er wurde nach Kjeldahl bestimmt. Die Erfassung des gesamten Stickstoffes bereitete infolge der Anwesenheit von Nitrat- und Nikotinstickstoff einige Schwierigkeiten. Die gebräuchlichen Methoden, die zwecks Erfassung des Nitratstickstoffes zur Schwefelsäure Phenol oder Salizylsäure zusetzen, ergaben unbrauchbare Werte. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Phenole nur in konzentrierter Schwefelsäure nitriert werden. Da der Nitrat-N nur in sehr verdünnter wäßriger Lösung vorhanden war, verflüchtigte sich beim Eindampfen im Kjeldahl-Kolben ein Teil desselben als Salpetersäure, bzw. Nitrophenol. Wurde hingegen vor dem Aufschluß mit Titantrichlorid reduziert, so ergaben sich gute Resultate.

Die vollständige Erfassung des Nikotins wird durch die Resistenz des Pyridinringes erschwert. Modellversuche an Nikotinlösungen ergaben, daß einstündiges

¹ Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse; Brückner, Die Biochemie des Tabaks; Pregl, Mikroanalyse.

Kochen bei Zusatz von folgenden Katalysatoren keine vollständige Erfassung bewirkte: Quecksilber, Kupfersulfat, Glukose, Perhydrol, Jodwasserstoffsäure + Phosphor. Die Wasserdampfdestillate zeigten starke Bromcyanreaktion. Vollständigen Abbau ergaben bei längerem Kochen Phosphorsäure und Selenkatalyt. Gute Resultate an Nitrat-Nikotin-Lösungen ergab die folgende Vorschrift:

10 cm³ Blutungssaft werden in einem Kjeldahl-Kolben mit 10 cm³ Alkohol, 2 cm³ 15-%-Titantrichloridlösung und 3 cm³ 50-%-Kalilauge versetzt (Lösung kräftig phenolphthaleinalkalisch). Der Kolben wird mit einem mit Glasrohr versehenen Gummistopfen verschlossen. Im Glasrohr befindet sich mit 0,1 n Schwefelsäure befeuchtete Glaswolle. Nach einer Stunde saugt man durch Abkühlen des Kolbens 4 cm³ 10-%-Schwefelsäure durch das Glasrohr in den Kolben. Dann gibt man 3 cm³ Phenolschwefelsäure (1000 g Schwefelsäure + 40 g Phenol), 1 cm³ konz. Schwefelsäure, 1 Tropfen Quecksilber und je eine Messerspitze Kaliumsulfat und Natriumhydrosulfit zu und schließt nach Kjeldahl auf. Als Destillationsapparat wurde die Ausführung nach Parnas und Wagner benutzt.

Die Vorlage wird mit 10 cm³ n/70-Schwefelsäure beschickt, 1 cm³ Säure entspricht 0,2 mg Stickstoff. Indikator: Methylenblau-Methylrot. Nach dieser Methode wurden alle Säfte aufgeschlossen.

Ammoniakstickstoff. Die Bestimmung erfolgte nach Schmuck oder vereinfacht, indem 10 cm³ Blutungssaft mit 3 cm³ 5-%-Soda in gesättigter Kochsalzlösung im Kjeldahl-Apparat mit Wasserdampf destilliert wurden. Die Vorlage war mit 10 cm³ n/70-Schwefelsäure beschickt. Indikator: Methylenblau-Methylrot.

Bei der Berechnung des Resultates muß berücksichtigt werden, daß bei der Titration die Hälfte des Nikotinstickstoffes ebenfalls erfaßt wird. Die beiden Methoden ergaben gut übereinstimmende Resultate.

Bei dieser Bestimmung werden außer Ammoniak auch die flüchtigen Basen (z. B. Alkylamine) erfaßt.

Amidstickstoff. 10 cm³ Saft wurden mit 2 cm³ 30-%-Schwefelsäure zwei Stunden am Rückflußkühler hydrolysiert, abgekühlt, mit Lauge neutralisiert und das gebildete Ammoniak abdestilliert. Titration wie bei Ammoniakstickstoff.

Dieser Wert ergibt die Summe von Amid- und Ammoniakstickstoff. Den Amidstickstoff erhält man durch Subtraktion des beim Ammoniak-N erhaltenen Wertes.

Durch diese Methode werden Amide, Harnstoff und Ureide erfaßt.

Nitratstickstoff. 10 cm³ Blutungssaft werden mit 2 cm³ 50-%-Kalilauge versetzt und Ammoniak und flüchtige Basen mit Wasserdampf abgetrieben. (Dazu kann Saft, der zur Bestimmung des Ammoniak-N benutzt wurde, verwendet werden, so daß man Ammoniak und Nitrat in einem Gang bestimmen kann.) Dann gibt man zur Reduktion des Nitrates zu Ammoniak 3 cm³ 15-%-Titantrichloridlösung zu und destilliert weiter, wobei das Destillat wieder in n/70-Schwefelsäure aufgefangen und titriert wird. 1 cm³ Säure entspricht 0,2 mg Nitrat-N.

Die Bestimmung des Nitrates mit Nitron nach Busch ergab wegen der Kleinheit der vorhandenen Menge und der Anwesenheit von störenden Begleitstoffen unsichere Werte.

α -Aminostickstoff. Er wurde kolorimetrisch mit Ninhydrin bestimmt. Da auch Ammoniak und andere Basen, wenn sie in größerer Menge vorhanden sind, die Ninhydrinreaktion geben, wurden die Säfte vor der Bestimmung sodaalkalisch gemacht und 2—3 Minuten ausgekocht, dann neutralisiert und mittels Pufferlösung auf pH 6,98 gebracht. Hierauf wurde mit Ninhydrin versetzt und mit einer Asparaginsäurevergleichslösung, enthaltend 10 g/cm³ α -Amino-N, ungefähr eine halbe Stunde auf dem Wasserbad gekocht, die Farbe mit Amylalkohol ausgeschüttelt, um störende Einflüsse von Aldehyden und Ketonen auszuschalten, und mit dem Pulfrich-Stufenphotometer kolorimetriert. Genaue Vorschrift siehe bei Klein.

*Nikotinstickstoff*¹. Der geringen Nikotinkonzentration wegen konnte nur die kolorimetrische Methode mit Bromcyan-Anilin angewendet werden.

1 cm³ Saft wurde mit 12 cm³ einer 5 % Soda enthaltenden gesättigten Kochsalzlösung versetzt und in einem 25-cm³-Kölbchen ohne Anwendung von Wasserdampf destilliert. Die Vorlage wurde mit 2 cm³ einer Lösung, enthaltend 1 ‰ Anilin in m/5-Phosphatpuffer, pH 6,1, nach Soerensen, beschickt. Nachdem 7 cm³ überdestilliert waren, versetzte man das Destillat mit 1 cm³ gesättigter Bromcyanlösung und kolorimetrierte nach 5—7 Minuten im Pulfrich-Photometer unter Vorschaltung des Filters S 47.

Die Destillationsapparatur muß möglichst klein gehalten werden, sonst ist das Nikotin nicht quantitativ in 7 cm³ Destillat enthalten.

Die Bromcyanmethode besitzt den Nachteil, daß die gelbe Farbe nicht beständig ist. Das Extinktionsmaximum bleibt nur 1—2 Minuten bestehen, was sich besonders bei Serienbestimmungen unangenehm bemerkbar macht. Es wurde deshalb versucht, ob sich der Farbstoff (Derivat des Glutacondialdehydes) nicht durch Zusätze oder durch Verwendung anderer aromatischer Amine als Anilin stabilisieren lasse.

Es ergab sich, daß Zusatz von Alkohol oder Kaliumbromid die Extinktion bis auf das 2,5fache steigert, ohne daß jedoch die Farbe wesentlich stabiler wird. Immerhin können damit noch Mengen von 1 γ /cm³ Nikotin quantitativ bestimmt werden. Ausschütteln des Farbstoffes mit Amylalkohol steigert die Beständigkeit nicht. Auch durch Verwendung anderer Amine wird weder die Extinktion erhöht noch die Farbe beständiger. Folgende Stoffe wurden geprüft: Methylanilin, Dimethylanilin- o-Chloranilin, m-Chloranilin, o-Nitranilin, 2,5-Dichloranilin, o- und p-Aminophenol, Metol, Sulfanilsäure, Benzidin, Benzidindisulfosäure, Diphenylamin, Dihydromethylketol, sowie verschiedene α - und β -Naphtholsulfosäuren.

Die nachfolgenden Tabellen zeigen den Stickstoffgehalt einiger Säfte von Pflanzen verschiedener Größe und Sorte. Bei Tabelle 5 wurde nur der Saft des ersten Tages verarbeitet, bei Tabellen 6 bis 8 dagegen die gesammelten Säfte bis zum Aufhören der Blutungstätigkeit (8 bis 12 Tage).

Tabelle 5
Paesana, zirka 70 cm hohe Pflanzen

	Gehalt γ /cm ³	% Gesamt-N
Gesamt-N	146,0	100,0
Ammoniak-N	2,0	1,4
Nitrat-N	64	44,0
Nikotin-N	39,7	27,2
Amid-N	16,2	11,1
Amino-N	10	6,8
Eiweiß-N	—	—
Rest-N	14,1	9,5
Anorg.-N	66,0	45,2
Organ.-N	65,9	45,1

¹ Werle und Becker, Bioch. Z. 313. 182 (1942).

Tabelle 6

Mt calme jaune. 1 m hohe Pflanzen

	Gehalt γ/cm^3	% Gesamt-N
Gesamt-N	113	100,0
Ammoniak-N . .	36,8	32,6
Nitrat-N	20,3	18,0
Nikotin-N	5,2	4,6
Amid-N	32,9	29,1
Amino-N	3,1	2,7
Eiweiß-N	—	—
Rest-N	14,7	13,0
Anorg.-N	57,1	50,6
Organ.-N	41,2	36,3

Tabelle 7

Mt calme brun, zirka 1,3 m hohe Pflanzen

	Gehalt γ/cm^3	% Gesamt-N
Gesamt-N	49	100
Ammoniak-N . .	19	38,8
Nitrat-N	12,5	25,5
Nikotin-N	2,6	5,3
Amid-N	8,4	17,2
Amino-N	3,0	6,0
Eiweiß-N	—	—
Rest-N	3,5	7,2
Anorg.-N	31,5	64,4
Organ.-N	14,0	28,5

Tabelle 8

Mt calme jaune, blühende Pflanzen

	Gehalt γ/cm^3	% Gesamt-N
Gesamt-N	12,4	100
Ammoniak-N . .	2,6	21
Nitrat-N	3,0	24,2
Nikotin-N	2,5	20,2
Amid-N	3,8	30,6
Amino-N	1,6	12,6
Eiweiß-N	—	—
Rest-N	—	—
Anorg.-N	5,6	45
Organ.-N	7,8	63

Aus den Tabellen ist ersichtlich, daß der Gesamtstickstoff mit zunehmendem Alter der Versuchspflanzen stark abnimmt. Während bei den jungen Pflanzen, entsprechend ihrem starken Wachstum und großen Stickstoffbedarf, beträchtliche Stickstoffmengen im Saft enthalten sind, ist der Wert des Gesamtstickstoffes bei den blühenden ausgewachsenen Pflanzen auf ungefähr einen Zehntel gesunken.

Auffällig ist der hohe Prozentsatz organisch gebundenen Stickstoffs; dazu trägt der Amidstickstoff den größten Teil bei. Da die gewöhnlichen Amine wie Asparagin und Glutamin in ihrem Molekül je ein Amid-N und Amino-N besitzen, sollte in den Tabellen der Wert für Amid- und Aminostickstoff gleich sein, falls nicht gleichzeitig freie Aminosäuren oder Ureide vorhanden sind. In den Tabellen ist der Wert für den Amino-N durchwegs niedriger als der Amid-N-Wert. Die kolorimetrische Aminosäurenbestimmung ist nicht ganz zuverlässig. Sie liefert wohl gute relative Vergleichswerte, zur Bestimmung des absoluten Gehaltes ist sie jedoch unsicher. Die Werte sind immer von der gleichen Größenordnung, jedoch meist 2- bis 2,5mal kleiner als der zugehörige Amid-N-Wert, so daß sehr wahrscheinlich ein systematischer Fehler vorlag.

Da die Bromcyan-Anilin-Reaktion nicht spezifisch auf Nikotin ist, sondern auch andere Pyridinderivate sie geben, wurde das Alkaloid aus einer größeren Saftmenge isoliert und als Pikrat bestimmt. Gleichzeitig wurde versucht, eventuell vorhandene Nikotinvorstufen festzustellen.

Zu diesem Zwecke wurden 3,8 Liter des schwach sauer reagierenden Blutungssaftes im Vakuum auf 800 cm³ eingedampft, zwecks Entfernung von Säuren, Gerbstoffen und andern Begleitstoffen in der Wärme mit Bleiazetat versetzt, über Nacht stehengelassen, abfiltriert, dann das überschüssige Blei mit Schwefelsäure ausgefällt und die Lösung über Kalziumhydroxyd im Vakuum weiter eingedampft, wobei das Nikotin mit den flüchtigen Basen in einer mit n/10-Salzsäure beschickten Vorlage aufgefangen wurde.

Die eingedampfte Lösung wurde mit Äther ausgeschüttelt, um die nicht wasserdampfflüchtigen Basen abzutrennen. Diese wurden dem Ätherextrakt mit wenig verdünnter Salzsäure entzogen, auf Methylrot neutralisiert und mit Pikrinsäure versetzt; es konnte jedoch kein Pikrat isoliert werden.

Das die wasserdampfflüchtigen Basen enthaltende Destillat wurde eingedampft, bis sich Kristalle von Ammonchlorid ausschieden, und dann mit Alkohol ausgekocht, um diese zu entfernen.

Die alkoholische Lösung des Nikotins und anderer Basen wurde zur Trockne verdunstet, dann in wenig Wasser gelöst und neutralisiert. Hierauf wurde etwas gesättigte wäßrige Pikrinsäurelösung zugegeben und über Nacht im Eisschrank aufbewahrt. Die ausgeschiedenen Kri-

stalle von Nikotinpikrat zeigten einen Schmelzpunkt von $210,5^{\circ}$, waren also schon ziemlich rein. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser-Alkohol stieg der Schmelzpunkt auf $215,5^{\circ}$. Der Mischschmelzpunkt mit Nikotinpikrat betrug ebenfalls $215,5^{\circ}$. Die Mutterlauge wurde noch eingedampft, bis sich Kristalle ausschieden. Die Lösung enthielt jedoch nur noch Pikrinsäure und Natriumpikrat, dagegen ließ sich kein weiteres Pikrat mehr isolieren. Der Blutungssaft enthält also außer Nikotin keine weiteren Basen.

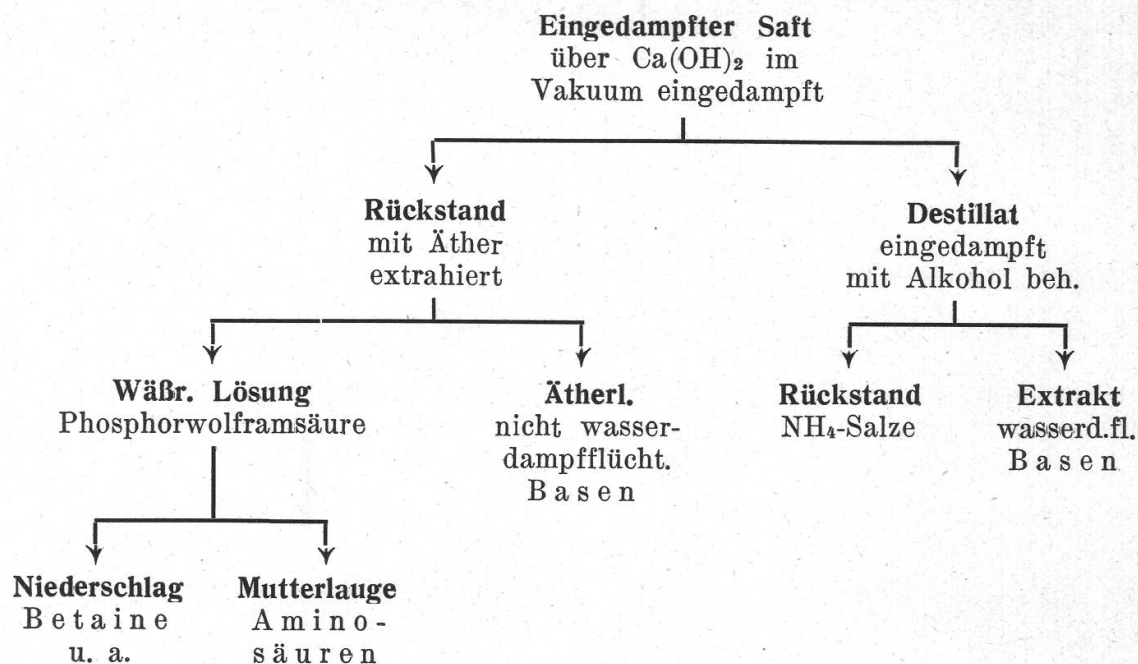
Aus dem mit Kalziumhydroxyd eingedampften Saft wurde der Kalk durch Einleiten von Kohlensäure abgeschieden. Zur weiteren Klärung wurde die dunkelbraune Lösung mit Bleiessig versetzt, wobei sich ein voluminöser, schwarzer Niederschlag ausschied und sich die Lösung gleichzeitig stark entfärbte (Gerbstoffglukoside?). Das überschüssige Blei wurde wieder mit Schwefelsäure entfernt, anschließend der Saft auf ca. 100 cm^3 eingedampft, mit Tierkohle gereinigt und weiter auf 10 cm^3 eingedampft. Die stark schwefelsaure Lösung wurde mit Phosphorwolframsäure versetzt. Diese fällt Alkaloide, Basen, Amide, teilweise Aminosäuren (Hexonbasen) u. a.

Das Phosphorwolframat wurde in Aceton-Wasser gelöst und mit Baryt zersetzt, wobei das überschüssige Barium in der Wärme durch Einleiten von Kohlensäure entfernt wurde. Nach Ansäuern mit Salzsäure und Eindampfen auf wenige Kubikzentimeter wurde wieder mit Pikrinsäurelösung versetzt. Außer Kaliumpikrat ließ sich kein weiteres Pikrat isolieren.

Die Mutterlauge der Phosphorwolframsäurefällung wurde nach Entfernen des Überschusses mit Baryt ebenfalls eingedampft, wobei anorganische Salze ausfielen. In der auf wenige Kubikzentimeter eingedampften Lösung wurde versucht, die Kupfersalze der Aminosäuren abzutrennen, was infolge der Anwesenheit großer Mengen anorganischer Salze (Nitrate) nicht gelang.

In den ausgeschiedenen Niederschlägen (Bleiessig, anorganische Salze) wurde jeweils der Stickstoffgehalt nach Kjeldahl bestimmt, damit sich keine stickstoffhaltigen Substanzen dem Trennungsgang entzogen.

Die durchgeführte Aufarbeitung des Blutungssaftes kann keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben; sie hatte nur orientierenden Charakter. Immerhin erlaubt sie den Schluß, daß der Blutungssaft mit großer Wahrscheinlichkeit neben dem Nikotin keine alkaloidartigen Basen in größeren Mengen enthält, die man als Nikotinvorstufen ansprechen könnte. Das folgende Schema veranschaulicht die Aufarbeitung.



c) Die zeitliche Veränderung der Stickstofffraktionen

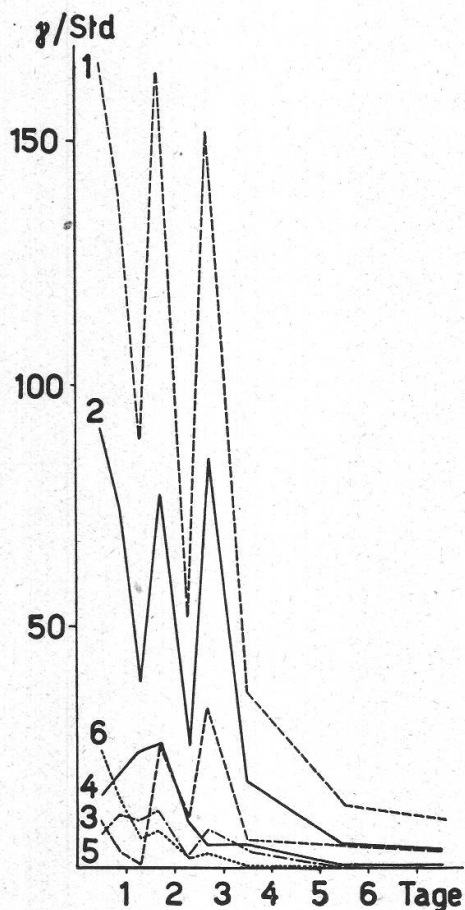
Die in Tabellen 5, 7 und 8 angeführten Werte für die verschiedenen Stickstofffraktionen der Blutungssäfte sind Mittelwerte, denn zu ihrer Bestimmung wurden die während der ganzen Blutungsdauer gesammelten Säfte verwendet. Da einerseits die Saftmenge tagesperiodischen Schwankungen unterworfen ist, anderseits der Nikotingehalt der Säfte sich ebenfalls stark verändert, wie dies bereits dargelegt worden ist (siehe Figur 2), so war zu erwarten, daß auch die andern Stickstofffraktionen ein ähnliches Verhalten zeigen würden.

In einem weiteren Versuch wurde deshalb die Stickstoffverteilung im Saft während den ersten drei Tagen zweimal täglich sowie am vierten, sechsten und achten Tag je einmal bestimmt. Das Hauptinteresse galt dabei der Frage, ob sich die einzelnen Stickstofffraktionen unabhängig voneinander veränderten oder ob sich irgendwelche Beziehungen zeigen würden, die eventuell Schlüsse auf den Wurzelstoffwechsel gestatten würden. Die folgenden Tabellen und Figuren zeigen das Ergebnis.

Mit Ausnahme des Nikotinstickstoffes zeigen alle Fraktionen tagesperiodische Schwankungen. Tagsüber ist der Saft bedeutend stickstoffreicher als nachts. Beim Gesamt- und Nitrat-N ist die Periodizität sehr stark ausgeprägt, indem der Gehalt tagsüber bis auf das Dreifache des Nachtwertes steigt. Die übrigen Fraktionen zeigen schwächere Schwankungen. Immerhin weisen auch sie ausnahmslos am Tage ein Maximum auf. Demgegenüber steigt der Wert des Nikotin-N bis zum zweiten Tag kontinuierlich an, dann fällt er innerhalb eines Tages auf einen Fünftel,

und vom fünften Tage an wird praktisch überhaupt kein Nikotin mehr gebildet (siehe Figur 3).

Der Grund, warum der Nitratstickstoff die ausgeprägteste Periodizität aufweist, liegt wohl darin, daß die Nitrationen die Wurzel unverändert passieren, während die andern Fraktionen, vielleicht mit Aus-



Figur 3

Die im Blutungssaft einer Pflanze pro Stunde enthaltene Stickstoffmenge. (Siehe Tabelle 9a.)

1. Gesamt-N
2. Nitrat-N
3. Ammoniak-N
4. Nikotin-N
5. Amid-N
6. Amino-N

nahme eines Teiles des Ammoniakstickstoffes, ihren Ursprung chemischen Umsetzungen in der Wurzel verdanken.

Tabelle 9a

Paesana-Pflanzen, 45 Tage nach Auspflanzen. Mittelwerte von 30 Pflanzen. Die im Blutungssaft einer Pflanze pro Stunde enthaltene Stickstoffmenge.

Zeit	Saft cm ³ /Std.	Gesamt γ/Std.	NO ₃ γ/Std.	NH ₃ γ/Std.	Nikotin γ/Std.	Amid γ/Std.	Amino γ/Std.
14.8.14 ³⁰	1,21	167	91	10	15	7	24
14.8.18 ⁰⁰	0,80	139	74	4	19	11	28
15.8.9 ³⁰	0,61	89	39	1	24	10	6
15.8.14 ³⁰	1,10	164	77	25	25	12	8
16.8.9 ⁰⁰	0,40	52	25	11	10	3	2
16.8.16 ⁰⁰	1,28	146	85	33	5	8	3
17.8.11 ⁰⁰	0,23	36	18	6	5	4	0,2
19.8.9 ⁰⁰	0,08	13	5	5	0,3	0,6	0,2
21.8.9 ⁰⁰	0,06	10	4	4	0,4	0,4	0,1

Bezieht man die Stickstoffmenge nicht auf die Zeiteinheit, sondern auf 1 cm³ Blutungssaft, so werden die tagesperiodischen Schwankungen weitgehend ausgeglichen, weil die Saftmenge ebenfalls im Tagesrhythmus schwankt, und man erhält das folgende Bild :

Tabelle 9b
Gleicher Blutungssaft wie in Tabelle 9.
Stickstoffgehalt pro cm³ Blutungssaft

Zeit	Gesamt γ/cm ³	NO ₃ γ/cm ³	NH ₃ γ/cm ³	Nikotin γ/cm ³	Amid γ/cm ³	Amino γ/cm ³	Rest γ/cm ³
14.8.14 ³⁰	138	75,6	8	12,1	5,6	20	16,7
14.8.18 ⁰⁰	174	92,0	5	24,2	14,4	15	3,4
15.8.9 ³⁰	146	64,0	2	39,7	16,2	10	14,1
15.8.14 ³⁰	149	70,0	23	22,5	10,6	7,5	15,4
16.8.9 ⁰⁰	131	61,6	27	24,2	8,8	5	4,4
16.8.16 ⁰⁰	114	66,4	26	4,3	6,0	2	9,3
17.8.11 ⁰⁰	153	76,4	26	20,7	17,0	1	11,9
19.8.9 ⁰⁰	151	62,0	65	4,3	7,0	2,6	10,1
21.8.9 ⁰⁰	160	58,4	75	7,8	7,0	0,9	10,9

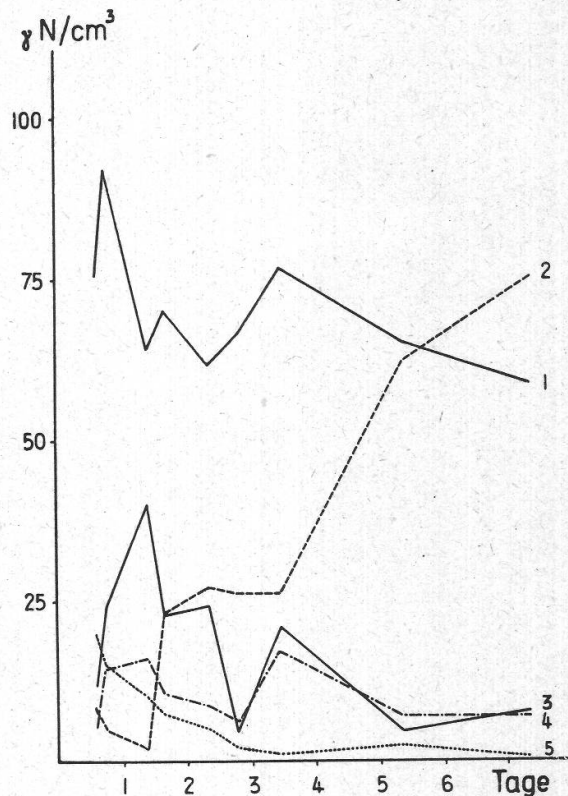
Tabelle 10
Blutungssaft älterer Pflanzen (Blütenanlagen gebildet)
Stickstoffgehalt pro cm³ Blutungssaft

Zeit	NH ₃ γ/cm ³	Nikotin γ/cm ³	Amid γ/cm ³	Amino γ/cm ³
11.9.17 ⁰⁰	21,4	3,6	0,6	21,8
12.9.9 ³⁰	18,0	7,9	1,5	32,5
12.9.17 ⁰⁰	25,5	10,2	3,2	60,0
13.9.10 ³⁰	31,1	3,1	10,6	0
15.9.10 ³⁰	23,2	1,7	4,0	0

Der Ausdeutung dieser Ergebnisse stellen sich verschiedene Schwierigkeiten entgegen. Einmal ist der im Saft enthaltene Stickstoff verschiedenen Ursprungs. Ein Teil wird von der Wurzel von außen aufgenommen und ist unverändert im Saft enthalten. Dies dürfte für den Nitrat- und einen Teil des Ammoniak-N zutreffen, da diese praktisch die einzigen der Pflanze zur Verfügung stehenden Stickstoffquellen darstellen. Ein anderer Teil wird beim Passieren der Wurzel chemisch verändert, indem beispielsweise ein Teil des Nitrates zu Ammoniak reduziert wird, wobei dieses seinerseits als Ausgangsprodukt für die Aminosäuren-, resp. Amid- oder Nikotinsynthese dienen kann. Endlich können diese Stoffe ihren Ursprung auch dissimilatorischen Vorgängen in der Wurzel verdanken. Sodann ist schwer abzuschätzen, welche Ver-

änderungen oder Schädigungen durch das Abschneiden der oberirdischen Teile verursacht werden. Sicher ist, daß der Wurzel durch die Unterbrechung der Kohlehydratzufuhr von oben ihre Energiequelle verloren geht, wodurch sich bald ein mehr oder weniger ausgeprägter Hungerstoffwechsel einstellen wird. Der Verlauf der Ammoniak-N-Kurve deutet darauf hin, daß dieser bereits nach einem Tag eintritt. Bei den jungen Pflanzen ist der Wert des Ammoniak-N während des ersten Tages verschwindend klein (Figur 4), dann steigt er sprunghaft an, bleibt zwei Tage nahezu unverändert und steigt schließlich nochmals

Figur 4
Stickstoffgehalt pro cm^3 Blutungs-
saft. (Tabelle 9b.)
1. Nitrat-N
2. Ammoniak-N
3. Nikotin-N
4. Amid-N
5. Amino-N

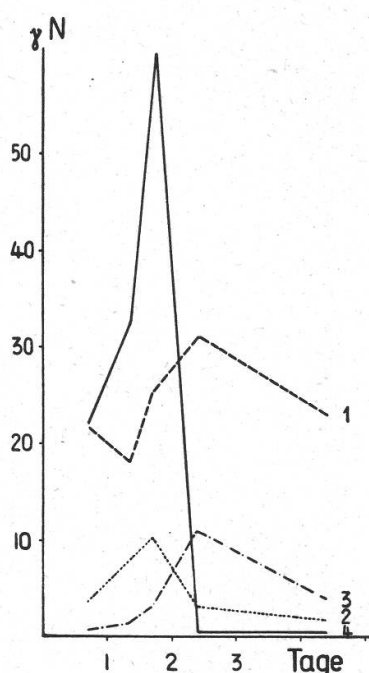


bis auf den dreifachen Wert an. Bei den blühenden Pflanzen steigt der Ammoniak-N nach einem Tag ebenfalls beträchtlich; auch der Amid-N-Wert steigt. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, daß die Pflanze ihre Stickstoffreserven zu mobilisieren beginnt. Tatsächlich treiben schon nach zwei Tagen die Achselknospen aus. Sie wurden jeweils entfernt. Der zweite Anstieg der Ammoniak-N-Kurve in Figur 4 deutet darauf hin, daß die Wurzel nun in größerem Maße Eiweiße abbauen und veratmen muß, um dem Hungertod zu entgehen. Nach einer Woche Blutungsdauer haben die meisten Pflanzen nicht mehr die Kraft, wieder auszutreiben.

Einen bemerkenswert gleichmäßigen Verlauf weist die Nitrat-N-Kurve auf; sie zeigt von allen weitaus die geringsten Schwankungen.

Während alle andern, mit Ausnahme der Ammoniak-N-Kurve, nach sieben Tagen nur noch geringe Werte aufweisen, ist sie nicht wesentlich gesunken. Die Ionenaufnahme funktioniert also auch bei starkem Hungerstoffwechsel noch.

Der Nikotingehalt steigt auch hier bei den jüngeren und älteren Pflanzen während des ersten Tages an, erreicht am zweiten Tage das Maximum, bleibt dann am dritten und vierten Tag bei mittleren Werten und sinkt vom fünften Tage an stark ab. Interessant ist die Gegenläufigkeit der Nikotin- und Ammoniak-N-Kurve. Das Maximum des Nikotingehaltes fällt mit dem Minimum des Ammoniakgehaltes zeitlich zusammen. Mit dem ersten Anstieg des Ammoniakgehaltes fällt der



Figur 5
Stickstoffgehalt pro cm³ Blutungssaft. (Tabelle 10.)

1. Ammoniak-N
2. Nikotin-N
3. Amid-N
4. Amino-N

Nikotingehalt; ebenso ist mit dem zweiten Anstieg der Ammoniakkurve ein weiterer Abfall der Nikotinkurve verbunden. Da der starke Anstieg der Ammoniakkurve sicher auf den Abbau der Eiweißsubstanzen zurückzuführen ist, deutet dies darauf hin, daß das Nikotin kein Nebenprodukt des Eiweißabbaues ist. Mit dem Überhandnehmen dissimilatorischer Prozesse wird die Nikotinsynthese stark zurückgedrängt. Dies ist merkwürdig, da in den Keimlingen die Nikotinbildung mit dem Abbau der Reserveeiweiße eng verknüpft zu sein scheint (siehe weiter hinten).

Bei den jüngeren Pflanzen verlaufen Amid- und Nikotingehalt gleichsinnig. Bei den ersten vier Säften ist der Nikotingehalt ungefähr doppelt so groß, später sind beide Werte ungefähr gleich. Ob dies nur zufällig ist oder ob dahinter eine Bedeutung steckt, läßt sich wohl erst nach genauerer Untersuchung sagen.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß der Nikotingehalt in keinem direkten Zusammenhang zum Gehalt an andern Stickstofffraktionen der Säfte steht, sondern im Gegenteil die tagesperiodischen Schwankungen aller andern Fraktionen nicht mitmacht.

d) Die Stickstoffbilanz

Als nächstes stellt sich nun die Frage, ob der durch die Säfte zugeführte Gesamt-, bzw. Nikotinstickstoff genüge, um die tatsächlich vorhandenen Mengen zu decken, mit andern Worten, ob die im Blutungssaft der abgeschnittenen Pflanzen vorhandene Stickstoffmenge der Stickstoffzufuhr in der unverletzten Pflanze entspreche.

Tabelle 11 zeigt die im Blutungssaft einer jüngern Pflanze pro Tag enthaltene Stickstoffmenge.

Tabelle 11
Stickstoff des Blutungssaftes in mg, 45 Tage nach Auspflanzen

	1. Tag	2. Tag	3. Tag
Gesamt-N	2,60	1,40	1,60
Nikotin-N	0,53	0,31	0,12
Amino-N	0,22	0,08	0,02
Amid-N	0,22	0,12	0,17
Nitrat-N	1,18	0,85	0,89
Ammoniak-N . .	0,07	0,33	0,33

Legt man der Berechnung die Maximalwerte aus Tabelle 9 zugrunde, so erhält man folgende Werte :

Gesamt-N / Tag 4,0 mg
Nikotin-N / Tag 0,6 mg

Bei S m i r n o w (Biochemie des Tabaks) finden sich für Pflanzen, 40 Tage nach dem Auspflanzen, folgende Angaben :

Gesamt-N der Blätter und Stengel pro Pflanze 842 mg
Durchschnittliche Stickstoffzufuhr pro Tag . . 21 mg
Nikotin-N der Blätter und Stengel pro Pflanze 28,2 mg
Durchschnittliche Nikotin-N-Zufuhr pro Tag . . 0,7 mg

Der pro Tag im Blutungssaft enthaltene gesamte Stickstoff ist ungefähr 6- bis 8mal kleiner als die tatsächliche Zufuhr. Mit dem Abschneiden des Stengels sinkt also die Stickstoffaufnahme der Wurzel fast um eine Größenordnung. Merkwürdigerweise verhält sich das Nikotin gänzlich abweichend, indem der Nikotingehalt des Saftes und die tatsächliche tägliche Nikotinzufuhr von der gleichen Größenordnung sind. Der relative Anteil an Nikotin-N ist deshalb im Saft sehr groß; er

beträgt über 20 % des Gesamt-N, während er in den Blättern nur 3 bis 4 % ausmacht.

Die Nikotinsynthese wird also durch das Dekapitieren nicht gestört und geht noch einen Tag lang unvermindert weiter; am zweiten Tag ist sie auf 60 %, am dritten auf 25 % gesunken, entsprechend dem durch die ausfallende Kohlehydratzufuhr bedingten Energiemangel.

Nachdem der Vergleich des Nikotingehaltes des Saftes mit der bei Smirnow angegebenen täglichen Nikotinproduktion ergeben hatte, daß beide von der gleichen Größenordnung sind, wurde in einem weiteren Versuch der Zusammenhang näher untersucht.

Zu diesem Zwecke wurden der Nikotingehalt des Saftes und der totale Nikotingehalt der Blätter und Stengel bei zehn im Gewächshaus in Sandkulturen mit Nährlösung gezogenen Paesana-Pflanzen bestimmt. Der Versuch wurde zwei Monate nach dem Umtopfen, nachdem die Pflanzen eine Höhe von ungefähr 40 cm erreicht hatten, ausgeführt, wobei sich folgendes ergab:

Blutungssaft pro Pflanze am ersten Tag . . .	9,5 cm ³
Nikotingehalt des Saftes	0,075 mg/cm ³
<i>Im Saft pro Pflanze enthaltene Nikotinmenge</i>	<i>0,71 mg/Tag</i>
Nikotingehalt von Blättern und Stengeln pro Pflanze nach 60 Tagen	37,6 mg
<i>Durchschnittliche Nikotinproduktion pro Tag .</i>	<i>0,63 mg</i>

Hier liegt die durch den Saft geförderte Nikotinmenge höher, als dem durchschnittlichen Zuwachs entspricht. Eine genaue Bilanz läßt sich nicht aufstellen, da der untere Wert den durchschnittlichen Zuwachs angibt, der obere jedoch den Maximalwert darstellen sollte, wobei es natürlich unsicher ist, ob sich die Nikotinproduktion der Wurzel durch das Abschneiden des Stengels wirklich nicht verändert.

Auf alle Fälle läßt sich sagen, daß die Wurzel sicher den weitaus größten Teil des Nikotins selber bildet und sehr wahrscheinlich die einzige Nikotinquelle darstellt, da im Blutungssaft keine alkaloidähnlichen Vorstufen nachgewiesen werden konnten.

e) Stickstoffernährung und Nikotinbildung

Die Versuche mit den Blutungssäften hatten ergeben, daß wir in der Wurzel die alleinige oder sicher die Hauptbildungsstätte des Nikotins erblicken müssen. Über die Art und Weise der Bildung ließen sich jedoch keine sichern Anhaltspunkte finden. Aufgefallen ist lediglich das abweichende Verhalten gegenüber den andern Stickstofffraktionen. Im Saft macht das Nikotin den größten Anteil des organisch gebundenen Stickstoffes aus. Abgesehen von Amiden (Amid- und Amino-N), deren

Auftreten offenbar mit dem Dekapitieren zusammenhängt, wie weiter vorn ausgeführt worden ist, enthalten die Säfte keinen assimilierten Stickstoff, so daß man annehmen kann, die Wurzel assimiliere Stickstoff nur für ihren eigenen Gebrauch. Das Nikotin ist offenbar das einzige Produkt der Stickstoffassimilation der Wurzel, das in die oberirdischen Teile, resp. den Blutungssaft gelangt.

Es ist bekannt, daß verschiedene Stickstoffernährung Schwankungen im Nikotingehalt hervorruft. Die meisten Autoren beziehen ihn jedoch auf das Trockengewicht. Dieses wird durch die Art der Stickstoffzufuhr ebenfalls verändert. In einem weiteren Versuch wurde nun dieser Einfluß auf die Nikotinführung der Blutungssäfte untersucht und zur Orientierung auch der Eiweißgehalt der Wurzeln bestimmt.

Die Pflanzen (Paesana) wurden in Sandkulturen gezogen und mit verschiedenen Nährlösungen begossen, die alle 183 mg/l Stickstoff enthielten. Die eine enthielt nur Ammoniak-N, die zweite nur Nitrat-N und die dritte beide. Im übrigen waren sie analog zusammengesetzt. (Siehe Tabelle 12.)

Tabelle 12
Stickstoffernährung und Nikotinbildung
Bezugsgröße 1 Individuum

	mg	NH ₄ NO ₃	NH ₃	NO ₃
Wurzel	Trockengewicht	1980	1240	1780
	Nikotin	8,78	3,78	6,72
Sproß	Trockengewicht	5080	3680	5280
	Nikotin	37,6	30,2	50,7
Blutungssaft	Nikotin/cm ³	0,075	0,042	0,214

Der Nikotingehalt der oberirdischen Teile und derjenige der Säfte entsprechen sich, während dies in bezug auf die Wurzeln nicht zutrifft. Die Nitratpflanzen haben in der Wurzel einen zu kleinen Nikotingehalt.

Die Nitratpflanzen weisen weitaus den größten Nikotingehalt auf, die Ammoniumpflanzen dagegen den kleinsten. Über die Nikotinverteilung in Keimlingen, die auf den verschiedenen Nährlösungen angekeimt wurden, vgl. weiter hinten.

Die Möglichkeit, daß zwischen Nitratassimilation und Nikotinbildung Zusammenhänge bestehen, ist jedenfalls nicht von der Hand zu weisen.

Da auch ein Zusammenhang mit dem Eiweißstoffwechsel der Wurzel in Betracht zu ziehen ist, wurde der Nikotingehalt der ganzen Pflanze mit dem Eiweißgehalt der Wurzel verglichen, wobei sich das in Tabelle 12 dargestellte Resultat ergab.

Bei den Ammonnitrat- und Ammoniakpflanzen ist das Verhältnis Eiweiß/Nikotin gleich, nämlich ungefähr 5 : 1, während bei den Nitratpflanzen auf drei Eiweiß-N-Atome ein Nikotin-N kommt. Aus diesen wenigen Zahlen läßt sich natürlich nichts Bestimmtes sagen. Die Verhältnisse müssen näher überprüft werden, indem der Quotient Eiweiß/Nikotin während einer ganzen Wachstumsperiode bestimmt wird.

Tabelle 13
Gesamtnikotin und Wurzeleiweiß in mg pro Pflanze

Nährlösung	Nikotin-N	Eiweiß-N	Eiweiß/Nikotin
NH ₄ NO ₃	8,01	38,8	4,84
NH ₄	5,87	28,4	4,84
NO ₃	9,90	29,4	2,97

C. Der Wanderweg des Nikotins

Die Tatsache, daß das aus dem Xylem austretende Wasser des Blutungssaftes nikotinhaltig ist, legt zwar den Schluß nahe, daß auch das Nikotin auf diesem Wege nach oben gelangt. Es ist immerhin ungewohnt, daß organische Moleküle durch das Xylem wandern. Ebenso entspricht die Tatsache, daß die Säfte unter Umständen beträchtliche Amidmengen enthalten, nicht der klassischen Trennung von Xylem als Wasserleitungsgewebe und Phloem als Stoffleitungsbahn.

Um sicher zu sein, daß die genannten Stoffe nicht aus der sekundären Rinde in den Blutungssaft gelangen, wurde der Blutungssaft von bis auf das Kambium entrindeten Pflanzen untersucht. Der Tabak besitzt als Solanacee zwar bikollaterale Leitbündel, hat also markständiges Phloem. Bei größeren Pflanzen ist dieses jedoch von untergeordneter Bedeutung. Der Saft zeigte die in Tabelle 14 angegebene Zusammensetzung.

Tabelle 14
Blutungssaft von bis aufs Kambium entrindeten Pflanzen
Mt calme brun

	Gehalt γ/cm^3	% Gesamt-N
Gesamt-N	113,4	100
Ammoniak-N . .	39,5	35,0
Nitrat-N	18,3	16,1
Nikotin-N	22,0	19,5
Amid-N	6,7	5,9
Amino-N	27,3	24,0
Eiweiß-N	—	—
Rest-N	—	—

Der Saft zeigt eine den andern analoge Zusammensetzung, vor allem ist der Nikotingehalt nicht geringer. Das Nikotin wandert also nicht durch das Phloem nach oben.

Im weiteren wurden zur Bestätigung dieses Befundes Ringelungsversuche durchgeführt. Nach Versuchsende wurde der Nikotingehalt der neugebildeten Blätter bestimmt. Um eine Wanderung des Nikotins von den älteren in die neugebildeten Blätter, die nach *M o t h e s* (1928) zwar nicht stattfindet, zu unterbinden, wurden bei einem Teil der Pflanzen sämtliche Blätter bis zur Gipfelknospe entfernt. Als Vergleich dienten ungeringelte Pflanzen.

Tabelle 15
Neugebildete Blätter geringelter Pflanzen (Paesana)
Versuchsdauer 1 Monat

	Frischgewicht	Trocken- gewicht	Trocken- gewicht/ Frischgewicht	Nikotin/ Pflanze	Nikotin/g Frischgewicht
	g	g	g	mg	mg
geringelt entblättert	13,6	1,71	0,126	14,7	1,08
geringelt beblättert	17,3	2,65	0,153	17,8	1,03
Kontrolle	22,2	2,63	0,118	23,7	1,07

Tabelle 16
Gleich wie Tabelle 15. Versuchsdauer 2 Monate

	Frischgewicht	Trocken- gewicht	Trocken- gewicht/ Frischgewicht	Nikotin/ Pflanze	Nikotin/g Frischgewicht
	g	g	g	mg	mg
geringelt entblättert	41,4	5,6	0,135	39,0	0,94
geringelt beblättert	52,6	7,3	0,139	45,2	0,86
Kontrolle	56,7	7,1	0,125	38,4	0,68

Die Ringelung hat also keinen großen Einfluß auf die Nikotinführung der neugebildeten Blätter, was eine weitere Bestätigung, daß das Nikotin im Xylem wandert, darstellt. Die Wirkung der Ringelung, die den Abfluß der Assimilate staut, zeigt sich deutlich im erhöhten Verhältnis Trockengewicht/Frischgewicht.

Im nächsten Abschnitt wird gezeigt, daß sich das Nikotin in den Wasserleitungsgeweben histochemisch nachweisen läßt.

D. Die Nikotinbildung bei der Keimung

Die Untersuchung der Blutungssäfte hatte gezeigt, daß die Bildungsstätte des Nikotins in der Wurzel zu suchen ist. Da ungekeimte Samen praktisch nikotinfrei sind, so war zu überprüfen, ob auch schon in den frühesten Stadien die Wurzel der alleinige Entstehungsort des Alkaloides sei.

1. Chemische Untersuchung von Samen

Umfangreiche Untersuchungen über den Stickstoffstoffwechsel stammen von Iljin (1933). Er stellte fest, daß unreife Samen Nikotin enthalten, das jedoch mit fortschreitender Reife verschwindet; gleichzeitig nimmt der Wassergehalt ab, der Reserveeiweißgehalt zu. Bei der Keimung tritt der umgekehrte Vorgang ein. Klein und Herndlhofer (1927) stellten zwar auch im reifen Samen Spuren von Nikotin fest; das Ergebnis wurde jedoch von andern Autoren angezweifelt.

Es wäre möglich, daß das Nikotin nicht vollständig, sondern nur bis zu Vorstufen abgebaut würde oder nur maskiert wäre, woraus sich Schlüsse auf den Entstehungsmechanismus ergäben. Albo (1903) z. B. hat in den Samen eine solaninartige Substanz nachgewiesen; von andern Autoren konnte dies nicht bestätigt werden. Deshalb wurde eine größere Menge Samen aufgearbeitet.

Vorerst wurde der Nikotingehalt bestimmt, indem gut gewaschene Samen mit Quarzsand im Mörser zerstoßen wurden, dann drei Stunden in einer 10-%-Kaliumkarbonatlösung stehengelassen und anschließend mit Wasserdampf destilliert; die Bestimmung erfolgte kolorimetrisch.

Einwaage (Paesana)	4,557 g
Nikotin	110 γ
Gehalt	2,4 mg %

Die Bestimmungen sind nicht ganz zuverlässig, da an den Samen trotz Waschen noch Reste der nikotinhaltigen Samenkapsel haften können.

Die Hauptmenge wurde folgendermaßen aufgearbeitet¹:

3 kg Samen wurden in einer Kugelmühle gemahlen und mit 2 l 0,5-%-Essigsäure auf 90° erhitzt, dann abgepreßt und nochmals mit Essigsäure und 2 l Benzin geschüttelt. Der Essigextrakt wurde zwecks Entfernung von Eiweißen und anderen Stoffen mit Bleiazetat versetzt, das überschüssige Blei mit Schwefelsäure entfernt, dann im Vakuum bei sodaalkalischer Reaktion eingedampft, wobei die flüchtigen Basen in einer mit Salzsäure beschickten Vorlage aufgefangen wurden. Der weitaus größte Teil bestand aus Ammonsalzen. Durch Auskochen mit absolutem Alkohol wurde die Hauptmenge entfernt. Zur vollständigen Entfernung wurde noch mit Quecksilberoxyd behandelt. Dieses setzt sich mit Ammoniak zu unlöslichen Ammonium-merkuri-oxyden um, während primäre, sekundäre und tertiäre Amine nicht reagieren². Hierauf wurde auf Methylrot neutralisiert, mit

¹ Guggenheim, Die biogenen Amine (1940).

² François, C. r. Acad. Sci. 144, 567, 857 (1907); 146, 1284 (1908).

Pikrinsäure versetzt und längere Zeit im Kühlschrank aufbewahrt. Es hatte sich etwas Nikotinpikrat abgeschieden, daneben noch geringe Mengen anderer Kristalle, wahrscheinlich Trimethylaminpikrat.

Der nicht wasserdampfflüchtige Teil wurde weiter eingedampft und bei stark schwefelsaurer Reaktion mit Phosphorwolframsäure versetzt. Diese fällt Alkaloide, einen großen Teil der biogenen Amine, Kalium u. a. m. Das ausgefällte Phosphorwolframat wurde zersetzt und das Basengemisch nach dem Silberbarytverfahren zerlegt¹. Silbersalze besitzen die Fähigkeit, Basen mit schwach saurer Aminogruppe auszufällen. Bei der Aufarbeitung konnten keine Stoffe isoliert werden, die auf einen Zusammenhang mit Nikotin schließen ließen.

Im Filtrat der Silberbarytfällung wurden die Basen wieder als Phosphorwolframat abgetrennt. Bei ihrer Aufarbeitung konnten ebenfalls keine Substanzen, die als Abbauprodukte des Nikotins aufzufassen wären, isoliert werden. Insbesondere konnten keine Betaine, die einen Pyridinring enthalten, nachgewiesen werden².

Zu ähnlichen negativen Resultaten sind auch andere Autoren gekommen, beispielsweise V i c k e r y (1932).

Es scheint, daß das Nikotin bei der Samenreifung vollständig abgebaut wird oder auswandert und bei der Keimung wieder völlig neu entsteht.

2. Nikotinbestimmungen in Keimlingen

Die kolorimetrische Nikotinbestimmung mit Bromcyan-Anilin hatte sich bei der Untersuchung der Blutungssäfte zur quantitativen Erfassung kleinster Nikotinmengen sehr bewährt. An Empfindlichkeit übertrifft sie die andern Methoden beträchtlich.

Mit ihrer Hilfe wurde das erste Auftreten des Nikotins im Keimling verfolgt. C h a z e (1932) hatte in 3 mm langen Keimlingen bereits Nikotin festgestellt. Da nach I l j i n (1929, 1933) das Nikotin beim Abbau der Reserveeiweiße entsteht, war zu erwarten, daß es schon in den frühesten Keimungsstadien auftreten würde.

Die Bestimmung wurde folgendermaßen ausgeführt: 100 Keimlinge wurden in einem mit kleinem Liebig-Kühler verbundenen 20 cm³-Kölbchen mit 15 cm³ einer 5 % Soda enthaltenden gesättigten Kochsalzlösung versetzt. Das Ende des Kühlers war in die mit 2 cm³ Anilin-Phosphatpuffer (pH 6,1) beschickte Vorlage eingetauscht. Dann wurden ohne Anwendung von Wasserdampf 7 cm³ abdestilliert und das Nikotin auf die weiter vorn beschriebene Art kolorimetrisch bestimmt.

Modellversuche hatten ergeben, daß auf diese Weise 100 γ vorgelegtes Nikotin in 5 cm³ Destillat quantitativ enthalten war. Die Apparatur muß zu diesem Zweck möglichst klein gehalten werden; ein 50 cm³-Kölbchen mit entsprechendem Kühler erforderte zur quantitativen Erfassung über 10 cm³ Destillat.

¹ K o s s e l und K u t s c h e r, Z. physiol. Ch. 31, 165 (1900) u. a.

² In der Lysin-Betain-Fraktion wurde *Cholin* isoliert und nach der Methode von L i n t z e l (Bioch. Z. 238, 438, 452 [1931]; 241, 273 [1931]), bei der das Cholin mit KMnO₄ oxydiert und das gebildete Trimethylamin titriert wird, quantitativ bestimmt. Der Gehalt betrug 110 mg%.

Tabelle 17 zeigt den Verlauf der Nikotinbildung von im Dunkeln gekeimten Samen bei Verwendung verschiedener Nährlösungen (siehe weiter vorn).

Tabelle 17

Nikotingehalt von im Dunkeln gekeimten Samen mit verschiedenen Nährlösungen (Paesana). Temp. 25°. γ Nikotin/Keimling

Nährlösung	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag	11. Tag
H ₂ O . . .	0,02	0,08	0,25	0,61	0,80	0,80	—	0,68
NO ₃ . . .	0,02	0,04	0,18	0,46	0,66	0,60	—	0,60
NH ₃ . . .	0,02	0,04	0,15	0,40	0,40	0,45	—	0,47
NH ₄ NO ₃ . .	0,02	0,04	0,22	0,36	0,40	0,45	—	0,40

3. Tag: Samen ungekeimt

4. Tag: Samenschale gesprengt

5. Tag: Wurzel auf Samenlänge ausgewachsen

6. Tag: Länge des Keimlings 3 mm

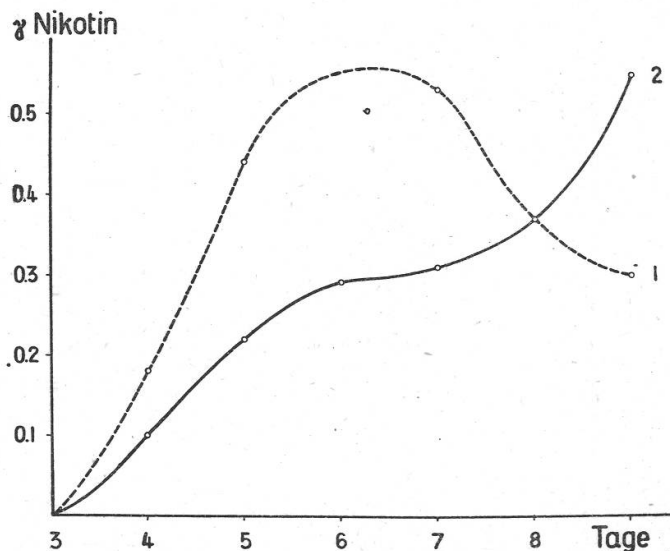
7. Tag: » » » 6 mm

8. Tag: » » » 10 mm

9. Tag: » » » 14 mm

11. Tag: » » » 18 mm

Das erste Nikotin tritt also auf, sobald die Samenschale gesprengt wird. Entsprechend dem Wachstum der Keimlinge nimmt es in den nächsten Tagen stark zu. Nach etwa 8 Tagen sind die Reservestoffe



Figur 6

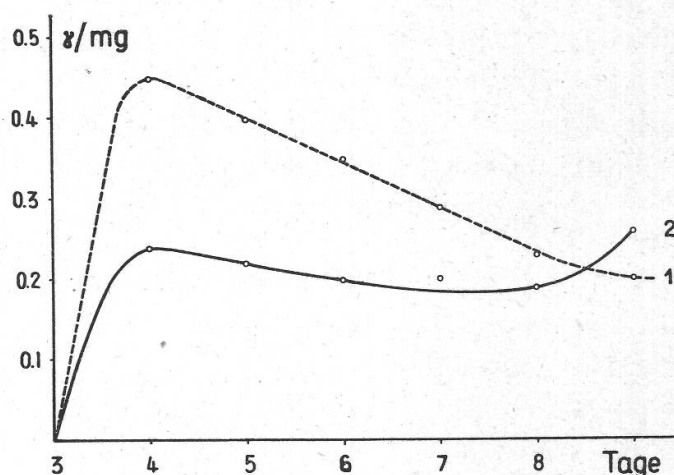
Auf Nährlösung angekeimte
Samen. Nikotingehalt in
 γ /Keimling
1 unbelichtet
2 belichtet

aufgebraucht, und der Nikotingehalt nimmt im Folgenden wieder ab, trotzdem die Keimlinge durch Streckungswachstum noch bis auf 30 mm Länge auswachsen.

Die auf Wasser gekeimten Samen zeigen den größten Nikotingehalt, die Nitratkeimlinge sind ebenfalls sehr nikotinreich, während

die Ammoniak- und Ammonnitratkeimlinge nur ungefähr den halben Nikotingehalt aufweisen. Die Keimlinge zeigen eine entsprechende Nikotinverteilung wie ältere auf den gleichen Nährlösungen gezogene Pflanzen (siehe vorn, Abschnitt B). Der Unterschied im Nikotingehalt macht sich bemerkbar, sobald das Würzelchen die Samenschale durchbrochen hat. Die Nährlösung übt also schon in diesem frühen Stadium, wo der Keimling vorwiegend autotroph durch Abbau der Reservestoffe lebt, einen tiefgreifenden Einfluß auf den Nikotinstoffwechsel aus.

Figur 7
Gleiche Keimlinge wie in
Figur 6. γ Nikotin/mg Frisch-
gewicht
1 unbelichtet
2 belichtet



Die am Licht gekeimten Samen zeigen unter dem Einfluß der verschiedenen Nährlösungen eine gleiche Nikotinverteilung wie die im Dunkeln gekeimten. Der Nikotingehalt der Lichtkeimlinge ist jedoch allgemein kleiner. Tabelle 18 und Figuren 6 und 7 zeigen den Verlauf der Nikotinbildung von im Dunkeln und im Licht unter sonst gleichen Bedingungen gekeimten Samen. Als Lichtquelle dienten vier Quecksilberdampflampen mit je 125 Watt Leistung und 8 m Neon-Leuchtröhren, in einem Reflektor in einem Meter Abstand montiert. Die Beleuchtung war durchgehend eingeschaltet.

Tabelle 18.

Einfluß des Lichtes auf den Nikotingehalt der Keimlinge (Mt calme brun)

Temp. 25°. 1 = γ Nikotin/Keimling

2 = γ Nikotin/mg Frischgewicht. Auf Nährlösung angekeimt

Tag	dunkel		belichtet	
	1	2	1	2
4	0,18	0,45	0,10	0,24
5	0,44	0,40	0,22	0,22
6	0,50	0,35	0,29	0,20
7	0,53	0,29	0,31	0,20
8	0,37	0,23	0,37	0,19
9	0,30	0,20	0,55	0,26

Aus Figur 6 ist deutlich ersichtlich, daß zwei Phasen der Nikotinbildung vorliegen. In der ersten Phase ernährt sich der Keimling autotroph. Sie ist am sechsten bis siebenten Tag mit dem vollständigen Abbau der Reserveeiweiße (sämtliche Aleuronkörner verschwunden) abgeschlossen. Sie ist gekennzeichnet durch einen relativ starken Anstieg des Nikotingehaltes. Das Nikotin entsteht hier offenbar als Nebenprodukt dieses Abbaues. Die im Dunkeln oder auf Wasser gekeimten Samen zeigen hier das Maximum ihres Nikotingehaltes. Wegen des Licht-, resp. Stickstoffmangels kann kein Nikotin mehr erzeugt werden, und dessen Gehalt nimmt im folgenden wieder ab.

Die im Dunkeln oder auf Wasser gekeimten Samen zeigen einen bedeutend höheren Nikotingehalt als die Lichtkeimlinge. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß bei jenen der Reserveeiweißabbau besonders intensiv ist. Auf ähnliche Ursachen dürfte der Einfluß der Nährlösung auf den Nikotingehalt zurückzuführen sein. Bei den Ammoniakpflanzen ist der Nikotingehalt klein, weil dem Keimling zusätzlich eine leicht verwertbare Stickstoffquelle zur Verfügung steht.

Die Lichtkeimlinge gehen nach Abschluß der autotrophen Phase zur heterotrophen Ernährung über. Der Übergang ist aus dem Wendepunkt der Nikotinkurve in Figur 6 deutlich ersichtlich. Der weitere Verlauf der Kurve hängt stark von Temperatur und Belichtung ab. Bei niedrigen Temperaturen kann der Nikotingehalt eine Woche oder länger konstant bleiben oder sogar leicht abnehmen, trotzdem Frisch- und Trockengewicht der Keimlinge ständig zunehmen. Unter optimalen Bedingungen hingegen vollzieht sich dieser Übergang leichter.

Ob die Bildung des Nikotins in dieser zweiten Phase auch an den Abbau von Eiweißsubstanzen gebunden ist, oder ob es im Zusammenhang mit der Eiweißsynthese entsteht, läßt sich auf Grund des vorliegenden Materials nicht entscheiden. Es ist das Ziel laufender Untersuchungen, die Frage durch Einbeziehung des Eiweißstoffwechsels weiter zu klären.

Im nächsten Abschnitt wird gezeigt, daß die Keimlinge in den beiden Phasen der Nikotinbildung eine charakteristische Nikotinverteilung besitzen.

3. Fluoreszenzoptischer Nikotinnachweis

Der histochemische Nachweis des Nikotins bietet infolge des Fehlens eines spezifischen Reagens einige Schwierigkeiten. Die meisten der gebräuchlichen Alkaloidfällungsmittel besitzen den Nachteil, daß sie auch mit andern Substanzen Niederschläge geben (tertiäre Ammoniumbasen, Eiweißabbauprodukte). Chaze (1932), dessen Arbeit über das erste Auftreten des Nikotins in Keimlingen bereits erwähnt wurde, benutzte das Reagens von Bouchardat (KJ + J). Er stellte fest, daß

das Nikotin überall dort auftritt, wo Reserveeiweiß abgebaut wird, also in der Nähe der Aleuronkörner. Als Bestätigung, daß der braune Niederschlag mit dem Reagens von Bouchardat wirklich von Nikotin herrührt, führt er an, daß mit weinsaurem Alkohol extrahierte Keimlinge keinen Niederschlag gaben.

Die Tatsache, daß die Niederschläge in der Nähe der Aleuronkörner auftraten, schließt die Möglichkeit ein, daß sie von Eiweißabbauprodukten herrühren könnten. Das Ausbleiben der Niederschläge nach Extraktion mit saurem Alkohol beweist noch nicht, daß diese wirklich vom Nikotin hervorgerufen wurden, da die andern Basen, die zu Täuschungen Anlaß geben könnten, ebenfalls extrahiert werden.

Das viel spezifischere Bromcyan-Anilinreagens, das ausschließlich Pyridinderivate erfaßt, die in der Pflanze sehr selten vorkommen (Trigonellin, Nikotinsäureamid), erwies sich dank seiner großen Empfindlichkeit auch für den histologischen Nikotinnachweis als geeignet.

Der entstehende Farbstoff zeigt im Fluoreszenzmikroskop auch in großer Verdünnung starke gelbe Fluoreszenz. Nikotin selber besitzt blaue Eigenfluoreszenz. Die Fluoreszenzfarbe der Keimlinge ist jedoch auch blau, so daß sich das Nikotin nicht direkt nachweisen läßt. Nikotin-pikrat fluoresziert grün, das Kieselwolframat schmutzigblau; infolge ihrer relativ geringen Empfindlichkeit sind diese beiden jedoch zum histologischen Nachweis nicht geeignet. Die Bestimmung wird folgendermaßen durchgeführt:

Man legt die Keimlinge in eine Lösung, bestehend aus gleichen Teilen Bromcyan- und Anilinlösung. Die nikotinhaltigen Stellen färben sich nach kurzer Zeit gelb. Die Färbung ist auch im gewöhnlichen Mikroskop sichtbar, das Fluoreszenzmikroskop liefert jedoch viel leuchtendere und differenziertere Bilder.

Im vorigen Abschnitt wurde ausgeführt, daß bei der Keimung zwei Phasen unterschieden werden können. In der ersten lebt der Keimling autotroph, in der zweiten heterotroph. In beiden Phasen wird Nikotin erzeugt, und beide Stadien zeigen eine charakteristische Verteilung des Alkaloids im Keimling.

Die ersten drei Fluoreszenzaufnahmen (Farbtafel Abb. 1—3) zeigen die Nikotinverteilung während des ersten Stadiums (Samen auf Wasser im Dunkeln gekeimt, Samenschale entfernt). Das Nikotin tritt überall dort auf, wo Wachstum stattfindet. Simultan zum Auftreten des Nikotins verschwinden die Aleuronkörner. Das erste Nikotin ist nachweisbar, sobald das Würzelchen die Samenschale gesprengt hat, und zwar an jener Stelle, wo sich die Wurzel etwas gestreckt hat. In den nächsten Stadien streckt sich das Hypokotyl stark, und dementsprechend findet eine starke Nikotinanreicherung statt. Besonders intensiv färbt sich die Stelle, wo das Hypokotyl gebogen ist und infolgedessen ein besonders starkes Wachstum aufweist. Die Wurzel wächst ebenfalls, und wir fin-

den das Nikotin hauptsächlich in der Nähe der Wurzelspitze, während die Kotyledonen noch in der Samenschale stecken und nikotinfrei sind. Gegen Ende dieser autotrophen Phase, wenn alle Aleuronkörner verschwunden sind, zeigt der Keimling eine ziemlich gleichmäßige Nikotinverteilung; auch die Kotyledonen sind nun nikotinhaltig. Meistens weist das Hypokotyl, entsprechend seinem starken Wachstum, einen etwas erhöhten Gehalt auf. Eine quantitative Bestimmung an neun Tage alten Keimlingen ergab folgendes:

Wurzel	0,40 γ	Nikotin/mg	Frischgewicht
Hypokotyl . . .	0,47 γ	»	»
Kotyledonen . .	0,44 γ	»	»

In dieser ersten Phase ist die Nikotinbildung also nicht auf die Wurzel allein beschränkt, sondern sie vollzieht sich im ganzen Keimling überall dort, wo Aleuronkörner abgebaut werden. Die Samenschale, die ebenfalls große Mengen von Aleuronkörnern enthält, bleibt jedoch vollständig nikotinfrei.

Die am Licht auf Nährlösung gekeimten Samen sind viel gedrungener; sie zeigen jedoch in dieser ersten Phase eine gleiche Nikotinverteilung wie die Wasserkeimlinge. Dieses Bild ändert sich aber, sobald der Keimling zur heterotrophen Ernährung übergeht. Das Nikotin im Hypokotyl verschwindet; in der Epidermis der Kotyledonen hingegen, hauptsächlich in den Schließzellen der Spaltöffnungen, reichert es sich an. Die Wurzel, scharf abgegrenzt vom Hypokotyl, färbt sich mit Bromcyan-Anilin stark gelb, und zwar hauptsächlich in der obersten Zone und in der Nähe der Wurzelspitze, während die Saugzone nur schwach gefärbt ist. Ebenso zeigen die aus dem Hypokotyl sich differenzierenden Adventivwurzeln intensive Gelbfärbung (Abbildung 4). Jetzt ist offenbar die Wurzel die einzige Bildungsstätte des Alkaloides.

Die Wasserleitungsbahnen leuchten im ganzen Keimling von der Wurzel durch das Hypokotyl bis in die Verzweigungen in den Kotyledonen stark gelb, ein Zeichen, daß das Nikotin mit dem aufsteigenden Saftstrom von der Wurzel in die Kotyledonen geschwemmt wird (Abbildung 4 der Farbtafel).

Die Wurzel ist in diesem Stadium sehr nikotinreich. Durch die fortgesetzte Anreicherung des mit dem Transpirationswasser nach oben gelangenden Nikotins werden die Blätter immer nikotinreicher und weisen am Ende der Vegetationsperiode einen bedeutend größeren Nikotingehalt auf als die Wurzel.

Dieser fluoreszenzoptische Befund zeigt völlige Übereinstimmung mit den Blutungs- und Ringelungsversuchen, was eine weitere Bestätigung ist, daß das Nikotin in der Wurzel gebildet und durch das Xylem in die oberirdischen Organe geschwemmt wird.

Tafel 1

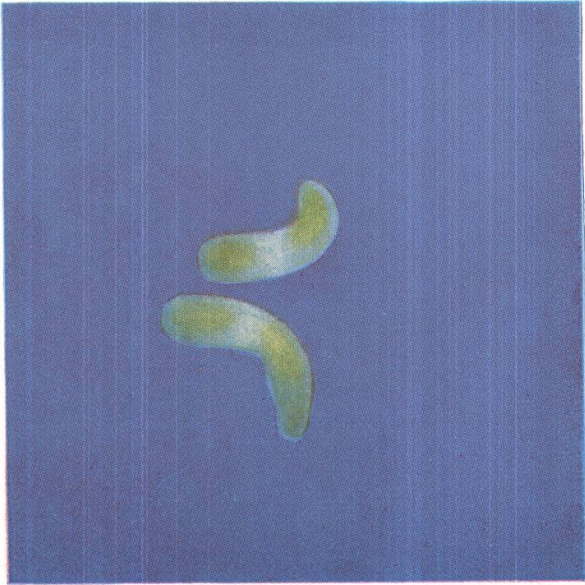


Abbildung 1

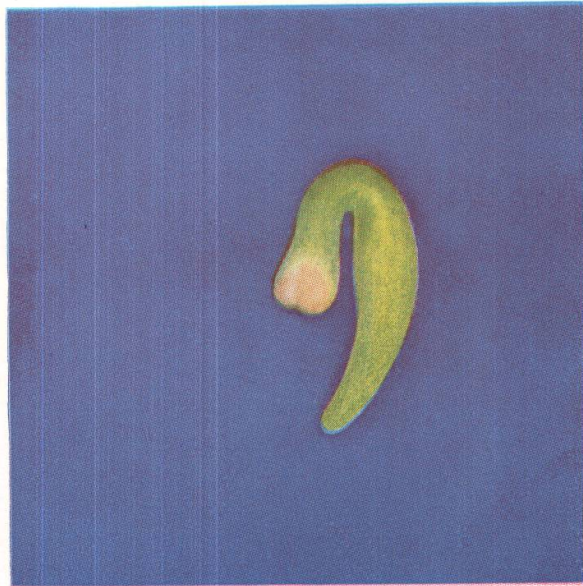


Abbildung 2

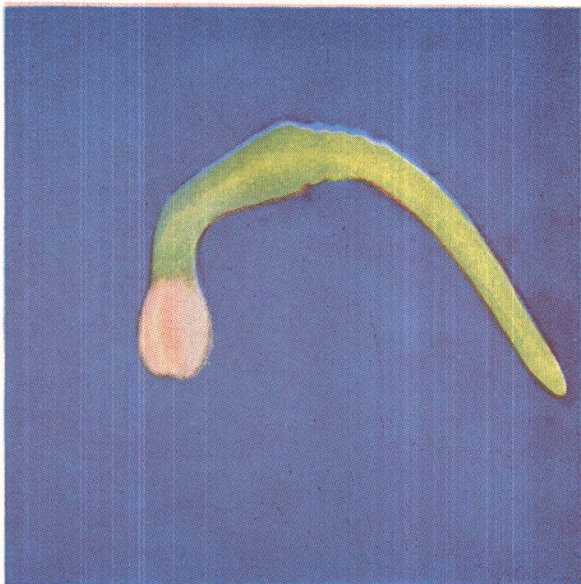


Abbildung 3

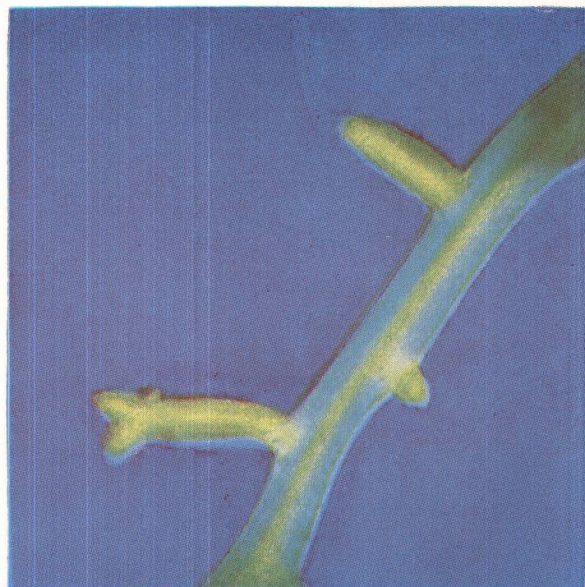


Abbildung 4

E. Schlußbetrachtungen

Die Nikotinbilanz der Blutungssäfte, welche ergeben hatte, daß die im Saft pro Tag enthaltene Nikotinmenge dem durchschnittlichen Zuwachs entspricht, ebenso die Abwesenheit von Stoffen, die als Nikotinvorstufen anzusprechen wären, das negative Ergebnis der Fütterungsversuche und der histochemische Nikotinnachweis in Keimlingen zeigen deutlich, daß die Wurzel als der alleinige Bildungsort des Nikotins anzusehen ist. Die von S c h m u c k und Mitarbeitern (1939) auf Grund von Propfversuchen mit *N. tabacum* und *N. glauca* geäußerte Ansicht, daß die Wurzel den Alkaloidstoffwechsel des Reises beeinflusse, das Alkaloid jedoch im Sproß entstehe, trifft zum mindesten bei normalen, nicht gepfropften Tabakpflanzen nicht zu. Dagegen besteht natürlich die Möglichkeit, daß sich in Pfropfbastarden Reis und Unterlage gegenseitig beeinflussen. Das Verschwinden des Nikotins in den Pfropfungen mit Tomate als Unterlage deutet auf eine solche Beeinflussung hin: Offenbar verlieren die Tabakblätter die Fähigkeit, weiterhin Nikotin zu speichern. Ebenso ist umgekehrt ein Einfluß des Pfropfreises auf den Wurzelstoffwechsel möglich, um so mehr, als die Kohlenstoffskelette für die Alkaloide sehr wahrscheinlich von den Blättern geliefert werden. Das gleichzeitige Auftreten von Anabasin und Nikotin in den Pfropfungen von S c h m u c k mit *N. glauca* als Pfropfreis könnte durch eine solche Einwirkung bedingt sein. Bei *N. glauca* scheint der Alkaloidstoffwechsel nach neueren Untersuchungen (D a w s o n, 1944) von demjenigen der *N. tabacum* abzuweichen.

In neuester Zeit sind auch Versuche von D a w s o n (1942) bekannt geworden, der nachwies, daß isoliert gezüchtete Wurzeln Nikotin zu bilden vermögen.

Die Wurzel scheint im Stoffwechsel der Pflanze eine bedeutend größere Rolle zu spielen, als die klassische Pflanzenphysiologie annahm. Ihre Funktion ist mit der vielfältigen Aufgabe der Stoff- und Wasseraufnahme nicht erschöpft, vielmehr besitzt sie auch die Fähigkeit, Synthesen kompliziert gebauter Stoffe auszuführen. Vor allem scheint sie ihre Eiweiße und andern stickstoffhaltigen Körper selbst aufzubauen, wobei die oberirdischen Teile zu dieser Synthese die als Kohlenstoffgerüste und Energiequelle dienenden Kohlehydrate liefern.

Die Untersuchungen von C h a z e (1932) und die eigenen Beobachtungen an Keimlingen zeigen, daß das Nikotin bei der Keimung in der Nähe der Aleuronkörner entsteht und daß sein Auftreten mit dem Abbau dieser Körper parallel geht, so daß ein enger Zusammenhang mit dem Eiweißstoffwechsel anzunehmen ist. Dies berechtigt zur Annahme, daß auch zwischen dem Wurzeleiweißstoffwechsel und der Nikotinbildung eine Beziehung besteht. Die Anschauung der älteren Autoren, daß die Alkaloide Nebenprodukte des Eiweißstoffwechsels seien, behält weiterhin ihre Berechtigung, allerdings nur in bezug auf die Wurzel.

Die alte Streitfrage, ob das Nikotin Nebenprodukt der Eiweißsynthese oder des Abbaues sei, bleibt ungeklärt. Diese Einteilung ist vielleicht allzu summarisch, so daß man die Berechtigung der Fragestellung in dieser Form anzweifeln kann. Das Nikotin scheint sich nicht eindeutig zu verhalten, indem es beispielsweise einerseits in jungen Keimlingen als Nebenprodukt der Eiweißmobilisierung auftritt, während andererseits die Wurzeln im Zustande des Hungerstoffwechsels, wo man auch eine Reservestoffmobilisierung erwarten würde, praktisch kein Nikotin mehr produzieren. Die beiden orientierenden Versuche, bei denen das Verhältnis Wurzeleiweiß/Gesamtnikotin konstant war, weisen wieder mehr auf eine Entstehung bei der Synthese hin. Es wäre auch möglich, daß das Alkaloid im Zusammenhang mit den dissimilatorischen Prozessen, die der Verholzung der Wurzel vorangehen, entsteht. Die Beobachtung, daß das Nikotin in den Keimlingen in den obersten, am meisten differenzierten Stellen der Wurzel auftritt, deutet vielleicht in dieser Richtung. Wenn sich auch bis jetzt nichts Sicheres aussagen läßt, so ist doch zu hoffen, daß es durch Einbeziehung des Wurzeleiweißstoffwechsels in die Untersuchungen gelingt, die Bildungsverhältnisse weiter abzuklären.

Die von Iljin geäußerte Ansicht, das Nikotin sei ein Reservestoff, ist im Hinblick auf den sehr trägen Alkaloidstoffwechsel der Blätter sehr unwahrscheinlich. Das Verschwinden des Nikotins aus reifenden Samen, das ihn zu diesem Schlusse führte, kann viel ungezwungener erklärt werden. Da das Nikotin im Transpirationswasser nach oben geschwemmt wird, ist es auch in den unreifen Samen vorhanden, entsprechend ihrer offenbar geringen Transpiration jedoch nur in kleinen Mengen (zirka 0,4 % des Gesamt-N), so daß es schon infolge seines geringen Anteils am Gesamt-N als Reservestoff kaum in Betracht fällt. Im Verlaufe der Samenreifung nimmt der Wassergehalt beträchtlich ab, gleichzeitig steigt das *pH* bis auf 7,4. Das Nikotin ist aus alkalischem Milieu leicht wasserdampfflüchtig, so daß sich die geringen Mengen leicht mit dem Wasser aus dem alkalisch reagierenden Samen verflüchtigen können, ohne daß ein Zusammenhang mit der gleichzeitig vor sich gehenden Reserveeiweißanhäufung besteht. Dies ist um so wahrscheinlicher, als sich kleine Nikotinmengen auch aus den sauer reagierenden Blättern verflüchtigen (Chaze, 1932).

Die Feststellung, daß das Nikotin im Xylem wandert, ist ebenfalls bemerkenswert, da dies nicht mit den klassischen Anschauungen von Xylem als Wasser- und Phloem als Stoffleitungsbahn übereinstimmt. Allerdings geht der Xylemstrom aufwärts, während der Phloemtransport vorwiegend oder ausschließlich abwärts gerichtet ist. Wenn nun ausnahmsweise Assimilate wie das Nikotin von unten nach oben transportiert werden, so scheint die Pflanze den viel rascheren Transport

durch das Xylem demjenigen durch das Phloem vorzuziehen, und zwar nicht nur als zeitlich beschränkter Ausnahmefall wie der Zuckertransport im Holz während des Treibens. Daß dies nicht auf das Nikotin allein beschränkt ist, zeigt der zum Teil beträchtliche Amidgehalt der Säfte.

Der Xylemtransport ist verantwortlich für die Besonderheit der Verteilung des Nikotins in den oberirdischen Organen. Über diese Verteilung existieren genaue Untersuchungen. Das Alkaloid ist in den Blättern angereichert, hier hauptsächlich im Mesophyll. Eine starke Anreicherung findet auch in allen peripheren Organen statt sowie an « Orten gesteigerter Lebenstätigkeit » (Bernardini, 1921). Dagegen sind die Wurzeln, die Stengel und alle verholzten Gewebe sehr nikotinarm. Dies erklärt sich leicht folgendermaßen:

Das Transpirationswasser ist nikotinhaltig. An Orten starker Transpirationstätigkeit reichert sich das Nikotin an, da es an die im Zellsaft vorhandenen Säuren gebunden wird, während das Wasser verdunstet. An Orten mit geringer Transpiration und entsprechend kleinem Wasserbedarf kann es sich dagegen nicht anreichern. Da die stark transpirierenden Stellen meist eine gesteigerte Stoffwechseltätigkeit zeigen, konnte sich die irrtümliche Auffassung, diese Stellen seien der Entstehungs- und gleichzeitig der Ablagerungsort des Nikotins, welches infolge dieser starken Stoffwechseltätigkeit entstehe, jahrzehntelang behaupten.

Ebenso leicht erklärlich wird die Beobachtung, daß Geizen und Köpfen den Nikotingehalt stark erhöht: Die von der Wurzel gelieferte Nikotinmenge verteilt sich auf eine kleinere Blattfläche, und infolgedessen steigt der Gehalt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Nikotinverteilung in der Pflanze gegeben ist durch die Größe der Transpiration an der betreffenden Stelle.

Die in neuester Zeit von Dawson (1946) postulierte Fermentwirkung, wobei das Nikotin eine ähnliche Funktion wie das als Wirkungsgruppe eines Dehydrasefermentes bekannte Nikotinsäureamid haben soll, erscheint uns im Hinblick auf das Verhalten des Nikotins fragwürdig. Fermente pflegen nur in kleinsten Mengen aufzutreten, während das Nikotin einen beträchtlichen Teil der Trockensubstanz ausmacht. Im weitern können durch Selektion nikotinfreie Tabake erhalten werden. Auch bei den Pfropfungen scheint die An- oder Abwesenheit von Nikotin keinen Einfluß auszuüben. Ferner ist die Verteilung des Nikotins in der Pflanze, weil durch die Transpiration bedingt, mehr oder weniger zufällig. Dieses ganze Verhalten deutet eher auf ein Exkret hin.

Das für die Wurzel wertlose Abfallprodukt wird, weil gut wasserlöslich, vom aufsteigenden Wasserstrom ausgespült und in den oberirdischen Teilen abgelagert, wo es als physiologisch unwirksamer Stoff

liegen bleibt und allen äußeren Einwirkungen gegenüber mehr oder weniger indifferent bleibt.

Das nächste Ziel muß nun sein, nähern Einblick in die Vorgänge in der Wurzel zu erhalten, denen das Nikotin seine Entstehung verdankt.

F. Zusammenfassung

1. Mit l-Prolin, Ornithindihydrochlorid, Asparaginsäure und Nikotinsäure, teilweise mit Zusatz von Urotropin und Glukose gefütterte Tabakblätter zeigten keine Zunahme ihres Nikotingehaltes. Die Methode der Vakuuminfiltration von Blatthälften lieferte einwandfreie Bezugsgrößen und gestattete eine kurze Versuchsdauer.
2. Nikotinsäure bewirkte in relativ kleinen Konzentrationen Welken der Versuchspflanzen.
3. Der Blutungssaft der Tabakpflanze wurde quantitativ auf seinen Nikotingehalt sowie auf den Gehalt an andern Stickstofffraktionen untersucht. Die zeitliche Veränderung des Nikotingehaltes der Blutungssäfte zeigte keine eindeutige Beziehung zu derjenigen der übrigen Stickstofffraktionen, so daß sich keine Schlüsse auf den Bildungsmechanismus des Nikotins ziehen lassen. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß das Nikotin kein Reservestoff ist.
4. An Hand einer Stickstoff- und Nikotinbilanz wurde nachgewiesen, daß die Wurzel höchst wahrscheinlich der alleinige Bildungsort des Nikotins ist.
5. Die Art der Stickstoffernährung beeinflusste den Alkaloidgehalt der Blutungssäfte; Nitrat-N bewirkt starke Erhöhung gegenüber Ammoniak-N.
6. Durch Ringelungsversuche und mit Hilfe von Blutungssäften ent-rindeter Pflanzen wurde bewiesen, daß das Nikotin im Xylem wandert.
7. Chemische Untersuchungen gaben keine Anhaltspunkte für das Vorhandensein von maskiertem Nikotin im Samen.
8. Es wurde ein sehr empfindlicher fluoreszenzoptischer Nikotinnachweis im Gewebe mit Hilfe von Bromcyan-Anilin gefunden, der die Verteilung des Nikotins in den frühesten Keimungsstadien festzustellen gestattete. Dabei ergab sich, daß die Nikotinbildung in zwei Phasen abläuft. Während der ersten Phase bildet es sich überall dort, wo Aleuronkörner abgebaut werden, und es findet sich infolgedessen im ganzen Keimling ziemlich regelmäßig verteilt. Die zweite Phase beginnt, wenn der Keimling zur heterotrophen Ernährung übergeht; dann findet sich das Nikotin hauptsächlich in der Wurzel, von wo es allmählich durch das Xylem des Hypokotyls in die Kotyledonen wandert.

Résumé

Par des expériences de greffe, il est établi que la plante de tabac synthétise sa nicotine non pas dans les feuilles, mais dans la racine. Ainsi un greffon de tabac sur un sujet de tomate fournit des feuilles de tabac sans nicotine, tandis que inversément les feuilles d'un greffon de tomate sur un sujet de tabac contiennent de la nicotine! Le but de ce travail est de déceler la voie de migration de la nicotine dans la plante de tabac. Elle pourrait se faire ou bien dans le phloème, ou bien dans le xylème. L'analyse de la sève saignée par des plantes décapitées démontre que la nicotine monte *avec la sève brute* dans le bois pour arriver dans les feuilles, où elle s'accumule.

Les analyses de nicotine ont été effectuées avec la méthode colorimétrique au cyanure de brome. Par hasard on a découvert que le colorant jaune, formé par la combinaison chimique de la nicotine avec ce réactif, est un beau fluorochrome à forte fluorescence jaune-verdâtre. Cette découverte permet l'observation directe de la migration de la nicotine dans les plantules de tabac au microscope à fluorescence. On peut suivre la formation de la nicotine dans les racines, ainsi que sa migration dans le faisceau central de la racine et dans les traces foliaires de la plantule.

Literaturverzeichnis

- Bernardini, L.: Das Nikotin im Tabak. Atti R. Acad. dei Lincei, Roma, **29**, 1, 62 (1921).
- Brückner, H.: Die Biochemie des Tabaks. Berlin, 1936.
- Chaze, J.: Contribution à l'étude biologique des alcaloïdes du tabac. Ann. Sci. nat. Bot. Série X, **14**, 5 (1932).
- Ciamician, G. und Ravenna, C.: Sur la signification biologique des alcaloïdes dans les plants. C. r. Acad. Sc. CLXXI, 836 (1920).
- Clautriau, G.: Nature et signification des alcaloïdes des végétaux. Recueil Inst. bot. Errera **5**, 1 (1902).
- Cromwell, B. T.: Experiments on the synthesis of hyoscyamin in *Atropa belladonna*. Bioch. J. **31**, 551 (1937).
- Bioch. J. **37**, 717 (1943).
- Dawson, R. F.: Influence of certain amino acids and of nicotinic acid upon the nicotinic content of tobacco leaves. Plant physiol. **14**, 479 (1939).
- Accumulation of nicotine in reciprocal grafts of tomato and tobacco. Amer. J. Bot. **29**, 66 (1942).
- Nicotine synthesis in excised tobacco roots. Amer. J. Bot. **29**, 813 (1942).
- Accumulation of Anabasine in reciprocal grafts of *Nicotiana glauca* and tomato. Amer. J. Bot. **31**, 351 (1944).
- Development of some recent concepts in the physiological chemistry of the tobacco alkaloids. Plant physiol. **21**, 115 (1946).
- Dunstan: Pharm. J. and Trans. **18**, 716 (1887).
- Errera, L., Maistriau et Clautriau, G.: Premières recherches sur la localisation et la signification des alcaloïdes dans les plantes. Rec. Inst. bot. Errera **2**, 147 (1906).
- Frey-Wyßling, A.: Über die Herkunft der sekundären Pflanzenstoffe. Naturw. **26**, 624 (1938).
- Gadamer, J.: Festschrift für A. Tschirch. Leipzig, 1926.
- Gorter, A.: Über die Nikotinbildung bei *Nicotiana* nach der Fütterung mit Prolin. K. Akad. Wetensch. Amsterdam, Proc. Sect. Sci. **39**, 87 (1936).

- Guggenheim, M.: Die biogenen Amine. Basel, 1940.
- Hasegawa, H.: On some experiments in raising a nicotinefree tobacco plant. Bot. Mag. (Tokyo) **51**, 306 (1937).
- Heckel, E.: Sur l'utilisation et la transformation de quelques alcaloïdes dans la graine pendant la germination. C. r. Ac. Sc. CX, 88 (1890).
- Hieke, K.: Pflanzenphysiologische Untersuchungen über die Alkaloide. II. Alkaloidführung der Pfropfpartner bei heteroplastischen Solanaceenpfropfungen. Planta **33**, 185 (1942).
- Hofmeister, W.: Über Spannung, Ausflußmenge und Ausflußgeschwindigkeit von Säften lebender Pflanzen. Flora **45**, 97, 113, 138, 145, 170 (1862).
- Iljin, G.: Die Bildung des Nikotins während der Keimung der Tabaksamen. Bull. 57 of the State Institutes for tobacco investigations Krasnodar (1929).
- Über den Metabolismus des Nikotins in der Tabakpflanze. Bull. 59 State Inst. tob. investig. (1930).
- Abh. Inst. d. Tabakindustrie. Krasnodar UdSSR 104 (1933).
- Bioch. Z. **268**, 253 (1933).
- Kerkis, J. J. und Pigulevskaya, N. N.: C. r. Acad. Sci. URSS, N. S. **32**, 505 (1941).
- Klein, G. und Herndlhofer, E.: Der mikrochemische Nachweis der Alkaloide in der Pflanze. II. Der histochemische Nachweis des Nikotins. Österr. Bot. Z. **76**, 222 (1927).
- und Linser, H.: Zur Bildung der Betaine und Alkaloide in der Pflanze. I. Die Bildung von Stachhydrin und Trigonellin. Z. physiol. Ch. **209**, 75 (1932).
- — dito. II. Stachhydrin und Trigonellin. Planta **19**, 366 (1933).
- dito III. Vorversuche zur Bildung von Nikotin. Planta **20**, 470 (1933).
- Handbuch der Pflanzenanalyse.
- Mothes, K.: Pflanzenphysiologische Untersuchungen über die Alkaloide. I. Das Nikotin im Stoffwechsel der Tabakpflanze. Planta **5**, 563 (1928).
- Die Vakuuminfiltration im Ernährungsversuch. Planta **19**, 117 (1933).
- und Hieke, K.: Die Tabakwurzel als Bildungsstätte des Nikotins. Naturwissensch. **31**, 17 (1943).
- Moshkov, B. S. und Smirnova, M. J.: Pfropfung als Mittel zur Beeinflussung des Alkaloidgehaltes von Pflanzen. C. r. Acad. Sci. URSS, N. S. **24**, 88 (1939).
- Pfyll, B. und Schmidt, O.: Z. f. Unters. d. Lebensm. **54**, 60 (1927).
- Pictet, A.: Über die Bildungsweise der Alkaloide in den Pflanzen. Arch. f. Pharm. **244**, 389 (1906).
- Raoul, Y.: Evolution de l'hordénine dans l'orge et relations éventuelles de cet alcaloïde avec la tyrosine. C. r. Acad. Sc. Paris **205**, 74 (1937).
- Robinson, R.: A Theory of the Mechanism of the Phytochemical Synthesis of certain Alkaloids. J. chem. Soc. **111**, 876 (1917).
- Schmuck, A., Kostoff, D. und Borozdina, A.: Alteration in the alkaloid composition due to influence of stock upon scion in Nicotiana. C. r. Acad. Sci. URSS **25**, 477 (1939).
- Smirnow, A. und Iljin, G.: Formation of nicotine in plants grafted on tobacco. C. r. Acad. Sci. URSS **32**, 365 (1941).
- Smirnow, A.: Die Biochemie des Tabaks. Den Haag, 1940.
- Trier, G.: Über einfache Pflanzenbasen usw., 1912.
- Tschirch, A.: Handbuch der Pharmakognosie III, 1923.
- Vickery, H. B.: Chemical investigations of the tobacco plant. III. Tobacco seeds. Connecticut Agri. Expt. Sta. Bull. **339**, 637 (1932).
- Went, F. W.: Plant growth under controlled conditions. III. Correlation between various physiological processes and growth in the tomato plant. Amer. J. Bot. **31**, 597 (1944).
- White, P. R.: Root pressure, an unappreciated force in sap movement. Amer. J. Bot. **25**, 223 (1938).
- Winterstein-Trier: Die Alkaloide. II. Aufl. (1931), S. 861 ff.