

# DER ZÜCHTER

24. BAND

1954

HEFT 11/12

(Aus dem Institut für Pflanzenzüchtung Quedlinburg der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften.)

## Über ein papierchromatographisches Verfahren für Serienuntersuchungen in der Pflanzenzüchtung\*.

Von WERNER MATTHIAS.

Mit 5 Textabbildungen.

Eine der wichtigsten Aufgaben der praktischen Pflanzenzüchtung ist die Qualitätssteigerung. Das bedeutet für die Gemüsezüchtung eine Steigerung der Qualität in bezug auf Art und Menge an biologisch wichtigen Inhaltsstoffen, die für die Ernährung und Gesunderhaltung bzw. Leistungssteigerung des menschlichen Organismus von hervorragender Bedeutung sind; entsprechendes gilt bei Futterpflanzen für den tierischen Organismus. Bei Heil- und Gewürzpflanzen besteht die Aufgabe darin, Pflanzen zu züchten, die neben einer gesteigerten Massenausbeute einen möglichst hohen Gehalt an wertvollen Wirkstoffen aufweisen.

Maßstab für die Analyse der Pflanzen ist die Art und Menge ihrer Wertstoffe, wie Aminosäuren, Zucker, Vitamine, ätherische Öle, organische Säuren, Alkalioide usw.

Die üblichen Methoden zur Bestimmung von Pflanzeninhaltsstoffen sind nur selten für die Pflanzenzüchtung geeignet. Ein chemisch analytisches Verfahren ist im allgemeinen für die Pflanzenzüchtung erst dann von speziellem Wert, wenn diese Methode die Möglichkeit bietet, Serienbestimmungen durchzuführen. Darüber hinaus müssen diese Serienmethoden häufig, besonders wenn es sich um die Auslese von Einzelpflanzen handelt, im Halbmikro- bzw. Mikromäßigbar durchführbar sein. Außerdem ist es für die Pflanzenzüchtung sehr häufig erforderlich, nicht nur die Gesamtmenge z. B. an Zuckern und Alkaloiden zu bestimmen, sondern die absolute bzw. relative Menge der einzelnen Komponenten.

Alle diese besonderen Voraussetzungen bei der analytischen Verarbeitung von Zuchtmaterial gestattet es bisher in den seltensten Fällen, übliche chemische Verfahren einfach zu übernehmen. Für den Nachweis und die Bestimmung einer Reihe der obengenannten wichtigen Pflanzeninhaltsstoffe eröffnet die Papierchromatographie neue analytische Möglichkeiten.

Das moderne Verfahren der Papierchromatographie, das auf die Arbeiten von CONSDEN, GORDON und MARTIN aus dem Jahre 1944 zurückgeht, hat sich in nur wenigen Jahren zu einem wertvollen analytischen Hilfsmittel entwickelt, und es gibt sogar viele Gebiete der Chemie, für die heute eine Weiterentwicklung ohne die Anwendung der Papierchromatographie praktisch nicht möglich ist.

Die Forschung in der Eiweißchemie z. B., die nach den bahnbrechenden Arbeiten von EMIL FISCHER und

seinen Mitarbeitern um die Jahrhundertwende in eine Phase der Stagnation getreten war, konnte durch die Anwendung papierchromatographischer Methoden erheblich aktiviert werden, ebenso wie die Forschung auf dem Gebiete der Zuckerchemie. Auch bei Untersuchungen von organischen Säuren, von Naturfarbstoffen, Alkaloiden, Glykosiden, ganz allgemein bei Untersuchungen auf dem Gebiete der Biochemie und Pharmazie konnten durch die Papierchromatographie erhebliche Fortschritte erzielt werden.

Der besondere Wert der Papierchromatographie für die Pflanzenzüchtung und ihr Vorzug anderen Methoden gegenüber liegt einmal darin, daß sie als ausgesprochene Mikromethode mit kleinsten Mengen von zu untersuchendem Material auskommt und mit geringstem Aufwand an Chemikalien, apparativen Hilfsmitteln und Hilfskräften durchgeführt werden kann.

Zum anderen gestattet die Papierchromatographie den gleichzeitigen Nachweis von chemisch sehr ähnlichen Stoffen, die bisher nebeneinander nur außerordentlich schwierig und dann nur unter Verwendung sehr großer Ausgangsmengen nachweisbar waren oder aber sogar außerhalb der Möglichkeit einer analytischen Erfassung lagen. In der chemischen Pflanzenanalyse hat die Papierchromatographie bei der Lösung zahlreicher pflanzenphysiologischer Probleme und bei der Bestimmung der Inhaltsstoffe von Pflanzen und Pflanzenteilen bereits Hervorragendes geleistet, denn gerade in der Chemie der Pflanzen stehen der Klärung vieler Fragen erhebliche Schwierigkeiten dadurch entgegen, daß ein großer Teil der Pflanzeninhaltsstoffe als Gemisch chemisch sehr nahe verwandter Verbindungen vorliegt.

Schließlich hat für die Pflanzenzüchtung die Papierchromatographie als analytisches Hilfsmittel erst dann einen entscheidenden Wert, wenn es gelingt, den Nachweis von Pflanzeninhaltsstoffen, den besonderen züchterischen Anforderungen entsprechend, serienmäßig durchzuführen.

Da bei den bisherigen Verfahren der Papierchromatographie diese notwendigen Voraussetzungen nicht ohne weiteres gemeinsam gegeben waren, entwickelten wir eine Methode, mit deren Hilfe es möglich ist, papierchromatische Bestimmungen in der Serie vorzunehmen mit der gleichzeitigen Möglichkeit einer quantitativen Auswertung.

Zunächst versuchten wir, die bekannten Techniken der Papierchromatographie als Serienmethode zu verwenden. Das übliche Verfahren der auf- bzw. absteigenden Papierchromatographie — betr. näherer Einzelheiten sei auf die umfassende Monographie

\* Quedlinburger Beiträge zur Züchtungsforschung  
Nr. 20.

von F. CRAMER verwiesen — läßt sich ohne Schwierigkeiten serienmäßig durchführen; die Trennschärfe, die mit dieser Methode erzielt werden kann, ist jedoch verhältnismäßig gering und in vielen Fällen nicht ausreichend.

Die Rundfilterchromatographie (RUTTER, GIRI und Mitarbeiter, ZIMMERMANN und NEHRING) hat demgegenüber einen wesentlich höheren Trenneffekt. Zur Bewältigung größerer Serienuntersuchungen hat sie sich selbst bei Anwendung des Sektorenverfahrens

Flüssigkeitsfront bis etwa 1 cm unter den oberen Rand vorgerückt ist.

Auf den getrockneten Streifen werden die zu bestimmenden Substanzen durch ein spezielles Sprühreagens sichtbar gemacht und erscheinen nach dem Trocknen als konzentrische Kreisbögen der einzelnen Substanzen, die entsprechend den  $R_f$ -Werten parallel zueinander verlaufen.

Für die gleichmäßige Ausbildung der Kreisbögen und die gleichmäßige Konzentrationsverteilung innerhalb

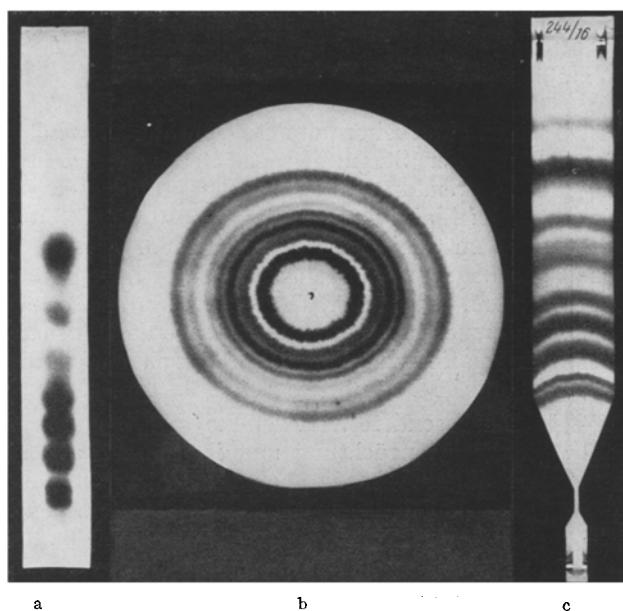


Abb. 1. Lupinen-Eiweißhydrolysat. a) Normales aufsteigendes Papierchromatogramm; b) Rundfilterchromatogramm (neue Methode). Lösungsmittelgemisch: Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1). Papier: Schleicher & Schüll 2043 b.

jedoch als unzweckmäßig erwiesen. Auch ließ sich eine serienmäßige quantitative Auswertung mit beiden Verfahren nur schlecht durchführen.

Es gelang uns nun, die Vorteile beider Verfahren zu vereinen und eine Methode zu entwickeln, die sich durch gute Trennschärfe und leichte Handhabung auszeichnet. Abb. 1.

Für chromatographische Zwecke geeignetes Filtrerpapier wird in Streifen von 28 cm Länge und 4 cm Breite zerlegt, die am unteren Ende, wie aus Abb. 2 ersichtlich, so zugeschnitten bzw. ausgestanzt sind, daß keilförmige Zungen entstehen, die über 2 mm breite Brücken in etwa 10 mm breite Streifen auslaufen. Die zu untersuchenden Lösungen werden im unteren Teil dieser Brücken mit einer Mikromeßpipette, die vorn zu einer dünnen Spitze ausgezogen ist, an der bezeichneten Stelle so aufgetragen (je nach Konzentration der Lösungen einen oder mehrere  $\text{mm}^3$ ), daß die Flüssigkeit etwa den in der Abbildung bezeichneten Raum einnimmt.

Nach dem Eintrocknen der Untersuchungssubstanz werden die Papierstreifen in ein Chromatographiergefäß gebracht, etwa 0,5 cm tief eingetaucht und solange darin belassen, bis die

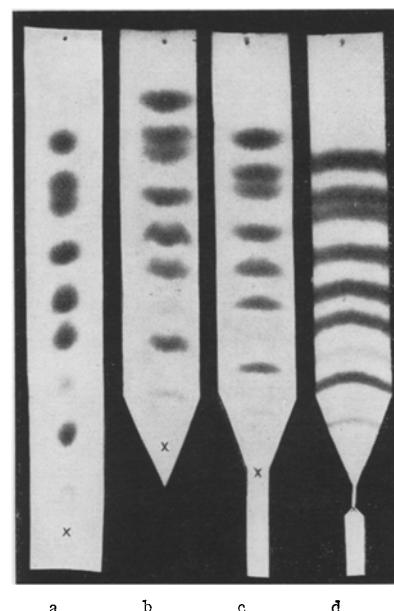


Abb. 3. Chromatogramme eines Aminosäuren-Gemisches auf Papierstreifen von verschiedener Form. x Auftragspunkt. Lösungsmittelgemisch: Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1). Aminosäuren-Gemisch bestehend aus: Cystin, Arginin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin,  $\alpha$ -Aminobuttersäure, Valin, Norvalin, Leucin.

der Kreisbögen ist die Form der Zunge und die Lage des Punktes, an dem die Untersuchungssubstanz aufgetragen wird, von entscheidender Bedeutung. Wie weit sich gerade diese Faktoren auf die Entwicklung der Chromatogramme auswirken, zeigt Abb. 3, in der nebeneinander das gleiche Aminosäuren-gemisch auf Papierstreifen von verschiedener Form und bei verschiedenem Auftragspunkt des Gemisches chromatographisch getrennt wurden.

Abb. 3a zeigt ein Chromatogramm auf einem einfachen rechteckigen Papierstreifen. Die Untersuchungssubstanz wird am unteren Ende des Streifens aufgetragen, und die verschiedenen Bestandteile der Analysensubstanz erscheinen nach dem üblichen Entwicklungs- und Besprühungsvorgang als einzelne, jedoch mehr oder minder ineinander übergreifende Flecken.

Die Chromatogramme der Abb. 3b, c, d sind auf Papierstreifen entwickelt, die nach unten hin in eine keilförmige Zunge auslaufen, wobei bei Abb. 3c die Spitze noch weiter zu einem schmalen Streifen verlängert ist, während Abb. 3d den oben beschriebenen Papierstreifen zeigt, der aus der Zunge heraus über eine schmale Brücke in einen kleinen 1 cm breiten Streifen ausläuft.

Der Auftragspunkt liegt bei Abb. 3b etwas oberhalb der Spitze, bei Abb. 3c auf dem schmalen Streifen und bei Abb. 3d im untersten Punkt der sog. Brücke.

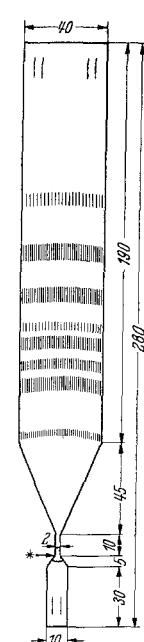


Abb. 2. Form und Abmessungen des Filtrerpapiers zur Streifen-chromatographie. x → Auftragspunkt der Analysensubstanz.

Je nach Streifenform und Lage des Auftragspunktes zeigen die Chromatogramme charakteristische Entwicklungsformen, die vom Flecken, über den in die Breite gegangenen Flecken zu einem mehr oder minder gewellten streifenförmigen Gebilde und schließlich zu klaren, gut voneinander abgegrenzten Streifen führen.

Wenn das aufsteigende Lösungsmittelgemisch den Auftragspunkt erreicht hat, dann ist im Falle der Abb. 3a, b, c der weitere Verlauf so, daß nur Teile des Lösungsmittels mit der Analysensubstanz in Berührung kommen, während andere Teile an den Seiten vorbeiwandern, ohne Substanz zu lösen, oder aber nur die Ränder des Tropfens berühren und sich daher mit weniger Substanz anreichern als die Teile, die die Mitte des Tropfens durchwandern. Durch diese ungleichmäßige Verteilung der Untersuchungssubstanz im Lösungsmittelgemisch können sich keine gut getrennten Kreisbögen bilden, sondern es entstehen flecken- bis streifenförmige unregelmäßige Gebilde.

Im Falle der Abb. 3d wird die aufgetragene Untersuchungssubstanz von dem aufsteigenden Lösungsmittel gleichmäßig aufgenommen, beim Durchlaufen der schmalen Brücke infolge der sich dort besonders stark auswirkenden Faserstruktur des Papiers „homogenisiert“ und daher jenseits der Brücke gleichmäßig kreisbogenförmig verteilt.

Eine serienmäßige Anwendung dieses besonderen papierchromatographischen Streifenverfahrens läßt sich leicht durchführen.

Je 10 Papierstreifen, die oben und unten mit kleinen Einschnitten versehen sind, werden auf einen U-förmigen Glasbügel aufgezogen (s. Abb. 4) und auf einen mit

Das Laufmittelgemisch wird etwa 1 cm hoch auf den Boden des Glasgefäßes gegeben, so daß die Streifen etwa 0,5 cm tief eintauchen können. Zur Einsparung von Flüssigkeit bringen wir etwa 47 cm lange, 1,7 cm breite und 1 cm hoch geschichtete Glasstreifen im Abstand von etwa 1 cm auf den Boden des Chromatographiergefäßes, so daß 10 schmale Rinnen entstehen, in die die Streifen eintauchen. Um ein Verrutschen zu verhindern, werden am Ende jeder

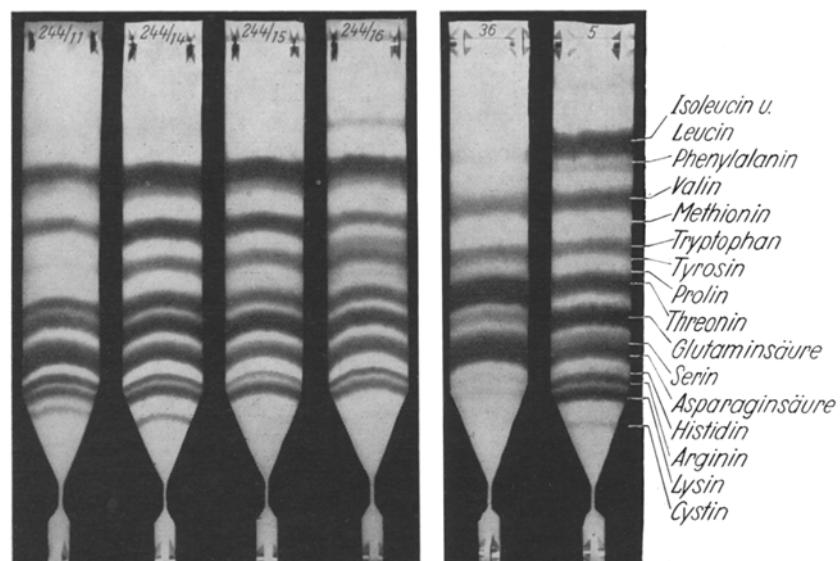


Abb. 5. Streifen-Papierchromatogramme von 6 verschiedenen Eiweißhydrolysaten.  
a) Gelatine, b) Hühnereiweiß, c) Casein, d) Lupineneiweiß, e) Seide, f) Heringsfleisch.  
Lösungsmittelgemisch: Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1). Papier: Schleicher & Schüll 2043 b.  
Faserstruktur des Papiers bei a-d längs, bei e und f quer.

Rille 1 cm breite kurze Glasplättchen schräg zwischen die aufgeschichteten Glasstreifen gestellt.

Das Chromatographiergefäß wird mit einer starken Glasplatte verschlossen, die zur Erzielung einer einwandfreien Abdichtung am oberen Rande des Gefäßes auf Profilgummi oder aufgeschlitzten Gummischlauch aufgelegt wird.

Zum Besprühen, Trocknen und Auswerten werden die Papierstreifen auf den Bügeln belassen.

Zur Erzielung einer möglichst gleichmäßig mit Lösungsmittel gesättigten Atmosphäre innerhalb des Gefäßes werden die Wände mit Filtrerpapier ausgekleidet, das zum Beobachten der Chromatogramme mit kleinen Schaulöchern versehen ist und zu Beginn jeder Versuchsserie mit Lösungsmittelgemisch übergossen wird. Hierdurch und durch das langsame Aufsteigen des Laufmittels, das durch die Form des Papierstreifens bedingt ist, erübriggt sich ein Vorsätzen der Streifen.

Um eine einwandfreie Trennung zu gewährleisten, ist es wichtig, daß auf ein Arbeiten bei konstanter Temperatur geachtet wird. Da die Laufzeit eines Chromatogrammes 20–24 Stunden beträgt, führen die Schwankungen der Zimmertemperatur im Unterschied von Tag und Nacht zu schlecht abgegrenzten Banden, ein Faktor, der besonders während der Heizperiode in den Wintermonaten zu beachten ist.

Konnte bei einmaligem Aufsteigen des Lösungsmittels eine gute Trennung von Substanzen mit kleinen  $R_f$ -Wert-Unterschieden nicht erreicht werden, so läßt man zweckmäßigerweise das Lösungsmittelgemisch zweimal oder gar dreimal aufsteigen.

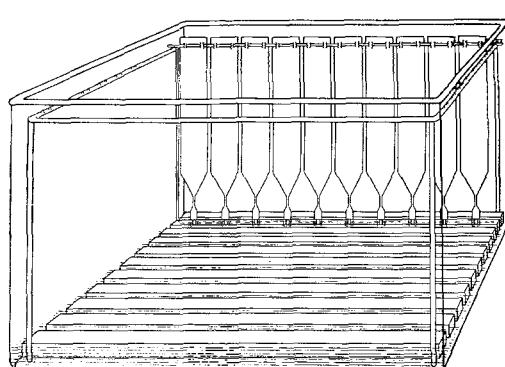


Abb. 4. Chromatographiergefäß für Serienuntersuchungen nach der Streifen-Papierchromatographie-Methode.

4 Füßen versehenen rechteckigen Glasrahmen (Höhe etwa 27 cm) gehängt, der in einem als Chromatographiergefäß dienenden Glas-Aquarium mit den Abmessungen 48 × 29 × 29 cm steht. Es können bis zu 10 dieser Glasbügel in den Rahmen eingehängt werden, so daß also gleichzeitig 100 Chromatogramme entwickelt werden können.

Führt die Farbentwicklung mit einem Sprühreagens nicht zu einer deutlichen Charakterisierung der einzelnen Komponenten, so müssen gegebenenfalls verschiedene Sprühreagenzien verwendet werden. Bei der Aminosäurebestimmung z. B. besteht die Möglichkeit, das Chromatogramm außer mit Ninhydrin, dem gebräuchlichsten Farbreagens für Aminosäuren, zur besseren Sichtbarmachung von Prolin und Oxyprolin mit Isatin zu besprühen. Zu diesem Zwecke werden die einzelnen Streifen in 2 oder mehrere Längsstreifen zerlegt und dann mit den verschiedenen spezifischen Sprühreagenzien behandelt.

In der Pflanzenzüchtung kann die beschriebene Methode zur Bestimmung von Aminosäuren, Zuckern, Alkaloiden, organischen Säuren, Blütenfarbstoffen usw. angewendet werden.

Die gute Trennschärfe der beschriebenen Serienmethode zeigen die nach diesem Verfahren hergestellten Papierchromatogramme verschiedener Eiweißhydrolysate. Abb. 5.

In der Pflanzenzüchtung genügen häufig auch schon qualitative Nachweise bestimmter Inhaltsstoffe. In solchen Fällen wird mit Hilfe einer qualitativen Serienbestimmung eine Vorselektion an einem besonders großen Material vorgenommen. Das wesentlich kleinere eingeengte Material wird dann einer quantitativen Analyse unterzogen.

Zu diesem Zwecke versuchten wir, das oben beschriebene Verfahren noch weiter zu vereinfachen. Große Filtrerpapierbogen wurden am unteren Rande so ausgestanzt, daß 10 keilförmige Zungen entstehen, von denen jede den in Abb. 2 dargestellten Zungen entspricht (vgl. dazu Naturw. 41, 17 (1954) Abb. 1).

Es hat sich aber bei der praktischen Anwendung herausgestellt, daß dieses Verfahren keine Vereinfachung gegenüber den einzelnen auf Glasbügel gezogenen Streifen bietet. Abb. 4.

Für eine quantitative Auswertung der Chromatogramme erweist sich die Streifenmethode besonders geeignet, da sie einerseits ein sauberes Herausschneiden der einzelnen Zonen zur Eluierung und anschließenden photometrischen Bestimmung gestattet und andererseits die Möglichkeit zu einer direktcolorimetrischen Bestimmung bietet, ähnlich dem Verfahren, das GRASSMANN, HANNIG und KNEDEL bei der Papierelektrophorese anwandten.

Hierüber soll in einer weiteren Arbeit berichtet werden.

Für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche danke ich Herrn FROHBURG und Fräulein GÜTSCHE.

#### Literatur.

1. CONSDEN, R., GORDON, A. H. u. MARTIN, A. J. P.: Biochem. J. 38, 224 (1944). — 2. CRAMER, F.: Papierchromatographie. Monographie zur Angew. Chemie 64, 3. Aufl. (1954). — 3. GIRI, KRISHNAMURTHY u. VENKATASUBRAMANIAN: Quantitative determination of amino-acids from proteinhydrolysates by circular paper chromatographie. Current Sci. 21, 11/12 (1952). — 4. MATTIAS, W.: Serienuntersuchungen mit Hilfe einer neuen Form der Streifen-Papierchromatographie. Naturwiss. 41, 17/18 (1954). — 5. NEHRING, K.: Probleme der Eiweißforschung in der Tierernährung. Sitzungsberichte der Dtsch. Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin, Bd. I, Heft 11. — 6. RUTTER, L.: A modified technique in filter paper chromatographie. Nature 161, 435 (1948). — 7. ZIMMERMANN, G. u. NEHRING, K.: Über Ring-Papierchromatographie nach der Tropfmethode. Angew. Chemie 63, 556 (1951).

(Aus dem Institut für Kulturpflanzenforschung der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, in Gatersleben.)

## Das morphologische System der Saaterbsen (*Pisum sativum* L. sens. lat. GOV. ssp. *sativum*).

Von CHR. O. LEHMANN.

Mit 11 Textabbildungen.

Die Bearbeitung des Erbsensorimentes in Gatersleben ergab, daß sich manche Formen anhand der bisherigen Übersichten nicht bestimmen ließen. Die größeren Zusammenstellungen von ALEFELD (1866) und KÖRNICKE (1873) genügten nicht, weil sich die Formenkenntnis inzwischen erweitert hat; ALEFELD hat außerdem eine Anzahl Varietäten nur nach der Blütezeit unterschieden. Im Jahre 1937 gab GOVOROV unter Berücksichtigung des Materials sowjetischer Expeditionen zur Erforschung der Kulturpflanzen (GOVOROV 1928, 1930, 1933) eine Übersicht der Formenmannigfaltigkeit. Aus Gründen, auf die noch eingegangen werden soll, ist aber eine Einordnung von Erbsen unbekannter Herkunft nach seiner Zusammenstellung kaum möglich. Sein System ist also auch nur beschränkt brauchbar. Daher mußte versucht werden, diese Übersichten so zu bearbeiten, daß es möglich wird, die gegenwärtig bekannte Mannigfaltigkeit der Erbsen nach einfachen morphologischen Merkmalen bestimmten Gruppen zuzuordnen. Dabei

wurde gleichzeitig versucht, die Namen den Regeln anzupassen, was verschiedentlich Abweichungen von bisher Gebräuchlichem zur Folge hatte. Leider konnte infolge Schwierigkeiten in der Literaturbeschaffung nicht in allen Fällen die gewünschte Vollständigkeit erreicht werden.

### I. Allgemeine Vorbemerkungen.

Die Übersicht über eine Mannigfaltigkeit erhält man, wenn man diese nach gewissen Merkmalen in Gruppen gliedert und diese nach bestimmten Gesichtspunkten anordnet. Je nach der Zahl der dazu verwendeten Merkmale unterscheidet man verschiedene Systeme.

Die Gruppierung nach einigen, meist morphologischen Merkmalen gestattet eine sichere und schnelle Orientierung. Das sich auf wenige Merkmale gründende System ist künstlich. Dabei sind, je nach der Auswahl der Merkmale, verschiedene Systeme möglich.