

Wageningen 1942

HET CYANOPHORE KARAKTER  
VAN WITTE KLAVER  
(TRIFOLIUM REPENS L.)

D. DE WAAL

NN08201.122

Dit proefschrift met stellingen van

DUCO DE WAAL

Landbouwkundig Ingenieur, geboren te Culemborg den 6en November 1911, is goedgekeurd door de promotoren, Ir H. K. H. A. Mayer Gmelin, hoogleeraar in de landbouwplantenteelt en Dr H. J. C. Tendeloo, buitengewoon hoogleeraar in de scheikunde.

*De Rector Magnificus der Landbouwhoogeschool,*

M. F. VISSER

*Wageningen, 3 Juni 1942*

# HET CYANOPHORE KARAKTER VAN WITTE KLAVER (TRIFOLIUM REPENS L.)

## PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN  
DOCTOR IN DE LANDBOUWKUNDE  
OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS  
IR M. F. VISSER, HOOGLEERAAR IN DE LANDBOUW-  
WERKTUIGEN, DE AFWATERING VAN DEN BODEM  
EN DE POLDERBEMALING, TE VERDEDIGEN TEGEN  
DE BEDENKINGEN VAN EEN COMMISSIE UIT DEN  
SENAAT DER LANDBOUWHOOGESCHOOL TE  
WAGENINGEN OP MAANDAG 6 JULI 1942

TE 15 UUR DOOR

D. DE WAAL



**Aan mijn Vader en Moeder  
Aan Louise**

## INLEIDING

Wanneer men de groote handboeken opslaat, zooals Czapek, Wehmer (1929), Klein (1932) of van Rijn (1931), dan zal men daarin tevergeefs zoeken naar *Trifolium repens* L., de witte klaver, als cyaan-glucosidehoudende plant.

Dit neemt niet weg, dat het reeds sinds de onderzoekingen van Mirande in 1912 bekend is, dat witte klaver behoort tot de planten, waaruit veelvuldig, door bepaalde wijze van behandeling, blauwzuur kan worden vrijgemaakt. Nu zal men in het algemeen, wanneer een plant in staat is HCN af te splitsen, in eerste instantie aan een binding van het HCN in een glucoside denken.

Gortner (1938) drukt dit als volgt uit (pag. 689): „HCN is fairly common among higher plants and occurs, in the majority of cases, combined in glycosides.” „Uncombined HCN has been found in plants in a few instances, but it is extremely rare, and the presence of HCN may be considered as evidence of the presence of a cyanophoric glycoside.” Echter, zoolang nog geen cyaan-glucoside geïsoleerd is uit het betreffende plantenmateriaal, laat staan geïdentificeerd, zoolang zal het juister zijn te spreken van een plant met blauwzuurproduceerend vermogen, dan van een cyaan-glucosidehoudende plant.

In aansluiting op het gebruik van het woord door Gortner (l.c.) en anderen, kan men dan spreken over een cyanophore plant, waaronder wordt verstaan iedere plant, bij welke uit het versche, maar meestal wel al stervende materiaal, door middel van hydrolyse, hetzij door zuren, hetzij door enzymen<sup>1)</sup>, HCN kan worden vrijgemaakt. Men laat dan tot op zekere hoogte in het midden in welken vorm het blauwzuur in de plant voorkomt. Uitdrukkelijk wordt gesproken over hydrolyse; het is toch zeer goed mogelijk, dat bij een krachtiger aantasting van het organische plantenmateriaal dan de hydrolytische, als afbraakproduct HCN wordt gevormd. Het aldus gevormde HCN valt echter buiten de definitie voor een cyanophore plant. Iets dergelijks kan in de praktijk b.v. voorkomen, wanneer men blauwzuur uit plantenmateriaal overdestilleert. Wordt daarbij dit materiaal aan een te sterke verhitting blootgesteld, dan vindt men zeer vaak hogere blauwzuurcijfers.

Witte klaver is cyanophoor. Dit heeft betrekking op een plantensoort,

---

<sup>1)</sup> Spreekt men over glucosiden in het algemeen, dan zal men ook aan andere hydrolyse-middelen moeten denken. Zoo vermeldt van Rijn (1931), dat in sommige gevallen oplossen in warm water reeds voldoende is. Rosenthaler (1932) geeft voor HCN-glucosiden echter alleen genoemde twee aan.

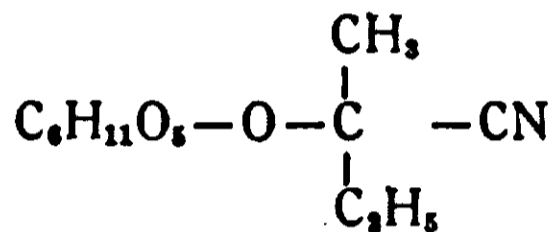
als verzamelbegrip. Het wil echter niet zeggen, dat ieder individu cyanophoor is. Een cyanophore soort kan zoowel sterk cyanophore, acyanophore en zwak cyanophore individuen of vormen omvatten.

De isolatie van het bijbehorende glucoside in witte klaver heeft moeilijkheden opgeleverd, daar het gehalte van de plant aan dit bestanddeel, gezien het lage HCN-gehalte, uiterst gering moet zijn.

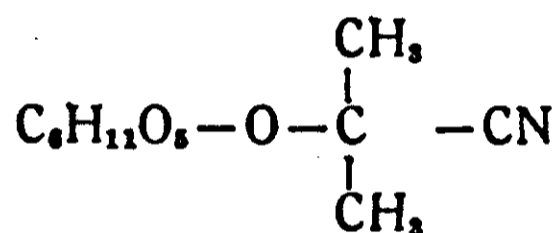
Finnemore en Cooper hebben in 1938 onderzoekingen gepubliceerd, die een goede aanwijzing zijn, dat in witte klaver werkelijk een cyaan-glucoside aanwezig is en welke onderzoekingen ook aangeven in welke richting de samenstelling van dit glucoside moet worden gezocht.

Zij isoleerden uit *Lotus Australis* een verondersteld mengsel van cyaan-glucosiden, van welk mengsel een tot dan onbekend glucoside met de formule  $C_{11}H_{19}O_6N$ , door hen gedoopt lotaustraline, het hoofdbestanddeel uitmaakt.

Lotaustraline:



Het mengsel zou verder bestaan uit homologen, o.a. het reeds veel langer en beter bekende linamarine:



De aanwezigheid van linamarine moet dan verklaren, dat bij afbraak van het glucoside-mengsel steeds kleine hoeveelheden aceton worden gevonden.

Tegelijk met de isolatie van een glucoside uit *Lotus Australis*, werd uit *Trifolium repens* L. een glucoside geïsoleerd, dat uit hoofde van zijn eigenschappen veel overeenkomst vertoont met lotaustraline, iets minder met linamarine. Finnemore en Cooper nemen hierbij geen reacties op aceton waar, waaruit zij concludeeren, dat zij hier vermoedelijk met het zuivere lotaustraline te maken hebben, hoewel zij zelf aangeven, dat andere werkers uit hun laboratorium wel aceton meenden waar te nemen. Zoolang de synthese van lotaustraline niet is uitgevoerd, is geen volledige zekerheid te verkrijgen.

Het cyanophore karakter van *Trifolium repens* L. is eenige malen onderwerp van onderzoekingen geweest.

Vrijwel tegelijk met Mirande, wiens mededeeling werd gedaan in de zitting van 7 October 1912 van de Academie des Sciences, publiceerden

Armstrong, Armstrong en Horton, in een mededeeling aan de Royal Society of London, welke 1 Januari 1913 werd ontvangen, het cyanophore karakter van witte klaver: „Mirande has anticipated us in making known the presence of a cyanophoric glucoside in this plant” (pag. 266).

De Armstrong's en Horton hielden zich in hoofdzaak bezig met enzyme-onderzoekingen. Hoewel dit uitgangspunt bij de bestudeering van vragen betreffende planten-glucosiden minder gebruikelijk is, kan het als volkomen juist worden aanvaard. Gaat men uit van de gedachte, dat men door autolyse, dus door de in het planten-materiaal aanwezige stoffen, i.c. enzymen (hoewel men ook rekening zal moeten houden met de plantenzuren), HCN kan vrij maken uit het planten-materiaal, dan zal daarvoor aanwezig moeten zijn: 1e een glucoside en 2e een glucoside-splitsend enzyme, dat op het aanwezige glucoside gespecialiseerd is.

Er zijn dus verschillende combinaties mogelijk: 1. glucoside en gespecialiseerd enzyme zijn beide aanwezig; 2. het glucoside is alleen aanwezig; 3. beide, glucoside en enzyme zijn afwezig en 4. het enzyme is alleen aanwezig. Tot een cyanophoor gedrag leidt bij autolyse dus alleen het onder 1 genoemde geval, de andere mogelijkheden leiden tot acyanophorie. Licht is men geneigd om cyanophoor en acyanophoor als zelfstandige begrippen tegenover elkaar te stellen; daarbij zal men dan echter goed doen zich steeds te herinneren, dat de acyanophorie het gevolg kan zijn van zeer uiteenlopende mogelijkheden.

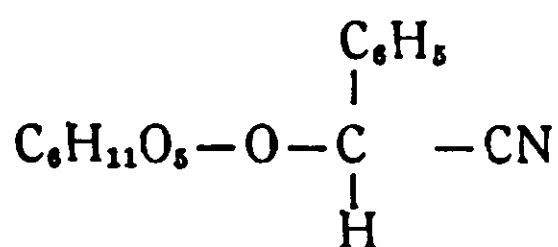
Het geval onder 4 genoemd, nl., dat alleen een glucoside-splitsend enzyme aanwezig is, is niet uitsluitend theoretisch, zooals men allicht geneigd is te denken. Een eenvoudig voorbeeld hiervan is de zoete amandel.

Leemann (1935) noemt verder nog verschillende voorbeelden bij grassen, gevonden door Petrie (1912/1913 New South Wales), o.a. *Anthoxanthum odoratum* en *Poa nemoralis*. In dit verband merkt Leemann op (pag. 111): „Investigations of the kind made by Petrie, establishing the existence of either glycoside and ferment or ferment alone should be encouraged. The grass containing the ferment only may prove dangerous when an animal has been eating another plant containing glycoside alone. A case of that nature has been described by Finnemore (Jour. Coun. Sc. Ind. Res. 4, 1931, 220) where *Acacia Georgina* Bailey Fv. m. containing the glycosidase released prussic acid from *Eremophila maculata* containing the glycoside.”

Terugkomende op de onderzoekingen van de Armstrong's en Horton (1913) valt nog het volgende op te merken. Het door deze auteurs onderzochte aantal gevallen is betrekkelijk gering. Van verschillende witteklaver-stammen werd de enzyme-activiteit nagegaan op salicine, linamarine, amygdaline en prunasine. Het valt op, dat de activiteit van de verschillende klavers — voor zoover dit cijfer werd bepaald aan linamarine naast prunasine, in totaal 5 gevallen — voor prunasine steeds grooter was dan voor linamarine, terwijl, volgens de gegeven structuurformules,

lotaustraline — het voor witte klaver veronderstelde specifieke glucoside — veel dichter bij linamarine dan bij prunasine moet staan.

Prunasine:



De enzyme-activiteit op amygdaline is steeds zeer slecht en geringer dan die op linamarine.

De auteurs zelf merkten op, dat het opvalt, dat de eenige stam gecultiveerde witte klaver, in tegenstelling met de overige wild-verzamelde stammen, practisch géén enzyme-activiteit ontwikkelt, noch op linamarine noch op prunasine. Tevens merkten zij op: „We have not succeeded in finding cyanide in white clover raised from „cultivated” seed at any stage of growth.” „In our experience the wild plant, whenever tested, always contains cyanide; —”

Deze voorloopige ervaring is aanleiding geweest tot een nader onderzoek of het mogelijk is, ten behoeve van Zaadcontrôle-instanties, uit de aan- of afwezigheid van HCN in de jonge zaailingen van witte klaver te concludeeren tot: òf wilde witte klaver òf gecultiveerde witte klaver (Dutch clover).

Pethybridge (1918), Sampson (1919), Findlay en Dower (1927) kwamen na uitvoerige proefnemingen tot de conclusie, dat de grenzen niet zoo scherp getrokken mogen worden; er bleek, dat onder de monsters witte klaver, welke niet wilde witte klaver heetten te zijn, ook HCN-producerende stammen voorkwamen. Sampson (l.c.) vat hetgeen hierover gezegd mag worden vanuit een contrôle-standpunt, aldus samen: „1° A sample purporting to be genuine Wild White but failing to respond to the test should at least be regarded with a considerable amount of suspicion. 2° The fact of a particular sample of White Clover seed giving a positive result to the cyanophoric test is not necessarily a proof that the sample is Wild White.”

Findlay en Dower (l.c.) voegden hieraan nog toe, gezien het feit, dat algemeen wordt aangenomen, dat de zaden van „Ordinary White” groter zijn dan van „Wild White”: „1° If the large and small seeds of a sample of English Wild White both give strong positive reactions it indicates that the sample is True Wild White. 2° (a) If the large seeds of a sample give a weaker reaction than the small seeds it indicates that the sample is either Cultivated Wild White containing a proportion of Ordinary White or a mixture of Ordinary and Wild White. (b) This indication will be strengthened if there is also a large proportion of large seeds in the sample.”

Al deze onderzoekingen werden uitgevoerd met behulp van de kleuring van pikrinezuurpapier door HCN (en andere stoffen! zie Hoofdstuk V),



waarbij een schatting werd gemaakt van de intensiteit van de kleuring, dus semi-quantitatief.

Direct in aansluiting hierop en voortvloeiende uit dezelfde onderzoeken rijst de vraag of het land van herkomst, in verband met de daar voorkomende landrassen, ook van invloed is op het cyanophore karakter van witte klaver. Zoo constateerde Pethybridge (l.c.), dat het juist de Amerikaansche (20 monsters, waarvan 15 cyanophoor) en Canadeesche (2 monsters — beide cyanophoor) witte klaver-monsters waren, die hoewel niet aangegeven als wilde witte klaver, sterk cyanophoor waren. Sampson (l.c.) constateerde het sterk cyanophore karakter van Nieuw-Zeelandsche witte klaver. Engelsche, „Dorset grown Wild White”, Tystofte, Russische, Lodino-, Oostenrijksche en Friesche klaver zijn volgens haar acyanophoor.

Williams had volgens zijn mededeeling in Juli 1939, een publicatie in voorbereiding, welke licht kon brengen op dit punt, maar welke publicatie, waarschijnlijk door den oorlog, ons niet in handen is gekomen. Hij onderzocht meer dan 30.000 planten afkomstig uit verschillende deelen der wereld. De wilde vormen inheemsch in Centraal- en Oost-Europa waren bijna geheel acyanophoor. Grootbladige wilde vormen uit West-Frankrijk waren sterk cyanophoor. Niettegenstaande bovengenoemde twee Canadeesche monsters stellen wij hier ter gedachtebepaling de vraag, of misschien de herkomst van cyanophore witte klaver ook samengaat met een zacht klimaat, met name met een niet te lage wintertemperatuur.

In dit verband dient men niet te vergeten, dat witte klaver in verschillende streken der aarde niet inheemsch is, maar later werd ingevoerd (b.v. Noord-Amerika, Australië en Nieuw-Zeeland).

Deze eerste onderzoeken brachten verder aan het licht, dat binnen een bepaald monster witte klaver, de planten individueel zeer sterk, wat hun cyanophore karakter betreft, varieeren, zoodat de hoeveelheid HCN, die een bepaald monster produceert, sterk beïnvloed wordt door de samenstelling van dit „mengsel” van cyanophore en acyanophore planten. Ter illustratie dienen eenige cijfers, die Williams (l.c.) noemt betreffende Engelsche wilde witte klaver (welke dus zoo algemeen cyanophoor zou zijn!); typen zijn daarin gevonden met 98% cyanophore planten, maar ook typen met slechts 3% van deze.

In de laatste jaren is het cyanophore karakter opnieuw voor een praktische toepassing ter sprake gekomen, waartoe de vroegere literatuur eveneens reeds den weg had gewezen. Pethybridge (l.c.) zegt: „From the experiments carried out up to the present there would not seem to be any connexion between the phenomenon of cyanophorism in white clover and the degree of permanency of the plant.” „The matter, however, deserves further study.” Sampson (l.c.) komt al iets verder: „These considerations would seem to have a practical application and suggest: — (1) a strong

implication that cyanophoric plants have a potential capacity to persist; — (5) farmers desiring Wild White Clover for long duration leys and for permanent grass would be well advised only to accept samples guaranteed to react strongly to the cyanophoric test." Findlay en Dower (l.c.) noemen als hun derde resultaat: „Regarding the plants themselves, when sown in rows alone or in a field as part of a seed mixture the following results were observed: — (a) Samples of English seed that gave a strong reaction did well. (b) Samples of seed that gave a negative reaction were failures. (c) Samples of Cultivated Wild White that gave a moderate reaction gave a moderate result.”

Hierbij heeft men dus verband trachten te leggen tusschen het positief of negatief cyanophoor karakter van bepaalde witte-klaver-stammen en de meerdere of mindere cultuurwaarde van die stammen. De meerdere of mindere cultuurwaarde vindt dan vooral haar uitdrukking in een grootere geschiktheid van de betreffende stammen om zich gedurende vele jaren in een bestand te handhaven, welke eigenschap o.a. een langen levensduur vereischt. Vooral de laatste twee auteurs hebben daarbij de meerdere of mindere waarde van een stam los gemaakt van de onderscheiding: wilde witte klaver en gecultiveerde witte klaver en haar overgebracht op cyanophore en acyanophore witte klaver.

Dit onderzoek is verder consequent uitgewerkt door Doak (1932, 1933, 1935) in Nieuw-Zeeland.

Voor den landbouw in Nieuw-Zeeland is witte klaver een belangrijk gewas. Er is dan ook een niet onbelangrijke teelt van (gras- en) klaverzaad, van welk zaad in de laatste jaren een steeds groeiende export naar Australië, Amerika en Engeland plaats had. In Tabel 1 zijn eenige cijfers, welke hierop betrekking hebben, weergegeven (overgenomen uit het New Zealand Official Yearbook).

TABEL 1

*Oppervlakte in ha, gedurende de jaren 1929—1938, in Nieuw-Zeeland bestemd voor: 1e akkerbouw (waaronder begrepen gras en klavers bestemd voor hooi en ensilage); 2e gras- en klaverzaadwinning; 3e witte-klaverzaadwinning*

	akkerbouw 1000 ha	waarvan	gras- en klaver- zaden ha	waarvan	zaad van witte klaver ha
1929—1930 . . . . .	714		27076		1503
1930—1931 . . . . .	784		36120		1352
1931—1932 . . . . .	793		29800		981
1932—1933 . . . . .	888		55064		1766
1933—1934 . . . . .	836		37804		2713
1934—1935 . . . . .	803		54243		4168
1935—1936 . . . . .	847		54434		2667
1936—1937 . . . . .	777		39114		3741
1937—1938 . . . . .	723		32612		1944

De oppervlakte bezet met witte klaver voor zaadwinning is t.o.v. het totaal voor akkerbouw gebruikte land slechts klein. Wanneer men de gewassen echter rangschikt naar de door hen ingenomen oppervlakte, dan komen gras- en klaverzaden reeds op de zesde plaats: 1° gras en klaver voor hooi en ensilage  $\pm 25\%$ ; 2° knollen 20–25% (voor 1934 stonden de knollen op de eerste plaats); 3° haver  $\pm 16\%$ ; 4° tarwe  $\pm 11\%$  (voor 1934  $\pm 14\%$ ); 5° groenvoedergewassen  $\pm 10\%$  (nam in de laatste jaren toe tot 12%); 6° gras- en klaverzaad  $\pm 5\%$ . Deze zaadteelt is in hoofdzaak — voor  $\pm 85\%$  — geconcentreerd in de districten Canterbury, Southland en Otago op het Zuidelijke eiland. Uit de opgesomde akkerbouwproducten blijkt wel zeer duidelijk, hoe sterk de geheele landbouw van Nieuw-Zeeland is ingesteld op de veeteelt. Wij voegen hier nog aan toe, dat de oppervlakte bestemd voor akkerbouw nog weer in het niet valt, vergeleken bij de oppervlakte in beslag genomen door natuurlijke en in cultuur zijnde weidelanden. Witte-klaver-zaad werd gewonnen van klaverlanden, die na verloop van meer of minder jaren daarvoor bij uitstek geschikt leken, dus niet van land, dat reeds bij den uitzaai speciaal voor de zaadwinning bestemd was. In 1927, toen in Nieuw-Zeeland nog geen keuring voor witte-klaver-zaad bestond, zegt Stapledon hierover nog het volgende: „The white clover crop from which seed is harvested in New Zealand is almost invariably a volunteer crop, that is to say, the seed is not deliberately sown for the purpose of producing a saleable crop.” Misschien is in dit laatste sinds de invoering van de keuring wel eenige wijziging gekomen.

Doak heeft het onderzoek van het cyanophore karakter van witte klaver op een andere basis gebracht door het kwalitatief of semi-quantitatief bepalen van het blauwzuur te vervangen door een quantitative bepaling, waardoor binnen de eigenschap „cyanophoor” een verdere gradatie kon worden aangebracht, beter dan tot nu toe semi-quantitatief mogelijk was. Hij (1932) concludeert: „(3) There is considerable correlation between HCN content and type of white clover. (4) The most highly producing and persistent lines are invariably associated with high HCN content while the poorer short-lived types are low in this respect.”

Gebaseerd op dit onderzoek werd in Nieuw-Zeeland bepaald, dat witte klaver, om opgenomen te worden in de twee reeds vroeger ingestelde keuringsklassen voor witte klaver, nl. N.Z. Mother Seed en N.Z. Permanent Pasture, moest voldoen aan bepaalde gehalte-eischen, wat betreft blauwzuur, volgens het volgende schema:

	% HCN in de groene massa
N.Z. Mother Seed .....	0,0070—0,0130
N.Z. Permanent Pasture..	0,0030—0,0070
Rejected for Certification	kleiner dan 0,0030

De gang van zaken bij de keuring in Nieuw-Zeeland is deze geweest, dat men in 1928/1929 begonnen is met het keuren, waarbij als richtlijn gold de ouderdom van het klaverbestand, waarvan het zaad werd gewonnen. In 1931/1932 werd dit systeem gewijzigd in een van keuring naar bepaalde typen, men zie hierover o.a. Davies en Levy (1931) en Levy en Gorman (1933), terwijl in het groeiseizoen 1936/1937 werd overgegaan op de keuring naar bovengenoemden HCN-eisch.

Levy (1932) vestigt in zijn voorwoord op Doak's mededeeling er vooral den nadruk op, dat, dank zij deze methode, het mogelijk is, de binnenkomende klaverzaad-monsters aan het Proefstation (Plant Research Station Palmerston North) in een kort tijdsbestek, enkele maanden, volgens hun productie-eigenschappen te classificeeren en dat vooral voor de grensgevallen, die op het oog veel minder goed zijn te scheiden, deze methode haar beteekenis heeft. Er wordt dus groot belang aan deze publicatie gehecht. En niet ten onrechte, gezien wat Claridge in 1937 opmerkt: „Commencing with the 1936–1937 season an entirely new procedure was adopted in the certification of white-clover seed. It having been proven that use could be made of a chemical test on seedlings to determine type of clover... The result of this alteration has been a remarkable increase in the quantity of seed receiving recognition as certified seed. Whereas in the 1935–1936 season 56000 lb. of seed was accepted under the certification scheme, from January to September of 1937, 460000 lb. of seed was tested and approved as certified. This quantity is greater than the total quantity of seed certified during the previous eight years from the inception of a scheme of certification covering white-clover seed.”

Blijkbaar heeft men in Nieuw-Zeeland voor de practische bepaling op de contrôle-stations, de quantitatieve bepaling van HCN wederom vervangen door de semi-quantitatieve pikrinezuur-kleuring. Althans Foy en Hyde (1937) zeggen: „Since the commencement of the present year (1937) the picric-acid test has been used by the Department of Agriculture as the basis of qualification of white-clover seed for the purposes of certification.” Ook deze auteurs vonden een goede overeenstemming tusschen HCN-gehalte en qualiteitsklasse der witte klaver, bij een onderzoek aan zeer veel monsters.

Deze toepassing ligt geheel op het terrein der plantenveredeling. Terecht merkt Doak (l.c.) op, dat, althans wat Nieuw-Zeeland betreft, hiermede de mogelijkheid van de bepaling van herkomst of onderscheiding van de wilde en gecultiveerde witte klaver definitief van de baan is, daar alle gehalten van hoog tot laag binnen één herkomst, in casu Nieuw-Zeeland, aanwezig bleken te zijn. Hetzelfde geldt voor Amerikaansche witte klavers (zie Rogers en Frykolm, 1937). Dit gaat natuurlijk te zwaarder wegen wanneer in deze richting wordt geselecteerd.

Adams nam reeds in 1926 het cyanophore karakter van witte klaver niet

op onder de onderscheidingskenmerken van wilde witte klaver en gecultiveerde witte klaver; ditmaal echter niet uit hoofde van een te groot aantal positief cyanophoor reagerende gecultiveerde-witte-klaverplanten, maar van een te groot aantal negatief cyanophoor reagerende wilde-witte-klaverplanten.

De twijfel, die Sampson reeds uitte, aan de bewijskracht van de HCN-proef, is dus in den loop der jaren niet verminderd maar veel sterker geworden. Wij meenen te mogen concludeeren, dat deze methode voor de onderscheiding van wilde witte klaver en gecultiveerde witte klaver niet mag worden toegepast.

Helaas was de Tsjechische publicatie van Mostovoj (1937), welke op dit onderwerp betrekking heeft, niet voor ons toegankelijk. Volgens het referaat is ook deze auteur van meening, dat men het cyanophore karakter niet kan gebruiken voor de onderscheiding van wilde- en gecultiveerde witte klaver.

In dit verband willen wij nog wijzen op een uitlating van Gentner, die in 1935 nog schrijft: „Hierbei besagt ein positiver Befund, dass eine Form des wilden Weissklees vorliegt, während bei einem negativen Befund noch nicht bewiesen ist, dass die geprüfte Probe keine wilde Weisskleerasse darstellt.” Deze uitspraak werd reeds door Sampson (l.c.) weerlegd.

Wanneer Robinson in 1937 zegt (pag. 31): „In other words, the cyanophoric test, whilst not in itself absolutely convincing, provides useful data to strengthen or weaken conclusions arrived at from other observations.” — dan rijst de vraag of hij aandacht heeft geschonken aan de Nieuw-Zeelandsche resultaten.

Franck (1940) wijdt eveneens eenige regels aan de blauwzuurproef (pag. 131): „Deze blauwzuurproef is zeer gevoelig en reageert positief bij alle wilde klavers (alhoewel niet elk plantje afzonderlijk de reactie vertoont). Echter kon dit blauwzuur eveneens worden aangetoond bij onderzoek van Amerikaanse en Canadese rassen. Een negatief resultaat, als gevolg van de afwezigheid van blauwzuurhoudende glucosiden, wijst echter op de aanwezigheid van cultuurklaver en afwezigheid van wilde witte klaver.”

Ondanks de algemeene ongeldigheid, is het denkbaar, dat men meent voorloopig voor een bepaald gebied, b.v. Nederland, in verband met de omstandigheden, gebruik te kunnen blijven maken van de blauwzuurproef. Wanneer wij b.v. in Nederland met wilde witte klaver eens zouden bedoelen, de door Franck (l.c. pag. 92) speciaal genoemde witte klaver, welke in het wild groeit op oude weilanden in Kent en op de Cotswold Hills, dan zal deze voor een groot percentage positief reageren in tegenstelling met de overige in Nederland geïmporteerde witte klaver, welke hoofdzakelijk afkomstig is uit Noord- en Oost-Europesche landen, waar men in het algemeen acyanophore witte klaver vindt. De inlandsche klaver zal eveneens meerendeels negatief reageren.

Deze omschrijving van wilde witte klaver is echter uitsluitend een her-

komst-aanduiding en geen botanische omschrijving, dit in tegenstelling met de beteekenis, die gemeenlijk aan „wilde witte klaver” wordt gehecht (zie Hoofdstuk II). De 17de Rassenlijst van het Instituut voor Plantenveredeling zegt hierover „De wilde witte klaver komt algemeen in onze goede oude weilanden voor.” Daar in Nederland een hoog percentage van de wilde witte klaver acyanophoor is, mag dus ook in ons land geen gebruik gemaakt worden van de blauwzuurproef ter onderscheiding van de wilde witte en gecultiveerde witte klaver.

Uit eigen onderzoek (zie Hoofdstuk III) is weliswaar gebleken, dat in Nederland onder de in het wild verzamelde witte klaver ook cyanophore vormen voorkomen. Blijken nu de resultaten van Doak ook elders van toepassing, m.a.w. gaan hoge cultuurwaarde en hoog HCN-gehalte, als algemeene regel, te zamen, dan zal men tenslotte — gelijk in Nieuw-Zeeland — tot keuring op HCN-gehalte terugkeeren, echter op een geheel andere basis.

Toepassing van de blauwzuurproef in Nederland, ter onderscheiding van wilde witte klaver en gecultiveerde witte klaver, meenen wij tenslotte ook nog daarom te moeten afraden, omdat hierdoor steun wordt gegeven aan een onjuiste voorstelling van de beteekenis van het cyanophore karakter van witte klaver, hetgeen niet in het belang is van de verbetering van de witte-klaverteelt, waar deze maatregel juist voor bedoeld is.

In zijn reeds meermalen geciteerde publicatie bezag Williams in hoofdzaak het cyanophore karakter van witte klaver van uit een genetisch oogpunt. Hij komt tot de conclusie, dat cyanophoor/acyanophoor bij witte klaver kan worden voorgesteld door een volgens het meest eenvoudige schema mendelend paar factoren: Ac en ac, waarbij acyanophoor recessief is. Voor de vele trappen van HCN-gehalte, welke tenslotte binnen den factor Ac liggen (Williams werkte semi-quantitatief) suggereert hij: „modifying factors acting as intensifiers or diluents” (l.c. pag. 364). Op de beteekenis van den factor Ac/ac zullen wij nog nader terugkomen, in verband met de vraag of het cyanophore karakter geschikt is voor een genetische beschouwingwijze.

Ten aanzien van de vraag, of het HCN-gehalte ook schadelijk kan zijn voor het vee, werd slechts weinig opgemerkt.

Deze vraag valt te splitsen in verschillende detailvragen, die gedeeltelijk algemeen toxicologisch zijn en gedeeltelijk betrekking hebben op witte klaver.

Zoo in de eerste plaats het quantum HCN of cyanide, dat voor een bepaalde diersoort bij een gift ineens doodelijk is (er zal verschil in specifieke gevoeligheid van de verschillende diersoorten bestaan; overigens berekent men zeer vaak de letale dosis uit een bepaalde hoeveelheid maal het lichaamsgewicht). In de tweede plaats: hoeveel HCN kan onder optimale

omstandigheden uit een bepaald plantenmateriaal worden vrijgemaakt? In de derde plaats: hoeveel wordt bij digestie van het plantenmateriaal door het dier vrijgemaakt; wordt het glucoside wel volledig afgebroken, wordt het HCN wel vrij gelaten of wordt het dadelijk verder verwerkt en/of vastgelegd (thiocyanaten), m.a.w. bereikt het HCN de bloedbaan? In de vierde plaats: hoeveel HCN kan in het dierlijk lichaam ontstaan, in verband met de grootte van een maal — maaginhoud (waarbij te bedenken valt, dat grootte van een maal en maaginhoud bij de huisdieren elkaar niet dekken) —, de snelheid van het eten, de snelheid van digestie? Hierbij mag niet vergeten worden, dat HCN geen chronische vergiftiging oplevert.

Deze vragen zijn alle slechts vaag te beantwoorden, hoewel men anders zou verwachten, gezien de ervaringen, die men opgedaan moet hebben met de vergiftigingen o.a. in Amerika met Sorghum, zooals men weet eveneens een cyaan-glucoside-houdende plant. Gemakkelijker schijnt het enkele van de meer algemeene gegevens hieronder te bespreken bij wat er speciaal over witte klaver bekend is.

Erith (1924) acht het toxicologische gevaar van witte klaver gering. Zij noemt echter twee auteurs (Elliott en Watt) die, de een in 1824 in Carolina, de ander in 1893 in de Himalaya, vergiftigingen door wilde witte klaver rapporteeren; de door deze auteurs opgegeven vergiftigingsverschijnselen worden door haar typisch geacht voor HCN-vergiftiging. De beteekenis van de waarneming van Watt blijkt wel wanneer hij zegt, dat hij: „ — has seen several horses suffer badly and one die; in each case attendants swore it was due to having eaten Wild White Clover.” Met dezen eed staat de oorzaak onomstootelijk vast!

Om te voorkomen, dat iedere ziekte van de huisdieren, optredende na de vervoeding van witte klaver, geweten wordt aan blauwzuur, nemen wij hier de symptomen van blauwzuur-vergiftiging, zooals deze worden opgesomd door Schubel (1939), over: Blauwzuur werkt zeer snel, de dood kan binnen enkele minuten volgen, maar kan ook eerst enkele uren na het waarnemen van de eerste vergiftigingssymptomen intreden. Bij liggende dieren is de kop op zij gedraaid. De pupillen van de oogen zijn verwijd; de oogen tranen sterk. De tong is gedeeltelijk verlamd, de dieren kwijlen zeer sterk. Ooren en pooten zijn koud, de polsslag is niet bemerkbaar. In het laatste stadium zijn de leden verlamd en treedt de dood, na bewusteloosheid, in. Schubel zegt hierbij niets over de bemoeilijkte ademhaling, welke echter mede karakteristiek is (zie Buneya, 1935). Stuiptrekkende bewegingen kunnen in verschillende graden voorkomen.

Speciaal vestigen wij er ook nog de aandacht op, dat trommelzucht, optredende na de vervoeding van jonge en natte klaver, niets met blauwzuur-vergiftiging heeft uit te staan.

Blauwzuur-vergiftiging kan bij spoedig ingrijpen met succes worden behandeld.

Williams (l.c.) vermeldt een door hem genomen voederproef met een

sterk cyanophore Engelsche wilde witte klaver in het jaar 1933, waarbij geen vergiftigingsverschijnselen werden waargenomen. Helaas ontbreken alle nadere bijzonderheden, zooals: proefdier, rantsoen enz. Deze auteur is van meening, dat de HCN-gehalten in witte klaver, zooals die door Doak (1932, 1933, 1935) en Rigg, Askew en Kidson (1934) zijn gevonden, ver uitgaan boven de gehalten, die schadelijk worden geacht voor vee, zoodat een nadere verklaring voor de onschadelijkheid moet worden gegeven. Of deze meening van Williams, dat het HCN-gehalte uit gaat boven de schadelijke grens, niet te betwisten is, zullen wij hieronder nog belichten. Doak (1935) is speciaal nader op deze vraag ingegaan, omdat, wanneer wij het goed begrijpen, de praktijk in Nieuw-Zeeland, na het op den voorgrond schuiven van het HCN-gehalte van witte klaver als keuringseisch, dit punt heeft aangegrepen om daarmee de rol van witte klaver in het bestand als gevaarlijk te kenschetsen, in de eerste plaats gevaarlijk voor de gezondheid van het vee en in de tweede plaats, omdat de smaak van de zuivelproducten zou achteruitgaan. Dit laatste punt wordt door Doak, door middel van een bewijs uit het ongerijmde, nl. dat roode klaver en luzerne, zonder HCN-glucosiden te bevatten, ook de smaak van zuivelproducten in ongunstigen zin kunnen wijzigen, bestreden. Wat betreft den invloed op de gezondheid van het vee vatten wij zijn uitvoerige uiteenzettingen samen: er zijn geen vergiftigingen geconstateerd in de praktijk in Nieuw-Zeeland; welomschreven voederproeven zijn niet genomen.

Rigg et al. (l.c.) citeeren proefnemingen van Hindmarsh, die vond, dat intraperitoneale injecties van 1 mg HCN per 1 lb (= 2,2 mg HCN/kg) lichaamsgewicht voor een schaap doodend waren, terwijl een dergelijke injectie voor het rund zeer vergiftig en bijna doodend was.

Leemann (1935) vermeldt, dat Steyn (1934 Johannesburg) heeft afgeleid uit de tot dan bekende gegevens, dat de letale dosis voor het rund aan vrij HCN bedraagt 2,2 mg per kg lichaamsgewicht intraperitoneaal en voor het schaap 2,2 mg per os. Ook hieruit volgt, de grootere gevoeligheid van het schaap dan van het rund. Er zij opgemerkt, dat men uit de cijfers welke met intraperitoneale injecties zijn verkregen, geen gevolgtrekkingen mag maken voor de waarden bij opname door den mond, dus b.v. bij voeding. Bunyea (1935) bepaalde de letale dosis voor het rund op 2,042 mg HCN per kg lichaamsgewicht en voor het schaap op 2,315 mg, bij toediening van KCN-oplossingen door den mond. Wat betreft het schaap stemmen deze cijfers dus goed overeen; echter wijzen zij, wat betreft de relatieve gevoeligheid van schaap en rund, in andere richting, behoudens afwijking ten gevolge van den verschillende chemischen vorm, waarin het HCN werd toegediend.

Seddon en King kwamen volgens Rigg et al. (l.c.) tot de conclusie, in overeenstemming volgens deze auteurs met de cijfers van Hindmarsh, dat plantenmateriaal met een hooger gehalte aan HCN dan 0,02% gevaarlijk kan zijn voor een schaap. Volgens Rigg et al. kwam Auld ech-



ter tot 0,002%. Berekeningen als deze zijn van zeer betrekkelijke waarde.

Rigg et al. (l.c.) vonden in witte klaver percentages HCN, die varieerden van 0,0016 tot 0,0124%, gemiddeld 0,0045%, welk laatste gehalte zij op grond van de cijfers van Auld en Hindmarsh gevaarlijk achten voor schapen; tegelijkertijd constateeren zij echter, dat vergiftigingen door witte klaver nog nooit zijn waargenomen in Nieuw-Zeeland, in welk land ook deze onderzoekers thuis behooren.

Doak (l.c.) baseert zich geheel op de gegevens van Seddon, zoodat hij bovengenoemde 0,02% HCN in de groene massa als grens noemt of 0,05% in de droge stof. <sup>1)</sup>

Het keuringsschema van Nieuw-Zeeland komt aan deze grens niet toe (N.Z. Cert. Mother Seed: 0,0070—0,0130% HCN in de groene massa).

Zooals wij boven zagen is de hoogste waarde door Rigg et al. (l.c.) gevonden: 0,0124%, terwijl Finnemore en Large (1936) in den Botanischen Tuin te Sydney bij een Nieuw-Zeelandsche klaver een waarde vonden van 0,2% in de droge stof of daarmee corresponderende 0,05% in de groene massa (zie Finnemore en Cooper, 1938); deze laatste waarde is dus hoger dan de grens. Wij zelf vinden voor Nieuw-Zeelandsche klaver in Nederland verbouwd (klonenmateriaal, en *uitsluitend de blaadjes*) waarden die vaak gelegen zijn boven de grens (tot 0,069% in de groene massa!). Men vergete hierbij niet, dat genoemde grens slechts beteekent, dat daar beneden zèker geen vergiftiging kan optreden, terwijl zij daarboven kan optreden, maar niet behoeft op te treden.

Het is duidelijk, dat uit al deze cijfers geen definitieve conclusies te trekken zijn.

Samenvattend kunnen wij vaststellen, dat geen enkel vergiftigingsgeval door cyanophore witte klaver uit de praktijk bekend is. Dit is zeer belangrijk, daar men zich dus bij een selectie van witte klaver op zijn cyanophore eigenschappen niet hoeft te laten weerhouden door angst voor mogelijke vergiftigingen en daarmee gepaard gaande onbruikbaarheid van het geselecteerde product. De praktijk zal toch licht geneigd zijn, gezien de ervaring van Doak in Nieuw-Zeeland, om zeer sceptisch te staan tegenover een verbetering van witte klaver, waardoor er blauwzuur in komt. Reeds tijdens ons onderzoek is deze overigens begrijpelijke reactie door ons waargenomen. Er kan dus niet voldoende de nadruk worden gelegd op het feit, dat in de praktijk nog nimmer vergiftigingen zijn geconstateerd.

---

<sup>1)</sup> Wanneer de waarden: 0,02% in de groene massa en 0,05% in de droge stof bij elkaar behooren, hetgeen in eerste instantie aannemelijk is, dan beteekent dit een vochtgehalte van het plantenmateriaal van 60% (in New South Wales). Dit is zeer laag. Wij vinden in Nederland regelmatig 78—87% (pag. 48), terwijl Finnemore en Large (1936) in Sydney rekenen met 75% vocht. Het is denkbaar, dat de cijfers niet bij elkaar behooren, en dat men wil aangeven, dat de activiteit van het HCN in groene massa en droge stof ongelijk is. Waarschijnlijk is dit echter niet.

Dat neemt niet weg, dat men bij sterk cyanophore witte klaver dit punt niet uit het oog mag verliezen en dat zoo mogelijk voederproeven moeten worden genomen.

Wij stelden hierboven met het oog op de specifieke gevoeligheid van verschillende diersoorten voor HCN, de vraag: welk proefdier is gebruikt? In dit verband is de opmerking van Doak (1935) opmerkelijk, dat schapen en runderen, wanneer zij kunnen kiezen op een veld tusschen witte klaver met een hoog en met een laag HCN-gehalte, de voorkeur geven aan de stammen met een hoog gehalte, maar dat slak en konijn blijkbaar de stammen met een laag gehalte prefereren.

In tegenstelling tot de gedachte aan vergiftiging, heeft men ook wel een zekere stimuleerende werking toegedacht aan kleine hoeveelheden cyaanglucosiden. Hiervan uitgaande heeft Ware (1925) „vetweiden” en „niet-vetweiden” met elkaar vergeleken t.a.v. het HCN-gehalte der witte klaver, echter zonder resultaat.

Eén stap verder en men denkt aan geneeskrachtige werking. Bij de teelt van geneeskruiden, voor zoover het cyanophore of glucoside-houdende planten zijn, rijzen vragen, volkomen parallel aan die bij witte klaver en de andere cyanophore voedergewassen, zooals b.v. *Sorghum* spp. De factoren, die het HCN-gehalte in al deze gewassen bepalen, zijn tot nu toe onvoldoende bekend.

Wij herinneren er aan, dat witte klaver tot de geneeskruiden behoort (de Graaff, 1938); het blad vindt toepassing. Verzameling in het wild heeft o.a. in het Noord-Oosten van Polen plaats (Muszyński, 1936).

Het is ons niet bekend, dat het cyanophore karakter van witte klaver reeds eerder in Nederland onderwerp van onderzoek uitmaakte. Het Proefstation voor Zaadcontrôle heeft slechts zeer sporadisch aandacht aan de desbetreffende methode geschonken. Reeds in 1926 heeft Franck haar vermeld.

Evenzoo valt het op, dat geen Duitsche literatuur over dit onderwerp kon worden gevonden. Becker-Dillingen (1929) vermeldt het cyanophore karakter van witte klaver en voegt daaraan toe (pag. 344): „Jedoch ist die Menge des Giftstoffes stets so gering, dasz eine schädliche Wirkung nicht zu befürchten und auch noch nicht beobachtet worden ist.”

Dit ontbreken van Duitsche literatuur zal wel in verband moeten worden gebracht met het feit, door Williams (1939) vermeld, dat de inheemsche klaver van Centraal- en Oost-Europa vrijwel volledig acyanophoor is.

Witte klaver is een zeer belangrijke Nederlandsche weideplant. De gecultiveerde witte klaver draagt nog steeds den naam „Dutch clover”! Volgens de verschillende onderzoekingen is echter het gehalte aan HCN in „Dutch clover” (men moet hierbij echter niet meer uitsluitend aan een herkomst-aanduiding denken) zeer laag, zoodat Dutch clover, volgens

Doak (1932), in Nieuw-Zeeland geen certificaat kon verwerven (rejected for Certification: Dutch clover — 0,0005% HCN en New Zealand Dutch clover 0,0010–0,0030% HCN). Dit lot deelde zij, althans eenigszins, met de zoo goed bekend staande Kentish Wild White Clover, welke met moeite de Permanent Pasture-klasse wist te bereiken.

De vraag naar een witte klaver, die zich vele jaren weet te handhaven, is voor ons land, mede naar ons bleek voor de Zuiderzee-inpolderingen, van groot belang. Het is dus alleszins gerechtvaardigd aandacht te schenken aan de onderzoekingen, die een correlatie meenen te hebben vastgesteld tusschen een langen levensduur en het cyanophore karakter van witte klaver, wanneer wordt vastgesteld, dat de witte klaver in Nederland niet uitsluitend acyanophoor is.

Al deze punten te zamen, met hun mogelijkheden naar vele kanten, waren voor ons aanleiding het cyanophore karakter van witte klaver (*Trifolium repens* L.) aan een nadere beschouwing te onderwerpen.

## HOOFDSTUK I

### GEVOLGDE WERKWIJZE TER BEPALING VAN HET BLAUWZUUR IN HET PLANTENMATERIAAL

De bepaling van HCN in plantenmateriaal valt uiteen in twee afzonderlijke vragen, nl.: 1° hoe wordt het HCN uit het plantenmateriaal vrij gemaakt en 2° hoe wordt het vrij gemaakte HCN bepaald?

Doak (1932) behandelde het plantenmateriaal op de volgende wijze om het HCN vrij te maken: een monster van de te onderzoeken witte klaver werd genomen door op verschillende plaatsen handenvol bladen en stelen af te plukken. Direct daarna werd dit monster goed gemengd en 100 g afgewogen; deze hoeveelheid werd fijn gesneden en met 200 cm<sup>3</sup> gedestilleerd water in een kolf gebracht, waarna deze werd gesloten en gedurende twee nachten bij 35° C geplaatst; vervolgens werd het blauwzuur overgedestilleerd met behulp van stoom.

Askew (1934) belichtte de bepalingsmethodiek van blauwzuur in witte klaver vrij uitvoerig. De destillatie voerde hij zonder stoom uit; gebruik werd gemaakt van een dip-allonge, welke uitmondde in NaOH. Ongeveer 200 cm<sup>3</sup> werden overgedestilleerd. Het destilleeren zonder stoom is eveneens volgens Rosenthaler (1932) volkomen geoorloofd, zoodat ook wij zonder stoom destilleerden.

Doak (1932) digereerde twee nachten bij 35° C. Askew (1934) komt na een aantal proefnemingen tot de conclusie, dat 20 uur bij kamertemperatuur reeds voldoende is om de maximum hoeveelheid HCN uit het materiaal vrij te maken. In dat geval heeft het echter geenerlei voordeel om langer te digereeren, daar dan vaak weer lagere HCN-gehalten worden waargenomen, waarbij men aanneemt, dat het organische materiaal het blauwzuur sorbeert. Cijfers hierover zijn o.a. bij Askew (l.c.) te vinden, tegelijk met gegevens verkregen aan materiaal, dat bij 45° C en 60° C was gedigereerd. De laatste temperatuur gaf onvoldoende resultaten. Het optimum voor de enzymatische werking moet in dat geval reeds lang overschreden zijn; men nadert de letale temperatuur.

Na een enkele proef in het begin van ons onderzoek kwamen wij er reeds spoedig toe, de monsters één nacht te digereeren in een thermostaat bij 30° C. Het punt van belang is, dat voor een geheel onderzoek één bepaalde methode wordt gevolgd, hetgeen is geschied; maakt men dan een fout, dan maakt men haar steeds en zijn de cijfers toch onderling vergelijkbaar.

Onze werkwijze komt dus op het volgende neer: Van de te bemonsteren witte klaver worden op verschillende plaatsen handjesvol bladen plus

stelen voor de hand op geplukt, geborgen in een botaniseer-trommel en zoo spoedig mogelijk overgebracht naar het laboratorium (het Proefterrein 't Laag, waar in 1938 de klavers stonden, is  $\pm 2$  km van het laboratorium verwijderd; in de latere jaren lagen de perceelen klaver in den tuin direct achter het laboratorium), waar het materiaal met een hakselmes op een triplexplaat wordt fijn gehakseld (bij de latere bepalingen werden vóór het hakselen blaadjes en stelen van elkaar geknipt, hetgeen veel tijd vergde). Van het aldus verkregen fijne materiaal (moes) wordt een bepaalde hoeveelheid, meest 100 g dan wel 50 g, in een kookkolf van  $750 \text{ cm}^3$  ingewogen, hieraan  $200 \text{ cm}^3$  water (gedestilleerd water is overbodig) toegevoegd, afgesloten met een rubberstop en gedurende één nacht geplaatst bij  $30^\circ\text{C}$ . Hierna wordt de kolf, met een spathelm, aangesloten op een Liebigschen koeler, nadat eerst nog zoo vlug mogelijk  $\pm 300 \text{ cm}^3$  water zijn toegevoegd. Bij den aanvang van de destillatie worden  $20 \text{ cm}^3$   $0,1 \text{ n}$  NaOH voorgelegd, waarin de dip-allonge uitmondt; de destillatie wordt voortgezet tot  $\pm 250 \text{ cm}^3$  zijn overgedestilleerd.

De toevoeging van water na het digereeren en vóór de destillatie geschiedt, omdat het digereeren niet in een te verdund milieu mag plaats hebben. Wanneer men  $250 \text{ cm}^3$  wil overdestilleeren, moet men echter zeker uitgaan van  $500 \text{ cm}^3$  om een vlotte destillatie te verkrijgen, maar ook moet dit geschieden om te voorkomen, dat het materiaal, waaruit het HCN gedestilleerd moet worden, in te weinig water zou worden opgenomen, waardoor dit organische materiaal zou kunnen gaan ontleden (gevaar voor oververhitting tegen den wand) en mogelijk HCN zou kunnen doen ontstaan. Askew (l.c.) wijst hier o.a. op.

Nu kan men het bezwaar opperen, dat het openen van de kolf, het inbrengen van water (lucht wordt verdreven) en daarna het aansluiten op den koeler, HCN, het zeer vluchtige zuur, verloren zal doen gaan. Askew (l.c.) werkte op dit punt met nog meer kans op verliezen dan wij; bij hem waren nl. de destillatie-kolf en de digestie-kolf niet dezelfde, zoodat hij moest overschenken. Hij kon echter quantitatief geen verliezen constateeren. Smith (1934) wijst in dezelfde richting. Wij mogen dus rustig aannemen, dat ook bij onze wijze van werken geen verliezen optreden. Men moet in dit verband niet uit het oog verliezen, dat wij eigenlijk werken met een zeer verdunde oplossing van HCN in water.

Ziet men de verschillende opvattingen betreffende de te maken fouten bij HCN-bepalingen in plantenmateriaal (b.v. bij Rosenthaler, 1932), dan moeten onze wijze van transport (ongeconserveerd) en daarna het knippen, hakselen en wegen met vrees voor verliezen worden beschouwd. Moet men het materiaal niet fijn knippen boven kokenden alcohol, in den damp van dien alcohol, zoodat iedere snipper direct in de vloeistof valt, om zodoende het glucoside-splitsende enzyme oogenblikkelijk te doden en verliezen aan HCN tegen te gaan? Wij zijn er van overtuigd, dat verliezen gedurende het korte transport en gedurende het scheiden van

blaadjes en stelen, waarbij het bladweefsel nog niet beschadigd wordt, niet optreden; dit zal eventueel alleen het geval zijn gedurende het hakselen. Het wil ons toeschijnen, dat dergelijke beschouwingen juist mogen zijn, wanneer men uitgaat van betrekkelijk weinig materiaal, waarin betrekkelijk veel HCN aanwezig is; voor het in bespreking zijnde onderzoek aan witte klaver, waarbij uitgegaan werd van veel materiaal, waarin betrekkelijk weinig HCN aanwezig is, verliezen zij veel van haar gewicht.

De hier weergegeven wijze van werken werd gevolgd voor de bepalingen neergelegd in Hoofdstuk III en IV, dus daar waar getitreerd werd volgens de methode Liebig-Denigès, om zooveel mogelijk in overeenstemming met de Nieuw-Zeelandsche methoden van onderzoek te zijn. Bij de onderzoekingen neergelegd in Hoofdstuk VI, waarbij uitgegaan werd van kleinere hoeveelheden materiaal, werd verschillende malen van de beschreven werkwijze afgeweken.

In de eerste plaats werd het hakselen achterwege gelaten en hiervoor kwam in de plaats het doden der plantencellen door warmte. Bij deze methode (beschreven door Stekelenburg, 1931) wordt een kolfje met water en blaadjes gedurende 15 minuten in een waterthermostaat op 60 °C gehouden. De cellen worden gedood, het enzyme niet. Enzyme en glucoside kunnen elkaar dan bereiken, evenals na kneuzen of hakselen van het plantenmateriaal. Met deze methode werden goede resultaten verkregen.

In eenige gevallen werden naast HCN ook de in alcohol oplosbare suikers bepaald. Dan werden de blaadjes opgenomen in kokenden alcohol van 96%. Na aldus te zijn gefixeerd werd deze alcohol afgeschonken en het materiaal opgekookt met alcohol van 70–80%, welke bewerking 2 maal herhaald werd. Van de verzamelde alcoholextracten werd, na indampen, het residu opgenomen in water, aangezuurd, het vrijgemaakte HCN afgedestilleerd, waarna het restant verder inverteerde ter bepaling van de in alcohol oplosbare suikers.

De destillaties van deze kleine hoeveelheden HCN hadden niet meer plaats op een open vlam, maar geschieden op een zandbad ter voorkoming van een te sterke verhitting. Als houder van het materiaal werd veelal een vetkolfje van 100 cm<sup>3</sup> gebruikt; deze waren tevens zeer geschikt om in den waterthermostaat onder te worden gedompeld.

In het kort zal in Hoofdstuk VI worden aangeduid, welke methode in een bepaald geval is gevolgd.

De weging der massa als droge stof had in de laatst besproken gevallen meestal na de HCN-destillatie plaats. Werd eveneens nog het koolhydraatgehalte bepaald, dan zijn hierop wel wijzigingen aangebracht, tot zelfs weging na afloop van alle bewerkingen. Men hield dan een soort skelet over. De bijzonderheden zullen ter plaatse worden vermeld. In alle andere gevallen werd een afzonderlijke vochtbepaling verricht.

De suikerbepalingen werden uitgevoerd volgens de Fehling-titratie, methode Schoorl. Het inverteeren geschiedde met 3% HCl gedurende

3 uur op een kokend waterbad. Eenmaal werd fructose bepaald volgens de methode Kruisheer (1926).

Bij het overdestilleeren met dip-allonge werd nogal last ondervonden, vooral bij gebruik van kleine destillatie-apparaten, van het stijgen van de voorgelegde vloeistof in de allonge. Het aanbrengen van ronde bollen in de allonge is daartegen niet toe te passen: de hydrostatische druk blijft dezelfde. Met goed resultaat werd gebruik gemaakt van het volgende. Brengt men door den stop van de destillatie-kolf een capillaire buis, welke in de kolf uitmondt onder het vloeistofoppervlak, dan zal, wanneer er in het destillatie-apparaat onderdruk ontstaat, dus wanneer de vloeistof in de dip-allonge zou stijgen, door de capillaire buis lucht worden aangezogen. Wanneer geen lucht wordt aangezogen, is slechts het vloeistofoppervlak in de capillaire buis in aanraking met de buitenlucht, zoodat eventueele HCN-verliezen minimaal, zoo niet nul, zullen zijn. Het stijgen van de vloeistof in de allonge kan men nu regelen, daar deze stijghoogte gelijk zal zijn aan de capillaire stijghoogte van de buis plus de lengte van de capillaire buis onder het vloeistofoppervlak. Ook het tenietgaan van bepalingen, door het terugslaan bij het uitgaan van de verwarming, wordt hiermede voorkomen.

Omtrent het tweede punt: hoe het vrij gemaakte HCN bepaald wordt, valt hier het volgende op te merken, terwijl in Hoofdstuk V hierop nader wordt ingegaan.

De literatuur over de HCN-bepaling is zeer uitgebreid. Wij beperken ons tot eenige hoofdbronnen en bespreken alleen, wat voor het onderzoek noodzakelijk is.

Op de gebruikelijke wijze kan men de bestaande HCN-bepalingen scheiden in macro- en micro-methoden, terwijl van de macro-methoden dan wederom als onderverdeeling bekend zijn gravimetrische, titrimetrische en colorimetrische varianten. Een goed overzicht vindt men bij Klaassen (1931); daarnaast kan genoemd worden Rosenthaler (1932) en voor de titrimetrische bepalingmethoden Kolthoff (1928, 1917).

De gravimetrische methode, welke berust op de vorming van zilvercyanide, kan hier verder wegens haar omslachtigheid buiten beschouwing blijven. Tevens is zij te weinig gevoelig.

De omslachtigheid van de gravimetrische methode blijft gedeeltelijk bestaan bij die argentometrische werkwijzen, waarbij men het zilvercyanide-neerslag affiltreert, om daarna het niet verbruikte  $\text{AgNO}_3$  terug te titreeren. Doak (1932) heeft bij zijn onderzoekingen van deze terugtitratie gebruik gemaakt (methode Volhard).

Van de titrimetrische bepalingen is de methode Liebig-Denigès de meest algemeen gebruikte. Hoewel meestal gemakshalve ingedeeld bij de argentometrische bepalingen, is haar karakter in werkelijkheid complex-analytisch. In ammoniakaal milieu wordt CN getitreerd met  $\text{AgNO}_3$  onder toevoeging van KJ tot eerste troebeling door AgJ.

Van deze bepaling zegt Rosenthaler (l.c.): „Das bequemste und genaueste Verfahren...” en verder „Die maszanalytische Bestimmung stöszt auf Schwierigkeiten oder wird unmöglich, wenn das Destillat trüb oder braun ist.” Van der Wielen (zie de Graaff, Schoorl en Van der Wielen) merkt op, dat, althans bij Laurierkerswater, lichte troebelingen kunnen worden weggenomen door toevoeging van een weinig alcohol.

Na vergelijking van verschillende wijzen van bepaling kwam men in 1936/1937 in Amerika eveneens tot deze methode (aangeduid als „modified alkaline titration”) als degene, die de beste resultaten gaf. (J. Ass. Off. Agric. Chem. 19, 1936, 94 en Greene en Breazeale, 1937).

Het verbruik van  $\text{AgNO}_3$ , is niet specifiek voor HCN. Dit levert, zoals wij later zullen zien, de noodige moeilijkheden op bij de toepassing. (Kolthoff 1917, Smith 1934).

Deze bepalingmethode werd o.a. door Askew (1934) gebruikt, zoodat zij in eerste instantie ook door ons werd toegepast, om zodoende een zoveel mogelijk gelijke methode met de Nieuw-Zeelandsche onderzoekers te handhaven.

Wij wijzen er hier nog op, dat deze methode in de Nederlandsche Pharmacopee Ed. V wordt voorgeschreven voor de HCN-gehaltebepaling in planten-destillaten, zoals Aqua Laurocerasi.

De gevoeligheid is af te leiden uit: 1 cm<sup>3</sup> 0,02 n  $\text{AgNO}_3$  komt overeen met 1,08 mg HCN.

In Amerika wordt een uitwerking van de Liebig-titratie zeer aanbevolen (Bartholomew en Raby, 1935), waarbij de eerste troebeling photo-electrisch wordt geconstateerd.

Naast deze argentometrische bepaling bestaan jodometrische en bromometrische bepalingwijzen.

De jodometrische is afkomstig van Fordos en Gélis. Hierbij wordt getitreerd tot blijvende geelkleuring (in tegenwoordigheid van Na-bicarbonaat) volgens de reactie:



Amylum kan als indicator slecht worden toegepast (zie Kolthoff (1917), pag. 386 en 387).

Deze methode werd toegepast door Doak (1932). Het verbruik van J is niet specifiek voor HCN, de storingsmogelijkheden zijn dus zeer groot. In planten-destillaten zullen deze storingen zeker optreden. De titratie tot geelkleuring heeft een moeilijk waar te nemen eindpunt. Het voordeel der methode boven die van Liebig-Denigès is, gelijk ook Kolthoff (1928) opmerkt, dat bij titratie met 0,01 n J het viervoudige volume titreervloeistof wordt verbruikt en afgelezen.

De bezwaren tegen deze methode zijn echter dermate groot, dat haar, vooral gezien de bromometrische mogelijkheden, geen verdere aandacht werd geschonken.



Wij bespraken tot hier toe de door de Nieuw-Zeelandsche onderzoekers toegepaste HCN-bepalingen en wij kwamen voor ons eigen onderzoek daarbij tot de conclusie, dat de methode Liebig-Denigès de voorkeur verdient. Deze bepalingwijze werd door ons gevolgd bij de onderzoeken neergelegd in Hoofdstuk III en IV.

Andere mogelijkheden van HCN-bepaling worden besproken in Hoofdstuk V en vinden hun toepassing in Hoofdstuk VI.

## HOOFDSTUK II

### BESCHRIJVING VAN ENKELE IN NEDERLAND UITGEZAAIDE NIEUW-ZEELANDSCHE WITTE KLAVERS EN DAARUIT VOLGENDE BESCHOUWINGEN

Het eerste punt, dat nadere beschouwing verdient, vloeit voort uit het feit, dat tot nu toe geen onderzoekingen over het cyanophore karakter van Nederlandsche witte klaver bekend zijn. Is datgene, wat in de literatuur vermeld staat, direct toe te passen in Nederland? Is het door Nieuw-Zeeland in dit verband opgestelde keuringsschema voor witte klaver ook geldig buiten dit land, meer speciaal ook geldig in Nederland? Of verandert met de groeiplaats ook het gehalte aan HCN met als uiterste: acyanophore witte klaver, zoodat het Nieuw-Zeelandsche keuringsschema slechts relatief is, met dus uitsluitend plaatselijke beteekenis? Deze vraag dient men vooral daarom onder oogen te zien, omdat, zooals wij in de Inleiding zagen, vermoedelijk in heele gebieden (b.v. Centraal- en Oost-Europa) slechts acyanophore witte klaver voorkomt. Omtrent de oorzaak tasten wij nog in het duister.

Kent men voldoende belang toe aan de „natuurlijke selectie”, dan is het standpunt denkbaar, dat in streken, waar de witte klaver inheemsch is en overwegend acyanophoor, men geen aandacht aan de cyanophorie behoeft te schenken. Dit moge juist zijn voor planten geheel vrij van menschelijken invloed, voor planten, die min of meer gesteund worden door den mensch, zal men wel degelijk de mogelijkheden besloten in cyanophorie moeten onderzoeken.

Anderzijds dient men in dit verband niet uit het oog te verliezen, dat witte klaver, zooals wij zagen, in geheele gebieden oorspronkelijk niet voorkomt, maar daar is ingevoerd, o.a. in Nieuw-Zeeland. Dit zou er op kunnen wijzen, dat de Nieuw-Zeelandsche onderzoekingen ook elders, nl. in het gebied van waaruit de witte klaver in Nieuw-Zeeland werd ingevoerd, van toepassing moeten zijn, tenzij men met een in Nieuw-Zeeland verworven eigenschap van witte klaver te maken heeft.

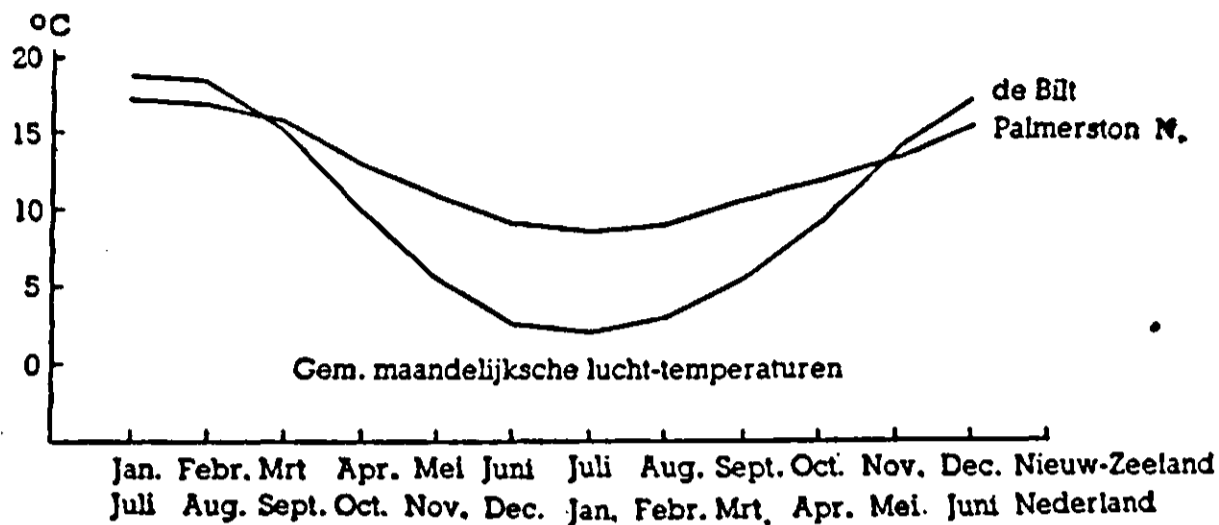
Hierbij kan men aan het klimaat denken.

Wel behooren (om terug te keeren tot ons geval) Nieuw-Zeeland en Nederland tot dezelfde klimaatsklasse van Köppen, nl. Cfb. In groote trekken stemmen de klimaten overeen; zij behooren tot de gematigde ge-

bieden, die vrij zijn van droogte-perioden. Dit neemt niet weg, dat er aanmerkelijke detail-verschillen vallen te constateeren.

Nieuw-Zeeland is, althans met zijn hoofd-eilanden, gelegen tusschen 47° en 34° Z.Br.; Nederland tusschen 50 $\frac{3}{4}$ ° en 53 $\frac{1}{2}$ ° N.Br.

Eenig verschil in licht-klimaat (lichtintensiteit en daglengte), hoewel vooral voor het Zuidelijke eiland niet belangrijk, zal bestaan.



Grafiek 1

De gemiddelde jaarlijksche luchttemperatuur bedraagt voor Nieuw-Zeeland 12,6 °C (Palmerston N.; 1907–1929; Kidson, 1932) en voor Nederland 10,1 °C (De Bilt; 1849–1929; Braak). Beter komt het verschil in temperatuur tot uitdrukking in Grafiek 1, waar de gemiddelde luchttemperaturen voor de maanden zijn uitgezet. Nederland is aanzienlijk kouder en speciaal willen wij hier nog de aandacht vestigen op het veel grotere aantal vorst- en ijsdagen; zie Tabel 2.

TABEL 2 (zie Kidson (1932), Braak)

A. Aantal dagen met een minimum-temperatuur beneden 0 °C

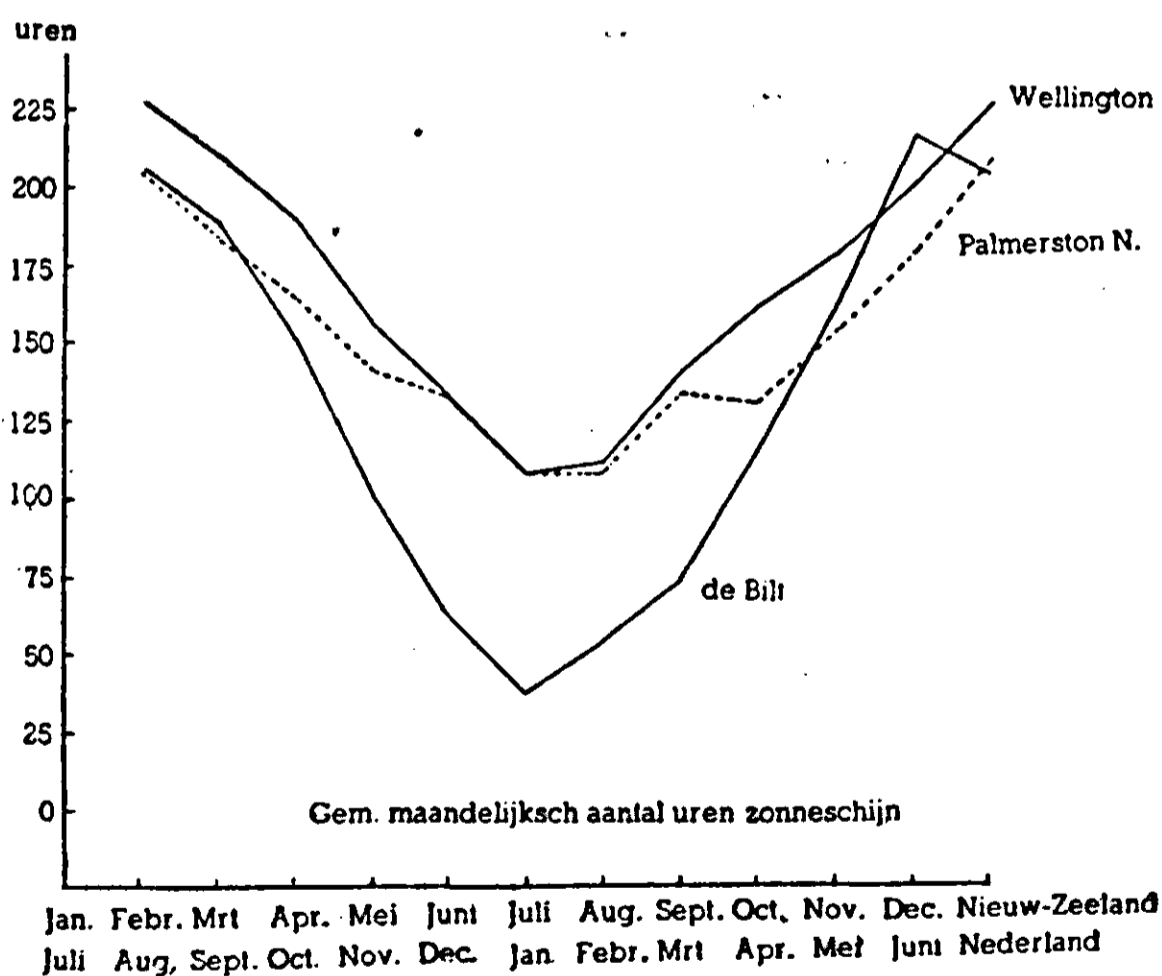
Wellington (1865–1927)		De Bilt (1897–1929)	
Mei . . . . .	0,0	October . . . . .	2,8
Juni . . . . .	0,2	November . . . . .	9,8
Juli . . . . .	0,4	December . . . . .	13,5
Augustus . . . . .	0,4	Januari . . . . .	16,1
September . . . . .	0,0	Februari . . . . .	15,1
October . . . . .	0,0	Maart . . . . .	12,2
Jaar . . . . .	1,0	April . . . . .	4,4
		Mei . . . . .	0,5
		Jaar . . . . .	74,4

B. Aantal dagen met een maximum-temperatuur beneden 0 °C

Nieuw-Zeeland	De Bilt (1897-1929)	
Het laagste max. tot 1932 waargenomen op het Noordelijke eiland was 0 °C op één dag te Taihape op 657 m. Dit station bestaat sinds 1912.	November . . . . .	0,3
	December . . . . .	2,8
	Januari . . . . .	3,7
	Februari . . . . .	1,8
	Maart . . . . .	0,1
	Jaar . . . . .	8,7

De neerslag bedraagt voor Nieuw-Zeeland over het geheele jaar 947 mm (Palmerston N.; over een periode van 29 jaren; Kidson, 1932) tegen Nederland 731,7 mm (De Bilt; 1849-1930; Braak). In Palmerston N. is de regen regelmatig over het geheele jaar verdeeld dan in De Bilt (hoogste en laagste maand-gemiddelden: Palmerston N. 95 mm en 60 mm; De Bilt 84,6 mm en 43,1 mm).

Ten slotte het aantal uren zonneshijn. Dit bedroeg voor Palmerston N. 1848,6 (gemiddelde over 10 jaren; Kidson, 1939) en voor De Bilt 1576,4 (1901-1930; Braak) per jaar. Palmerston N. is een van de waarnemingsstations met het geringste aantal uren zonneshijn. Zoo heeft Wellington 2050 uur per jaar. In Grafiek 2 is het maandelijksche gemiddelde voor alle drie stations weergegeven. Men mag dus wel van verschillen spreken.



Grafiek 2

Wij hebben meest voor Nieuw-Zeeland de gegevens verwerkt betreffende Palmerston N. of het daar dicht bij gelegen Wellington, omdat Doak zijn onderzoekingen aan het Proefstation te Palmerston N. verrichtte. Zoals wij in de Inleiding gezien hebben, wordt het grootste

percentage van het klaverzaad echter gewonnen op het Zuidelijke eiland; dit zegt echter niets omtrent de ligging van de graslanden, waar de klaver gebruikt wordt.

Samenvattend, in verband met de later te bespreken verschijnselen bij witte klaver, vestigen wij hier vooral de aandacht op het grootere aantal zonne-uren en de hoogere temperatuur, speciaal het geringe aantal vorstdagen van Nieuw-Zeeland, vergeleken met Nederland.

Het verschil in klimaat van Nieuw-Zeeland en Nederland laat zich goed illustreeren met de volgende aanhaling uit het New Zealand Official Yearbook 1939: „..., and, from the mildness of the winter season, there are very few places where there is not some growth (van grassen, Schr.) even in the coldest months of the year, enabling cattle to be kept all the year round in the open.”

Twee wegen staan open om de in dit Hoofdstuk behandelde vraag te benaderen, nl. 1. een onderzoek aan uit Nieuw-Zeeland ingevoerde witte klaver van bekende klasse en dus van bekende HCN-gehaltegrenzen; 2. een onderzoek aan Nederlandsche wilde witte klaver.

Einde 1937 stelden wij ons in verbinding met het Plant Research Station te Palmerston N. met het gevolg, dat hetzelfde jaar van den Heer B. W. Doak, Chemist aan genoemd station, zes witte-klaver-zaadmonsters werden ontvangen, waarvan twee behorende tot „Mother Seed”; twee tot „Permanent Pasture” en twee tot „Ordinary uncertified white clover”.

Een gedeelte van het zaad van alle zes monsters werd op 1 April 1938 uitgezaaid op het Proefterrein 't Laag te Wageningen. Het betreft hier een (iets zavelige) zandgrond, gelegen in een uitlooper van de Wagening-sche Eng naar de zgn. Veenendaalsche hei (gebied van oorspronkelijk, hoofdzakelijk natuurlijke, laagveen-graslanden, met een van huis uit overwegende blauwgras-Carex-vegetatie). Het is oud tabaksland, dat sinds 1921 als Proefterrein bij de Afdeeling Landbouwplantenteelt der Landbouwhoogeschool in gebruik is. De grondwaterstand is des winters veelal zeer hoog; zoo werd in den winter 1940/1941 op het laagste gedeelte van dit zwak hellende terrein 20 cm onder het maaiveld grondwater aangetroffen. De pH bedraagt  $\pm 6,0$ . De bemesting is in de laatste twintig jaren steeds rijkelijk geweest, zoowel met kunstmest als af en toe met groenbemesting. Voorjaar 1941 bedroeg b.v. het P-citr.-cijfer meer dan 100.

Grassen voor selectie-doeleinden zijn van 1931 af de voorvruchten voor de witte klaver geweest.

Van ieder monster werd een perceel ter grootte van  $\pm 17 \text{ m}^2$  uitgezaaid.

Op 31 Maart 1938 werd de volgende bemesting gegeven: 100 kg/ha Chili-

salpeter, 300 kg/ha kalizout 40% en 700 kg/ha Thomasslakkenmeel.

In den loop van het voorjaar kwam de klaver op de verschillende perceelen goed op, zoodat in Augustus 1938 met de waarnemingen kon worden begonnen. Reeds spoedig vielen eenige zeer sprekende onderlinge verschillen in het oog.

In de eerste plaats de kleur. De beide „Uncertified” perceelen (onze no's 1 en 2, nl. Nieuw-Zeelandsche no's Ac 2272 en Ac 2273) waren zeer flets lichtgroen; daarentegen waren de beide „Mother Seed”-perceelen (onze no's 5 en 6, nl. Nieuw-Zeelandsche no's Ac 2202 en Ac 2413) zeer donker groen, terwijl de beide „Permanent Pasture”-stammen (onze no's 3 en 4, nl. Nieuw-Zeelandsche no's Ac 2160 en Ac 2268) wat kleur betreft tusschen de beide vorige inlagen. Binnen de klassen zelf was slechts zeer weinig verschil in kleur.

Dit was echter niet het eenige. Ook het aantal bloemhoofdjes gaf een markant beeld. De no's 1 en 2 vertoonden zeer veel bloemen (Uncertified), de no's 5 en 6 (Mother Seed) zeer weinig en de no's 3 en 4 (Permanent Pasture) lagen daar tusschen in. Deze eigenschap hebben wij op 15 Augustus 1938 meer objectief vastgelegd, door van elk der zes gewassen telkens het aantal bloemhoofdjes te tellen op een oppervlak van  $\frac{1}{4}$  m<sup>2</sup>, in driedvoudige herhaling.

TABEL 3

*Aantallen bloemhoofdjes per  $\frac{1}{4}$  m<sup>2</sup> van zes Nieuw-Zeelandsche witte klavers, op 15 Augustus 1938 te Wageningen*

no.	klasse	aantal bloemhoofdjes		
1	Uncertified . . . . .	297	305	320
2	„ . . . . .	259	282	288
3	Permanent Pasture . . . . .	151	199	202
4	„ „ . . . . .	116	142	147
5	Mother Seed . . . . .	33	39	43
6	„ „ . . . . .	28	30	51

Men ziet, dat de cijfers voor de verschillende klassen van een verschillende orde van grootte zijn.

Tenslotte valt op te merken, dat de beide „Mother Seed”-perceelen een weelderigen, malschen indruk maakten, met vooral groot blad, terwijl dit naar de „Uncertified”-perceelen steeds meer terug liep; daar vonden wij een schraal gewas met kleine bladeren. Om ook dit nog eenigszins in cijfers vast te leggen werd op 23 September 1938 van een strook van 2,40 m<sup>2</sup> van ieder perceel de opbrengst bepaald, nl. te velde het groengewicht, waarna de partijen op den zolder van het Laboratorium werden gedroogd en daarna gewogen (dus luchtdroog-gewicht, hetgeen iets anders is dan hooggewicht). Het maaien had plaats toen het gewas behoorlijk

droog was. De resultaten zijn neergelegd in Tabel 4, tegelijk met een zelfstandige beschrijving van het gewas door den Tuinchef van de Afdeling Landbouwplantenteelt H. Driever. Wij vermelden deze cijfers slechts om een indruk te geven, niet als resultaat van een goed aangelegde opbrengstproef, hetgeen duidelijk is, daar b.v. herhalingen ontbreken.

TABEL 4

*Opbrengst in kg van 2,40 m<sup>2</sup> van zes Nieuw-Zeelandsche witte klavers op 23 September 1938 (één snede na voorafgaand „toppen”)*

no.	Beschrijving van het gewas	groen gewicht	droog gewicht	$\frac{\text{drooggew.}}{\text{groengew.}} \times 100$
1	Zeer schriel gewas, zeer veel bloemen	1,610	0,400	24,2
2		1,325	0,405	30,6
3	Forsch gewas, zeer sporadisch bloemen	3,025	0,610	20,2
4		3,380	0,615	18,2
5	Zeer forsch gewas, zeer sporadisch bloemen	3,855	0,715	18,5
6		3,365	0,600	17,8

Het verschil, ook in gewicht uitgedrukt, is groot tusschen de stammen 1 en 2 (Uncertified) en de vier anderen. De stammen 3, 4, 5 en 6 ontlopen elkaar niet veel, al is stam 5 de hoogste in opbrengst en no 3 de laagste. Ook wanneer het drooggewicht uitgedrukt wordt als percentage van het groengewicht, zien wij Uncertified een aparte plaats innemen met een hoog percentage, overeenstemmende met onze aantekening, dat no 5 en 6 vooral malsch en sappig zijn tegenover de no's 1 en 2 meer dor en klein.

De hier beschreven eigenschappen zijn, blijkens Davies en Levy (1931), typisch voor de klasse-typen, waartoe de klavers behooren. Als zoodanig mag aan de zes onderzochte klavers meer waarde worden toegekend dan aan zes „toevallige” witte klavers.

De strenge winter 1938/1939 miste zijn uitwerking op deze klavers niet.

Slechts de no's 2 en 3 bleven in leven. Deze werden op 10 Mei 1939 verplant. Beide zijn voorjaar 1941 nog in leven, alhoewel niet fraai. Op 30 Maart 1939 en 20 April 1940 werden zij bemest met 200 kg kalksalpeter, 300 kg kalizout 40% en 700 kg Thomasslakkenmeel per hectare.

Vooruitlopende op Hoofdstuk III, dient hier te worden vastgesteld, dat bij de bepaling van het HCN-gehalte van deze zes Nieuw-Zeelandsche witte klavers (Augustus 1938) werd gevonden, dat niet de volgorde van opklimmend HCN-gehalte (volgens keuringsschema) 1, 2, 3, 4, 5, 6 was, maar 1, 4, 2, 3, 5, 6.

In aansluiting op deze beschrijving van eenige eigenschappen van het gewas, willen wij het volgende punt onder oogen zien.

In de literatuur betreffende cyanophore planten, zooals b.v. Sorghum, komt men veelal meer of minder duidelijke aanwijzingen tegen, dat vergiftigingen (c.q. hooge HCN-gehalten), vooral voorkomen op gronden met onharmonisch groote stikstofvoorziening, b.v. bij zware stikstofmestgiften op arme gronden. Nu is het verband tusschen de stikstofvoeding en het optreden van HCN-glucosiden reeds vroeger vastgelegd. Zoo gelukte het aan Ravenna en Peli (1907) om in watercultures met kleinere en grootere nitraatgiften in de voedingsoplossing, het HCN-glucosidegehalte van Sorghum te varieeren.

Valt in deze richting voor witte klaver iets op te merken? Dit is ons inziens wel het geval. Juist omtrent de stikstofvoeding is uit den habitus der planten vaak iets af te leiden.

Zooals oorspronkelijk de zes Nieuw-Zeelandsche witte-klaver-stammen volgens de indeeling van Nieuw-Zeeland naast elkaar lagen, kregen wij een zeer sterken positieven indruk van den invloed van de stikstofvoeding. Wanneer men „Mother Seed” stelde tegenover „Uncertified”, met „Permanent Pasture” daar tusschen in als een goede overgangsklasse, dan waren zoowel de donker groene bladkleur, het groote blad, de waterrijkdom en het geringe aantal bloemen van „Mother Seed” een aanwijzing van een krachtige stikstofvoeding. Daarentegen geeft het uitwinteren van de no's 1, 4, 5 en 6 niet zulk een goede overeenstemming. Bij sterke stikstofvoeding mag men een vermindering van kouderesistentie verwachten. In overeenstemming hiermede zijn de no's 5 en 6 uitgewinterd. Verder gaat de vergelijking niet op. Er zij hier aangeteekend ter voorkoming van misverstand, dat de stikstofvoeding slechts een modificeerende factor voor de wintervastheid is.

Dit alles houdt echter geen rekening met de later door ons bepaalde HCN-gehalten, waarbij, zooals opgemerkt, de volgorde der stammen, althans wat betreft de indeeling „Uncertified” en „Permanent Pasture”, werd verstoord. Wel blijft geldig het verschil in gedrag van „Mother Seed” tegenover „Uncertified” en „Permanent Pasture” tezamen.

Plaatst men de klavers in de volgorde 1, 4, 2, 3 en vergelijkt men dan de verschillende waarden in de tabellen gegeven, dan ziet men *binnen de klasse*, gerekend volgens onze HCN-bepalingen, bij hooger HCN-gehalte: minder bloemen, donkerder kleur, hooger opbrengst enz. Bij deze volgorde vertoont het uitwinteren wel regelmaat. In dit geval hecht men dus meer waarde aan de HCN-bepaling dan aan de indeeling door Nieuw-Zeeland gegeven. Het is zeer de vraag of dit gerechtvaardigd is. De voor de HCN-bepaling gebruikte  $\text{AgNO}_3$ -titratie kan gestoord worden (zie Hoofdstuk V) en dan te hooge uitkomsten geven. Hiermede heeft Doak (1938) moeilijkheden ondervonden. HCN-gehalte (volgens de  $\text{AgNO}_3$ -methode bepaald) en witte-klaver-type stemden toen in Nieuw-Zeeland niet overeen, terwijl HCN bepaald volgens een Jodium-methode lagere en meer normale uitkomsten gaf.



Samenvattend kunnen wij zeggen, dat uit het onderzochte materiaal (verkregen uit zaad, geen klonenmateriaal), zwakke aanwijzingen zijn af te leiden, dat hoge HCN-gehalten bij de witte-klover-planten samengaan, beoordeeld aan den habitus van het gewas, met krachtige stikstofvoeding; althans meenen wij, dat het gerechtvaardigd is nadere aandacht aan dit punt te schenken.

Valt in deze richting in de literatuur nog iets op te merken?

Ware (1925) heeft gezocht naar eenige correlatie tusschen het HCN-gehalte en een of ander uiterlijk kenmerk van de witte-klover-plant. In de eerste plaats werden door hem vergeleken 62 verschillende witte-kloverplanten, gegroeid in potten en verkregen van uitloopers, verzameld in het wild in de omgeving van Wye (Cornwales) en afkomstig van verschillende grondsoorten. Hierbij kon hij geen correlatie vaststellen tusschen HCN-gehalte en nervatuur van de bladen, of beharing van bladstelen, bladsteeltjes en bloemstelen. Ten aanzien van groei-habitus, bebladering en bloeidatum werden door hem geen waarnemingen gedaan, uit hoofde van de mogelijke beïnvloeding van deze verschijnselen door de onnatuurlijke cultuur in potten. Van de 62 aldus door hem onderzochte planten waren er 28 acyanophoor.

De bepalingen van het HCN-gehalte (door middel van pikrinezuurpapier) werden op verschillende tijdstippen, verspreid over verschillende jaren, gedaan, dit in tegenstelling met b.v. de onderzoekingen van Pethybridge (1918) of Sampson (1919), waarbij de bepalingen verricht werden aan de eerste blaadjes van zaailingen.

Behalve deze potculturen heeft Ware (l.c.) witte-klover-klonen-veldjes onderzocht van 48 in het wild verzamelde witte-klover-planten. Zes en twintig van de 48 klonen waren acyanophoor. Tusschen eenerzijds HCN-gehalte en anderzijds bloeitijd, bebladering, spreiding en bladgrootte kon door hem geen correlatie worden vastgesteld.

Wij teekenen uit zijn beschrijving aan, dat de door hem ter contrôle geplaatste Dutch-clover-planten volle veertien dagen eerder bloeiden dan de in het wild verzamelde planten. Het valt op, dat door hem ook geen wijziging in het HCN-gehalte, gedurende jaren, kon worden vastgesteld wanneer dezelfde klonen op verschillende grondsoorten werden verbouwd.

Uit de observaties van Findlay en Dower (1927) kan men eenige aanwijzingen met betrekking tot dit punt halen, evenals uit die van Sampson (1919). Volgens Findlay en Dower gaven de monsteis „Ordinary” groote bladen en vleezige stengels, terwijl zij vroeg bloeiden. Die monsters van „Wild White” en „Cultivated Wild White”, welke cyanophoor waren, gaven daarentegen kleine bladen en dunne draadachtige stengels dicht bij den grond. De individueele planten, afkomstig uit b.v. een over het geheel gerekend, cyanophoor gewas, lieten vaak overeenstemming zien tusschen de af- en aanwezigheid van HCN en de

uiterlijke kenmerken van „Ordinary White Clover” en van „Wild White”. Deze auteurs meenen dus wel tot een zeker verband te kunnen besluiten, welk verband in tegenspraak is met het door ons gevondene.

Sampson (l.c.) zegt het volgende: „The evidence of all the tests goes to show, moreover, that cyanophoric individuals appear most freely amongst those plants which have a dense habit of growth whilst plants with broad leaves and long petioles are, as a rule, acyanophoric. It must be emphasised that the tests undertaken were not designed critically to test this point, ....” Sampson gaat dus in de richting van Findlay en Dower.

Het is niet eenvoudig het hier besproken punt aan de hand van deze gegevens goed te benaderen. De volgende overwegingen mogen het echter nader belichten.

In de eerste plaats zal men waarschijnlijk de hier weergegeven waarnemingen en conclusies van Ware, Findlay en Dower, Sampson en van onszelf niet mogen vergelijken. Ware's waarnemingen hadden betrekking op „wilde witte klaver” (vermoedelijk), die van Sampson en Findlay en Dower op vergelijkingen van wilde witte klaver en gecultiveerde witte klaver, terwijl tenslotte onze eigen waarnemingen betrekking hadden op verschillen binnen de gecultiveerde witte klaver, waaronder men de door ons onderzochte Nieuw-Zeelandsche witte klavers zal moeten rangschikken. In schijnbare tegenspraak met dit laatste is de opmerking van Sampson (l.c.) die den nadruk legt op de gelijkheid in groei en habitus van „Wild White Clover” en de door haar onderzochte Nieuw-Zeelandsche witte-klaver-monsters. Dit was echter een goede twintig jaar geleden, in welke jaren er in Nieuw-Zeeland wel het een en ander aan de witte-klaver-zaadteelt is veranderd. Tevens valt het niet aan te nemen, dat er geen variaties bestonden in de Nieuw-Zeelandsche witte klaver. Stapledon merkte in 1927 op: „It has been realized in this country that much of the white clover emanating from New Zealand does, in fact, behave in a manner approximating far more closely to wild white clover than to white Dutch. The various commercial lots, however, behave very differently, an appreciable number giving results almost indistinguishable from those of ordinary commercial white Dutch.” (pag. 243). Twee feiten, door Davies en Levy (1931) genoemd, zijn in dit verband van belang. Deze auteurs beschrijven de standaarden voor N.Z. Mother Seed en N.Z. Permanent Pasture als Type 1: New Zealand *Wild White* no 1 en Type 2: New Zealand *Wild White* no 2<sup>1)</sup>, maar bij de beschrijving van „Ladino White” zeggen zij: „In many ways the Italian Ladino type seems to be related to the large-leaved New Zealand *Wild White* no 1 ...” Dit

---

<sup>1)</sup> certified Mother Seed standard = New Zealand no. 1.

certified Permanent Pasture standard = New Zealand no 2 with some New Zealand no 1.

zie Levy en Gorman (1933).

laatste wordt door eenige anatomische gegevens bevestigd (zie einde van dit Hoofdstuk).

In strikten zin mag men alleen de waarnemingen van Ware en die van onszelf met elkaar vergelijken. Ware had negatieve uitkomsten nl. geen correlatie, in welke richting ook, zoodat de tegenspraak van onze waarnemingen daarmee grootendeels is opgeheven. Deze tegenspraak geldt wel voor de onderzoekingen van Sampson en van Findlay en Dower, in welke beide gevallen twee niet te vergelijken eenheden naast elkaar werden geplaatst.

Voor vergelijking bij Nederlandsche wilde witte klaver verwijzen wij naar het einde van Hoofdstuk III.

De vraag is op haar plaats, waarom wilde witte klaver en gecultiveerde witte klaver beschouwd worden als twee niet te vergelijken eenheden, m.a.w. wat verstaat men onder wilde witte klaver en gecultiveerde witte klaver, twee uitdrukkingen waarmee algemeen steeds gewerkt wordt. Een goede omschrijving van wat men in den landbouw onder „wilde witte klaver” verstaat is niet te vinden. Ten Rodengate Marissen-Eléma (1920) brengt ons direct op botanisch-systematisch terrein door te constateeren (pag. 97): „De gekweekte witte klaver, *Tr. repens* L. cultum Alefeld, lijkt botanisch volkomen op de wildgroeijende plant, *Tr. repens* L. sylvester Alefeld. Alleen is ze in alle deelen veel forscher, daarbij wat korter van levensduur.” Deze indeeling volgens Alefeld is afkomstig uit het jaar 1866. Het is de moeite waard te bezien wat eenige anderen over de systematiek van witte klaver (*Trifolium repens* L.) zeggen.

Wij kozen daarvoor als systematische werken de Synopsis van Ascherson en Graebner en de Flora van Hegi. Het Handboek van Becker-Dillingen (1929) is meer landbouwkundig, terwijl de monographie van Erith (1924) tusschen beide instaat.

Vergelijken wij wat deze auteurs over de verschillen binnen de soort *Trifolium repens* L. opmerken, dan blijkt, dat hun meeningen zeer uiteenloopen. Wij zullen ons hier daarom beperken tot wat gezegd wordt direct in verband met wilde en gecultiveerde witte klaver (typicum A. en G.)<sup>1)</sup>.

De witte klaver waarover wij spreken, behoort volgens Ascherson en Graebner tot *Trifolium repens* typicum A. en G. Hierbinnen vallen de groepen: genuinum A. en G., giganteum LAGR.-FOSS., microphyllum, grandiflorum en longipes. Erith beschouwt microphyllum als een pauper-vorm en grandiflorum kent zij een zelfstandige plaats toe naast *Tr. r. sylvestre* als var., terwijl Hegi grandiflorum noemt als een vorm van goed bemeste plaatsen. Binnen de groep genuinum onderscheiden Ascherson en Graebner nog weer verschillende vormen zooals pentaphyllum, tetraphyllum, phyllanthum en roseum. Deze laatste kent Hegi een zelfstandige plaats toe naast genuinum, giganteum enz.

Voor ons doel is dus van belang de indeeling: typicum A. en G., met de

<sup>1)</sup> Wij geven niet aan of wij te maken hebben met een var., f. of subf. enz., tenzij de aangehaalde auteur dit doet.

onderverdeeling genuinum A. en G. en giganteum LAGR.-FOSS.

Hegi neemt de beschrijving van Ascherson en Graebner, behoudens enkele kleine wijzigingen, over. Hij laat dan op de beschrijving van genuinum volgen: „Hieher die meisten Wildformen, die Alefeld als f. silvestre den Kulturformen gegenüberstellt. Seine Angabe, dass die Kulturformen grösser seien als die wilden, gilt aber bei weitem nicht immer; überhaupt lassen sich diese Formen morphologisch kaum scheiden.”

Het verschil tusschen genuinum A. en G. en giganteum LAGR.-FOSS. ligt in den hollen stengel van giganteum en de langere bladstelen (tot 60 cm toe) en grootere bladen van deze. Giganteum groeit op vochtige slikgronden, rijk aan voedsel. Ascherson en Graebner zeggen: „Wohl meist nur eine Standortsform”. Bij deze giganteum zal vermoedelijk de Lodino-klaver thuis behooren (zelfde conclusie bij Erith, 1924). Wij concludeeren uit dit alles, dat Ascherson en Graebner de wilde witte klaver en de gecultiveerde witte klaver, zonder onderscheid, onderbrengen bij *Trifolium repens* genuinum A. en G.

Hegi (l.c.) zegt echter direct na f. giganteum: „Eine besonders kräftige Kulturrasse ist die f. Lodigense hort.”, waartoe dan de Lodino-klaver behoort. Dit is alleen mogelijk doordat hij met f. giganteum LAGR.-FOSS. synoniem verklaart f. cultum ALEF. *p.p.*, dus met een gedeelte van de cultum ALEF.; dit moet dan het gedeelte zijn, dat het dichtst bij de Lodino-klaver staat of daarmee indentiek is. De rest van f. cultum ALEF. moet dan tot f. genuinum A. en G. behooren. Anderzijds is de vraag op zijn plaats of de afsplitsing van f. Lodigense hort. niet onjuist en verwarring stichtend is. Zade (1933) kan er zich o.a. niet mee vereenigen.

Wat doet nu Becker-Dillingen (1929)? Als hoofdvorm neemt hij aan var. *typicum* A. en G., welke hij onderverdeelt in f. genuinum A. en G., f. Lodigense hort. en f. cultum ALEF. Waar hij f. genuinum A. en G. synoniem verklaart met f. silvestre ALEF. kunnen wij dus concludeeren, dat hij de oude indeeling volgens Alefeld — wilde witte klaver versus gecultiveerde witte klaver — overneemt overeenkomstig het gebruik in den landbouw, al is het onder gebruik van andere namen en al voegt hij voor de Lodino-klaver f. Lodigense hort. toe. Becker-Dillingen verklaart nu echter f. cultum ALEF. synoniem met f. giganteum LAGR.-FOSS. Giganteum LAGR.-FOSS. zou echter de Lodinoklaver zijn (zie boven) en wordt dus hier *naast* f. Lodigense hort. geplaatst. Hegi, verklaarde, zooals wij boven aangaven, f. giganteum LAGR.-FOSS. en f. cultum ALEF. gedeeltelijk synoniem. Becker-Dillingen zal het pro parte over het hoofd hebben gezien.

Ten slotte Erith (1924), die de volgende indeeling maakt:

*Trifolium repens* L.

var. *l. silvestre* (= *Trif. rep. silvestre* ALEF.)

ras *a. hollandicum* (= *Trif. rep. cultum* ALEF.)

*b. giganteum* (= *Trif. rep. giganteum* LAGR.-FOSS.)

Hetgeen bij deze indeeling opvalt is, dat aan *Trifolium repens cultum* ALEF. en *Trifolium repens giganteum* LAGR.-FOSS. geen plaats meer wordt toegekend naast *Trifolium repens sylvestre*, maar dat beide beschouwd worden als voortkomende uit, dus behorende tot, de laatste. Dit is geheel in overeenstemming met de historie en de thans nog geldende praktijk, dat de *cultum* spp. worden gewonnen uit de wilde vormen. Becker-Dillingen zegt dan ook: „Aus den Wildformen lassen sich die brauchbarsten Neuzüchtungen gewinnen.” De moeilijkheid met deze indeeling is echter, dat var. *sylvestre* synoniem verklaard wordt met *Trifolium repens sylvestre* ALEF. en ras *hollandicum* met f. *cultum* ALEF., terwijl dus, zooals wij zagen, andere auteurs de indeeling volgens Alefeld, op grond van de onscheidbaarheid van f. *sylvestre* en f. *cultum*, niet bruikbaar achten. Overzien wij nog weer eens het geheel, dan valt op, dat *Trifolium repens genuinum* A. en G. betrekkelijk overeenstemt met *Trifolium repens sylvestre* zooals Erith deze opvat (vooral waar Ascherson en Graebner over de naast *genuinum* staande *giganteum* spreken als over een mogelijke modificatie van *genuinum*).

Ascherson en Graebner gaan dus eigenlijk niet in, zooals boven reeds opgemerkt, op het door ons besproken verschil wilde witte klaver — gecultiveerde witte klaver, welk verschil stamt van Alefeld en waarover de verschillende auteurs het eens zijn, dat het niet houdbaar is, terwijl Erith dit onderscheid wel maakt, maar dan de gecultiveerde als voortkomende uit *sylvestre* beschouwt.

Afgaande op deze literatuurgegevens kan men niet tot een onderscheid komen; een ontwarrend onderzoek op dit gebied is gewenscht; dit zal vermoedelijk tot vereenvoudiging leiden.

Systematisch zijn wilde witte klaver en gecultiveerde witte klaver, althans wanneer wij ons baseeren op Ascherson en Graebner en op Erith, niet van elkaar te scheiden.

Op zichzelf behoeven wij dit niet te betreuren, daar toch zoo vaak blijkt, wanneer men overgaat tot het veredelen van een gewas waarvoor door systematici een classificatie was opgesteld, dat het aantal genotypen veel groter is dan eerst verwacht werd, terwijl een verfijnd systematisch onderzoek tot andere groepeerings leidt. Sprekend zijn in dit verband nog altijd de moeilijkheden bij de grassen.

Een goede omschrijving van wat men onder „wilde witte klaver” verstaat, is, zooals gezegd, niet te vinden. De kenmerken, die de 17de Beschrijvende Rassenlijst (1941) van het Instituut voor Plantenveredeling noemt, zijn: sterk uitstoelende, kruipende vorm, die uitmuntend geschikt is voor beweiding en zichzelf in stand houdt. Planten van dezen habitus en deze eigenschappen worden aangetroffen in oude, overwegend beweidde, natuurlijke graslanden en deze zijn dus onderworpen geweest aan een natuurlijke selectie van vele jaren in een regelmatig afgegraasd weidebestand. Sampson (1919) maakt opmerkingen, die geheel in deze richting

gaan. Men heeft dan bij „wilde witte klaver” niet te maken met een streng systematische eenheid, maar met het product van een massaselectie, waarbij de toegepaste methode van selectie, nl. natuurlijke selectie, niet in ruime mate door den „veredelaar” wordt beheerscht, zoodat het selectie-product (de wilde witte klaver) zeer uiteenlopende vormen, morfologisch zoowel als physiologisch, zal herbergen, terwijl ook de begrenzing toevallig is.

Zoo bekeken, dient het onderscheid wilde witte klaver — gecultiveerde witte klaver niet in een systematiek van witte klaver te worden opgenomen. Aan den anderen kant is wilde witte klaver niet iets mysterieus (hoewel slecht begrensd, vandaar ook, dat geen goede beschrijvingen zijn te vinden), en dit product van natuurlijke selectie zal te vervangen en te verbeteren zijn door een product van doelbewuste selectie, waarbij dan o.a. aandacht zal moeten worden geschonken aan verdraagzaamheid voor afgrazen, door b.v. kunstmatig nabootsen hiervan. Maar niet alleen daaraan. Zoo is vermoedelijk de omschrijving: „uit een goede oude weide”, dus afkomstig uit een bestand, niet zonder beteekenis. Hoe dit punt bij doelbewuste selectie doelmatig onder oogen is te zien, is een vraag, die, evenmin als bij de grassen, bevredigend is opgelost. Verder dient evenzeer de nadruk gelegd op *oud* weiland. Hierbij speelt een rol het feit, dat Stapledon (1927) als volgt stelt (pag. 242): „To sow in the autumn and to take a crop of seed the following year represents a very short period for establishment and growth, favourable only to the quick-growing strains. To take a second crop in the same year is further to select those strains which can pick up and grow very quickly — to select, that is to say, from a mixed population, types which predominantly consist of plants having, in the main, the characteristics which we have come to associate with „Commercial White Dutch”. In een noot voegt hij hier o.a. aan toe: „All the researches in progress at Aberystwyth.... conclusively prove, moreover, that the longer-lived and persistent strains of all herbage species are those which grow slowly and „pick up” slowly.” Hier kan terloops worden opgemerkt, dat Stapledon terzelfder plaatse spreekt over: „...the trade designation Wild White Clover.”

Ten slotte kan nog met de woorden van Stapledon worden weergegeven, datgene wat elders door ons werd beschreven: „It is significant in this connexion to observe that in samples of white Dutch clover, plants with the characters of wild white are frequently to be found, while in samples of the oldest sward wild white, plants with the characteristics of white Dutch are not infrequently met with.”

De grenzen tusschen wilde witte klaver en gecultiveerde witte klaver (Dutch clover) zijn dus niet of zeer moeilijk te trekken. Het is daarom gewenscht, dat de hoofdverdeeling van witte klaver in de Beschrijvende Rassenlijst van het Instituut voor Plantenveredeling naar wilde en gecultiveerde witte klaver komt te vervallen en dat de andere, ook reeds

aanwezige indeeling, naar witte weideklaver en witte cultuurklaver als eenige juiste wordt gehandhaafd. In dat geval wordt de witte klaver niet meer verdeeld naar herkomst maar naar geschiktheid voor gebruik.

Wilde witte klaver, gecultiveerde witte klaver (Dutch clover) en Lodinoklaver zijn kunstmatig geschapen, onvoldoend begrensde groepen uit de eindeloze rij van witte-klaver-variëaties.

Grijpen wij thans terug op het uitgangspunt van ons betoog, nl. of de onderzoeken van Sampson (1919) en van Findlay en Dower (1927) beteekenis hebben bij de beoordeeling van de vraag of de mate van stikstofvoeding een rol speelt bij het (specifieke) HCN-gehalte van de verschillende witte-klaverplanten. Wij kwamen tot de conclusie, dat bedoelde onderzoeken deze beteekenis niet hebben, daar deze auteurs vergelijkingen trekken tusschen wilde witte klaver en gecultiveerde witte klaver, hetgeen geen vergelijkbare eenheden zijn. Wij hebben thans gezien, dat er systematisch geen verschil is tusschen wilde en gecultiveerde witte klaver. Dit neemt niet weg, dat in de rij van variëaties de zgn. wilde witte klaver en de gecultiveerde witte klaver (Dutch clover) steeds in eigenschappen ver van elkaar zullen staan, zoodat het bezwaar van kracht blijft. Dit als eerste punt ter belichting van de gevonden controversen, hetgeen naar onze meening reeds een voldoende verklaring is.

In de tweede plaats: de waarnemingen zijn gedeeltelijk gedaan aan zaailingen of planten in het eerste jaar na uitzaaiing en gedeeltelijk aan planten verkregen door uitloopers, in het laatste geval dus voor het meeren-deel afkomstig van planten eenige jaren na uitzaaiing. Hierin ligt een principieel verschil, daar hier de physiologie van éénjarige gewassen en die van meerjarige (niet houtige) gewassen een rol gaat spelen, omtrent welke laatste wij nog betrekkelijk slecht zijn georiënteerd. Zie hierover ook Frankena (1940). Speciaal bij de inwerking van een stikstofvoeding is dit van groote draagwijdte, daar het toch bekend is bij b.v. fruitboomen (meerjarig, houtig), dat stikstofgiften in jonge stadia totaal andere verschijnselen te voorschijn roepen dan op lateren leeftijd. Zie hierover b.v. de opmerking van Kobel (1931, pag. 59). De waarneming van Davies en Levy (1931), dat N.Z. Mother Seed (Type I), noch N.Z. Permanent Pasture (Type II met een weinig Type I), in het zaaijaar bloeiden, maar dat het tweede jaar zeer veel bloemen geproduceerd werden, in tegenstelling met b.v. Ordinary (rejected for certification), die direct het eerste jaar zeer krachtig bloeide, is in dit verband van groot belang, vooral waar het door genoemde auteurs als type-eigenschap wordt vermeld.

In de derde plaats: de waarnemingen van de andere auteurs hier aangehaald zijn gebaseerd op de kleurreactie van pikrinezuurpapier en dus op het onderscheid cyanophoor en acyanophoor, terwijl onze waarnemingen betrekking hebben op de gradeering der cyanophorie. De tegenstelling

cyanophoor versus acyanophoor is, zooals wij reeds eerder aanduiden, naar onze meening te scherp en te eenzijdig. Acyanophoor is slechts één extreme waarde van een lange lijst van waarden. Men kan zelfs de vraag opwerpen of acyanophorie, in de theoretische beteekenis van het woord, bestaat. Neemt men het bestaan wel aan, dan geeft men daarmee te kennen, dat binnen witte klaver twee principieel verschillende stofwisselingen bestaan, wat niet wegneemt, dat de werkelijke acyanophorie op de afwezigheid van het glucoside-splitsende enzyme zou kunnen berusten. Een zwakke aanwijzing in de richting van een dergelijke afwezigheid van het enzyme vindt men bij Armstrong, Armstrong en Horton (1913), die een geringe enzyme-activiteit vonden bij de eenige door hen onderzochte gecultiveerde witte klaver (Dutch clover). Ons interesseert hier echter uitsluitend de vraag of de acyanophorie wordt veroorzaakt door afwezigheid van het enzyme bij aanwezigheid van het glucoside. Dit nu is, mede gezien de onderzoekingen van de Armstrong's en Horton aan *Lotus corniculatus*, niet waarschijnlijk. Neemt men het bestaan van acyanophorie niet aan, dan heeft men slechts te maken met een meer of minder van één stofwisselingschema, terwijl dan de gevonden acyanophorie te wijten is aan de gebruikte bepalingmethoden, die b.v. onvoldoende gevoelig zijn (zie Hoofdstuk V).

Uit de hier en daar met woorden omschreven verkleuringen van de pikrinezuurpapiertjes hebben wij den indruk gekregen, dat het verschil in gehalte aan HCN bij de zes Nieuw-Zeelandsche klavers, door ons onderzocht, veel grooter was dan de verschillen door de andere auteurs geobserveerd bij het door hen gebruikte materiaal. Daardoor bestaat de mogelijkheid, dat bepaalde kenmerken in ons geval duidelijker naar voren zijn getreden.

In het kort zijn dus de gegevens als volgt samen te vatten. Aan zes Nieuw-Zeelandsche klavers, behoorende tot drie verschillende klassen (HCN-gehalte) en, gezien de beschreven eigenschappen, representatief voor deze klassen, welke klavers gerekend moeten worden tot de zgn. gecultiveerde witte klavers, werd in het zaaijaar de indruk verkregen, dat de planten van de „Mother Seed”-klasse, met het hoogste HCN-gehalte, de hoogste stikstofvoeding genoten, gezien de groei- en bloeieigenschappen. Tusschen krachtiger stikstofvoeding en hooger HCN-gehalte is een causaal verband zeer wel mogelijk. De in de literatuur beschikbare gegevens kunnen deze zienswijze niet direct versterken, maar kunnen deze evenmin verzwakken. Men mag hier echter geen conclusies trekken, daar het aantal gevallen onder observatie te gering is ( $3 \times 2$ ), zoodat deze opvatting uitsluitend als werkhypothese wordt gegeven.

Men zal nu echter direct kunnen tegenwerpen: hoe is het mogelijk over een verschillende stikstofvoeding te spreken, wanneer Mirande (1912) en vele andere auteurs constateerden, dat men cyanophore en acyanophore witte klaver in het wild kan aantreffen vlak naast elkaar, zoodat men b.v.



goed doet bij verzameling in het wild, zich steeds uitvoerig te overtuigen, dat men de uitloopers of bloemhoofdjes van één plant verzamelt, terwijl tevens Ware (1925) geen invloed van verschillende grondsoorten op het HCN-gehalte kan constateeren? De verklaring hiervoor zou gezocht moeten worden in het individu van de witte-klaver-plant; dit nu is mogelijk wanneer men bedenkt, dat wij hier te maken hebben met een Leguminose, dus veelal met een plant met wortelknolletjes, dus met een plant, in symbiose levende met *Bacterium radicola* en die dan juist daaraan haar stikstofvoeding hoofdzakelijk en overheerschend heeft te danken.

Verskil in stikstofvoeding zou dan terug te brengen zijn tot een verschil in geschiktheid van den gastheer voor de symbiose met bepaalde stammen van *Bacterium radicola*. Een dergelijk specifiek gedrag van den gastheer, dus binnen de soort, maakt reeds lang een punt van discussie uit; wij verwijzen naar Fred, Baldwin en McCoy (1932, pag. 174).

De onderzoekingen van Wilson, Burton en Bond (1937) en Burton en Wilson (1939) hebben voor *Melilotus* spp. en *Medicago sativa* het verschillende gedrag van variëteiten t.o.v. bepaalde *Bacterium radicola*-stammen aangetoond, alhoewel deze verschillen sterk beïnvloed worden door uitwendige omstandigheden, zooals temperatuur, lichtintensiteit en belichtingsduur.

Wanneer men het verschil in stikstofvoeding verklaart door de specificiteit van de waardplant, dan geldt vanzelf sprekend deze oplossing alleen voor cyanophore Leguminosen; op andere cyanophore planten kan zij, behoudens enkele uitzonderingen, niet worden toegepast. Toch bestaat, voorshands bezien, b.v. voor *Sorghum* dezelfde vraag. Zoo constateerden Willaman en West (1916) reeds, dat van twee variëteiten *Sorghum*, de eene, onder de meest verschillende groeiomstandigheden, steeds een hoger HCN-gehalte had dan de andere.

Wil men een rol toekennen, bij de vorming van het glucoside-niveau, speciaal wat de hoogte betreft, aan de stikstofvoeding door middel van de wortelknolletjes, dan dient men nog een ander punt onder oogen te zien.

Bij het onderzoek van witte klaver voor zaadcontrôle-doeleinden maakte men gebruik van de blaadjes van zeer jonge zaailingen, waarbij men specifieke verschillen in HCN-gehalte constateerde (Pethybridge 1918, Sampson 1919, Findlay en Dower 1927, Gentner 1935). Het zal duidelijk zijn, dat op dat moment nog geen sprake kan zijn van een specifieke stikstofvoeding door middel van *Bacterium radicola*, daar deze eerst op lateren leeftijd optreedt. Wel constateerde men, dat met den ouderdom het gehalte aan HCN terug liep. In schijnbare tegenspraak met dit laatste vonden andere onderzoekers, dat het HCN-gehalte, over meerdere jaren aan een plant gemeten, zeer constant bleef (Pethybridge 1918, Ware 1925), behoudens seizoenschommelingen. In het eerste geval hebben wij te maken met de plant, welke nog geen stikstofvoeding van buiten krijgt toegevoerd, zij leeft van de stikstofreserve van het zaad en

omdat deze langzamerhand uitgeput raakt, daalt het HCN-gehalte. In het tweede geval is de stikstofvoeding van buitenaf tot stand gekomen en thans blijft het HCN-niveau constant.

Het specifieke HCN-niveau van den zeer jongen zaailing zou dan in zeer nauw verband staan met, — een functie zijn van —, de stikstofreserve in het zaad. Is het nu mogelijk, dat de grootte van deze stikstofreserve wederom afhankelijk is van de stikstofvoorziening van de moederplant, dan zou daarmee de ring gesloten kunnen worden voor den bepalenden invloed van de stikstofvoeding door middel van *Bacterium radicum*.

Hoe dit alles ook zij, vast staat, dat gezien het principieele verschil in stikstofvoeding van Leguminosen en niet-Leguminosen, de resultaten verkregen aan niet-Leguminosen, behoudens de eerder bedoelde uitzonderingen, niet zonder voorbehoud mogen worden toegepast op Leguminosen en omgekeerd.

Gezien van uit dit oogpunt, zou de oplossing van deze vraag geheel een microbiologische worden.

Bij de meest eenvoudige voorstelling van zaken (alhoewel waarschijnlijk te eenvoudig!) zou men ter verklaring van het specifieke gedrag van de waardplant kunnen denken aan een verschil in anatomischen (inwendig-morphologischen) bouw, speciaal wat betreft den wortel.

Erith (1924, pag. 113) vermeldt, dat wilde witte klaver, Dutch clover en Lodino-klaver anatomisch van elkaar verschillen. Zoo geeft zij op voor het aantal vaatbundels in de stolonen bij Lodino-klaver: 11–14, bij Dutch clover: 9–11 en bij wilde witte klaver: 8–10. De bijwortels zijn bij Lodino-klaver hexarch, bij Dutch clover pentarch en bij wilde witte klaver tetrarch. Ten slotte noemt zij als het aantal vaatbundels in de bladstelen bij Lodino-klaver: 5–9, bij Dutch clover: 5 of 6 en bij wilde witte klaver: 4 of 5.

Deze inwendig-morphologische veranderingen bij de drie verschillende witte klavers kunnen uit den aard der zaak direct in verband gedacht worden met de uitwendig-morphologische kenmerken, zooals dikkere uitloopers voor den giganteum-vorm, grootere bladen enz. Ook hier geldt weer de vraag: staat deze indeeling onherroepelijk vast? Is dit toch wel het geval, terwijl wij gezien hebben, dat een hoog HCN-gehalte niet onherroepelijk gebonden is aan één van de drie opgestelde witte-klaver-vormen, dan is het erg moeilijk nog een verband te leggen tusschen het HCN-gehalte en de inwendige morphologie, althans de hier genoemde eigenschappen, van een witte-klaver-plant via een microbiologisch-bepaalde stikstofvoeding.

Om dit na te gaan werd op 26 Mei 1941 van verschillende witte-klaverstammen en -klonen, die groeiden op de proefterreinen van de Afdeling Landbouwplantenteelt (zand- en kleigrond), het aantal vaatbundels in de bladstelen geteld (telkens bij ongeveer tien stelen). Het resultaat is neergelegd in Tabel 5.

TABEL 5

Aantal vaatbundels in de bladstelen van witte-klover-stammen en -klonen

		standplaats	aantal vaatbundels			
Nederlandsche witte-klover-klonen (in het wild verzameld):						
no	herkomst:					
150.1	Naaldwijk, zavel . . . . .	zandgrond	3	5		
166.1	De Lier, zeer zware klei . . . . .	id.		5		
170.3	Dordrecht, zware klei . . . . .	id.	3	5		
173.1	„ „ „ . . . . .	id.		5		
245.1	Mandjeswaard (Kampen), klei	id.		5		
252.1	„ „ „	id.		5		
Afd. Landbouwplantenteelt:						
	klone 1; weidetype . . . . .	id.		5		
	klone 6; zaadtype . . . . .	id.	3			
	klone 7; weidetype . . . . .	id.		4	5	
Wilde witte weide klover Escofar (Centr. Bur.) . . . . .						
		kleigrond		5		
Inlandsche witte klover (Centr. Bur.) . . . . .						
		id.		5	6	
Trifolium repens (van der Have) . . . . .						
		id.		5	6	7
Nieuw-Zeelandsche witte klavers:						
	no 2 = Ac 2273 . . . . .	zandgrond	4	5		
	no 3 = Ac 2160 . . . . .	id.		5	6	7
klonen uit no 5 = Ac 2202:						
	x . . . . .	kleiachtige tuingrond		5	6	8
	4 zonder bladplek . . . . .	id.		5		
	1.5 . . . . .	id.		5		
	4.7 . . . . .	id.		5		
klonen uit no 6 = Ac 2413:						
	x <sup>1</sup> . . . . .	id.		5		
	x <sup>2</sup> . . . . .	id.		5	6	7
	5.1 . . . . .	id.	4	5		9
	1.2 . . . . .	id.		5	6	7
	1.8 . . . . .	id.		5		

In de eerste plaats merken wij op, dat ook 3 vaatbundels per bladsteel worden gevonden. Dit stemt overeen met het feit, dat wanneer men 5 vaatbundels vindt, hiervan twee slechts klein zijn; de drie groote vaatbundels zijn dan ongeveer gelegen op de drie hoekpunten van een gelijkzijdigen driehoek, de twee kleintjes op het midden van twee driehoeks-zijden, aan den bollen kant van den steel.

Verband tusschen een klein aantal vaatbundels en het type wilde witte klaver werd niet geconstateerd; zoo is klone 6 van de Afdeeling Landbouwplantenteelt, volgens de habitus-kenmerken, zie Erith (l.c.), geen wilde witte klaver, maar eerder geneigd naar het gecultiveerde type. Wat betreft de Nieuw-Zeelandsche klavers zouden sommige dezer klonen volgens dit anatomische gegeven tot den giganteum-vorm gerekend moeten worden, hetgeen volgens andere eigenschappen en volgens de afstamming niet juist schijnt (zie eerder in dit Hoofdstuk: N.Z. Wild White Type 1.), alhoewel sommige van deze klonen zeer fors gebouwd zijn. Andere van de Nieuw-Zeelandsche klonen zouden tot de wilde witte klaver gerekend moeten worden volgens het aantal vaatbundels, hetgeen evenmin volledig te accepteeren valt.

De onderzochte Nederlandsche klaver-klonen zijn alle afkomstig van in 1935 in het wild verzameld zaad, dat in 1936 werd uitgezaaid. Deze klonen zijn voorjaar 1941 nog krachtig. Er zijn vertegenwoordigers bij met hoog en laag HCN-gehalte, echter zonder eenig verband met de hier weergegeven verschillen in anatomie. Deze klonen hooren geen van alle tot de extreem kruipende, laag bij den grond groeiende wilde witte klavers. Het meerendeel der bladstelen is langer dan 10, gaande tot 20 cm. De waarde, die Erith (l.c.) voor de bladsteel-lengten opgeeft, stemt, zooals gewoonlijk voor dergelijke kenmerken geldt, hiermede slecht overeen. Voor Dutch clover geeft zij een gemiddelde lengte van 5 tot 7,5 cm op.

De *Trifolium repens* van Van der Have zou anatomisch een giganteum-vorm moeten zijn, behoort, uit hoofde van den habitus, echter eerder tot de overgangsvormen van wilde en gecultiveerde witte klaver.

Ten slotte vestigen wij de aandacht op het feit, dat binnen elke afzonderlijke klone het aantal vaatbundels in den bladsteel nog kan varieeren.

Het is gerechtvaardigd twijfel uit te spreken over de juistheid van het verband, dat Erith heeft gelegd tusschen sommige anatomische kenmerken en de verdeeling in bepaalde vormen bij witte klaver.

Alvorens men waarde gaat toekennen aan dit soort eigenschappen, zal men een uitvoerig onderzoek dienen in te stellen naar de optredende variaties.

Grijpen wij thans terug op het genetische onderzoek van Williams (1939), dan valt op te merken, dat door hem de vererving werd bepaald van een afgeleide eigenschap: het HCN-gehalte. Daar hij echter het meest eenvoudige verervings-schema vindt, zal men mogen aannemen, dat het verband tusschen het HCN-gehalte en de werkelijk verervende causa betrekkelijk eenvoudig is. De vraag blijft of er acyanophore witte-klaver-planten bestaan.

In dit Hoofdstuk hebben wij aan de hand van een enkele veldwaarneming willen laten zien tot welke vragen het betreden terrein aanleiding geeft. Daar microbiologisch, anatomisch en systematisch onderzoek niet op onzen weg lag, zijn wij niet op deze vragen ingegaan.

### HOOFDSTUK III

## HET BLAUWZUURGEHALTE VAN NIEUW-ZEELANDSCHE EN NEDERLANDSCHE WITTE KLAVERS

### VOORZORGEN BIJ DE BEPALING DAARVAN IN ACHT TE NEMEN

Wij hebben in Hoofdstuk II de vraag opgeworpen, of het keurings-schema van witte klaver, gebaseerd op het HCN-gehalte, zooals dat in Nieuw-Zeeland is ingevoerd, ook geldig is buiten Nieuw-Zeeland, dan wel, dat het uitsluitend plaatselijke beteekenis heeft. Daarbij valt dus na te gaan in hoeverre het HCN-gehalte van een witte-klaver-plant specifiek en in welke mate het aan modificatie onderhevig is. Er werd getracht hier een antwoord op te geven, door na te gaan of het HCN-gehalte van bepaalde Nieuw-Zeelandische witte-klaver-monsters, uitgezaaid in Nederland, voldoet aan de HCN-eischen van de keuringsklasse, waarin zij in Nieuw-Zeeland zijn ondergebracht. Anderzijds dient de vraag beantwoord te worden of onder de Nederlandsche witte klaver cyanophore individuen voorkomen, zoodat in Nederland op een hoog HCN-gehalte kan worden geselecteerd, waarmede de beschouwing van de Nieuw-Zeelandische onderzoekingen zin krijgt.

Te dien einde werden in eerste instantie de zes hier verbouwde en in Hoofdstuk II beschreven Nieuw-Zeelandische witte klavers onderzocht op hun HCN-gehalte. Hiertoe en voor alle andere HCN-bepalingen in dit Hoofdstuk werd gebruik gemaakt van de methode Liebig-Denigès, zooals in Hoofdstuk I beschreven. De bepalingen geschieden dus aan groote quanta klaverbladen, welke op de eveneens in Hoofdstuk I omschreven wijze werden verzameld, vervoerd, fijn gehakseld, gedigereerd en gedestilleerd.

De eerste bepalingen zijn neergelegd in Tabel 6. Wij kozen daarvoor één vertegenwoordiger van de Klasse Uncertified en één van de Klasse Permanent Pasture, terwijl van Mother Seed beide klavers werden onderzocht.

Men ziet uit deze cijfers, dat de gehalten aan HCN in de groene massa van dezelfde orde van grootte zijn als in Nieuw-Zeeland. De overeenstemming met de speciale klasse-cijfers is slechts betrekkelijk. Het heeft eenigszins den schijn of de gehalten een verschuiving naar boven hebben ondergaan, althans no 6 is zeer hoog in gehalte en no 2 zou volgens onze cijfers moeten worden ingedeeld in de Permanent Pasture klasse. Maar

TABEL 6

*HCN-gehalte van 4 Nieuw-Zeelandsche witte klavers, in 1938 in Nederland verbouwd*

No.	klasse	datum	uur	% HCN in de groene massa volgens klasse	% HCN in de groene massa
2	Uncertified	6-8-'38	12.00	kleiner dan 0,0030	a. 0,0050 b. 0,0049
4	Permanent P.	6-8-'38	14.45	0,0030–0,0070	a. 0,0054
5	Mother Seed	9-8-'38	9.00	0,0070–0,0130	a. 0,0078 b. 0,0066
6	Mother Seed	3-8-'38	9.00	0,0070–0,0130	a. 0,0140 b. 0,0151 c. 0,0149

gezien deze cijfers mogen wij wel concludeeren, dat er geen sprake van is, dat het optreden van HCN in deze klavers en de variaties in het HCN-gehalte alleen beperkt zijn tot Nieuw-Zeeland (dus inhaerent aan de groeiplaats en niet aan den stam). Wij vinden bij verbouw in Nederland dezelfde orde van grootte van HCN-gehalte als in Nieuw-Zeeland terug.

Dat de klasse-grenzen niet precies kunnen worden aangehouden, behoeft ons niet te verwonderen. Reeds in zijn oorspronkelijk artikel geeft Doak (1932) aan, dat door hem gezorgd werd, dat bij het bepalen van het HCN-gehalte van onbekende stammen voor hun classificatie, steeds enkele „standaardperceelen” van bekend gedrag, mee werden bemonsterd. „When the method was applied to certification lines it became obvious that frequent analysis of „control” plots was necessary to avoid errors due to day-to-day and seasonal variations in hydrocyanic-acid content, as well as those due to stage of growth.” In het bezit van de ervaring van een volgend jaar zegt Doak (1935): „Results obtained in subsequent years show that the potential hydrocyanic-acid (HCN) content during the 1932–1933 season was somewhat higher than has been found since. Few samples have been found to contain more than 0,010 per cent HCN, and the general range, especially in respect to the types higher in HCN, is lower than is shown in the above table (zie Inleiding pag. 7). For certification purposes a new standard has to be set each season by reference to control lots the performance of which is known. During the past season the lower HCN limit of those lines certified as mother-seed lines has been in the vicinity of 0,005 per cent.”

In 1937 onderstreept Doak <sup>1)</sup> deze noodzaak nog eens uitdrukkelijk en voegt er aan toe: „I would point out, however, that there are a certain amount of day-to-day variations in the HCN, and it is our practice to include several control plots on every occasion on which we determined the

<sup>1)</sup> Schriftelijke mededeeling aan den schrijver.

HCN-content. In this way we have constant reference to the behaviour of known types."

Ten duidelijkste spreekt hieruit, dat men reeds na eenige ervaring het eerst vastgestelde schema met scherpe grenzen heeft verlaten en dat wij moeten spreken van een glijdende schaal. Schakelt men, gelijk Doak aanbeveelt, bij iedere bepaling contrôle-bepalingen aan reeds eerder onderzochte witte-klover-stammen in, dan dient men niet uit het oog te verliezen, dat dan wordt aangenomen, dat alle stammen gelijk reageeren op de invloeden, welke het HCN-gehalte wijzigen en van welke invloeden wij vooralsnog den aard niet kennen.

Het is in dit verband volgens ons niet zonder bezwaar, dat men in Nieuw-Zeeland, zooals wij in de Inleiding mededeelden, bij de keuring van witte klover is terug gevallen op de pikrinezuurpapier-methode, waarbij drie of vier kleurtrappen worden onderscheiden.

Uit een en ander is af te leiden, dat de Nieuw-Zeelandsche klover, zooals die op onze proefvelden is gegroeid, zich normaal, althans wat het HCN-gehalte betreft, heeft gedragen, zoodat het geoorloofd was met dit gewas verder te experimenteeren.

Doak bepaalde dus het HCN-gehalte in de groene massa. Dit behelst twee punten, die wij in het kort nader onder de oogen dienen te zien: 1e waarde en beteekenis van het gehalte-cijfer, met name het al of niet geoorloofd zijn van het gebruiken daarvan, en 2e de berekening van het gehalte-cijfer op de waterhoudende massa en niet op de droge stof.

Hoewel veel met gehalte-cijfers gewerkt wordt, dient men zich bij ieder geval te realiseeren, of het in dat speciale geval geoorloofd is, dan wel of de te behandelen vraag onjuist in de gehalte-cijfers wordt weerspiegeld.

Wij verwijzen b.v. naar Boonstra (1938) en Gouwentak (1929).

In het onderhavige onderzoek schijnen geen bezwaren tegen het gehalte-cijfer naar voren te brengen te zijn. Men heeft hier te maken met gehalte-cijfers, zooals die ook b.v. (en met welk nut) bij de kinacultuur gebruikt worden. De objecten van deze verschillen principieel van de mineraalgehalten, waar Boonstra (l.c.) hoofdzakelijk over spreekt. De mineralen als zoodanig worden door de plant van buiten af opgenomen, terwijl dit met de eerst genoemde objecten niet het geval is, aangezien deze in hun speciale opbouw door de plant zelf worden geproduceerd. De bezwaren van Gouwentak (l.c.) komen hierop neer, dat gehalte-cijfers berekend op gewichtseenheden van assimileerende deelen, beïnvloed worden door de aan- of afwezigheid van de assimilaten. Zoo zouden periodieke schommelingen in bepaalde gehalte-cijfers veroorzaakt kunnen worden door de schommelingen van de assimilaten zonder dat de onderzochte stof ook maar eenige toe- of afname vertoont. Voor ons onderzoek hebben wij dit verschillende malen nagegaan zonder hier foutenbronnen te kunnen ontdekken.

Het tweede punt, de berekening van het gehalte-cijfer op de water-

houdende, groene massa, houdt grootere bezwaren in. Deze wijze van berekenen biedt theoretische voordeelen, daar toch het water, evengoed als alle andere stoffen tot het systeem behoort, ja zelfs een in wezen alles beheerschende factor is. Een bladgewas, als witte klaver, levert echter juist in dit verband onoverkomelijke moeilijkheden in den vorm van het aanhangende water, dat dus niet tot het systeem behoort. Realiseeren wij ons slechts het verschil, dat moet ontstaan bij bemonstering van een klavergewas zeer vroeg in den ochtend, wanneer de dauw nog zwaar over den akker ligt of enkele uren na het middaguur van een zon-doorstoofden Augustusdag. Van gewas tot gewas veranderen deze vragen.

Denken wij b.v. aan bieten, „loof”. Zooals door Bruinsma (1938) wordt beschreven, werden bij zijn onderzoek alle monsters gelijk behandeld, ook al weer omdat bepaalde fouten niet te vermijden waren; eerst werden de monsters gewasschen, zoo kort mogelijk in zoo weinig mogelijk water, waarna het loof gedurende een nacht op speciaal geconstrueerde rekken werd weggezet om uit te lekken. Hier trachtte men dus het aanhangende water van de verschillende monsters gelijk te maken. Bij het grootere, dikkere en gladdere bietenblad zal het aanhangende water relatief een veel minder groote rol spelen dan bij het klaverblad. Een dergelijke methode is bij witte klaver niet uitvoerbaar (gedacht werd aan drogen tusschen filtréerpapier), mede gezien den bij het glucoside-onderzoek alles overheerschenden eisch tot snel handelen, hetgeen voor het bietenloof niet in die mate noodzakelijk is.

Dat dit verschil in vochtgehalte bestaat, hetgeen wij practisch ervoeren, wanneer wij 's morgens en 's middags bemonsterden, kan nog aan door ons bepaalde vochtgehalten van witte-klaver-bladen worden gedemonstreerd.

Uit Tabel 7 valt duidelijk te zien, dat gemiddeld het vochtgehalte des morgens het hoogst is, des middags het laagst, om vaak tegen den avond weer te stijgen. Tevens valt op, dat voor de bladstelen het vochtgehalte nog iets hooger ligt dan voor de blaadjes (in het vervolg steeds gebruikt in de morphologische beteekenis van onderdeel van een samengesteld blad), terwijl het veel constanter blijft, al volgt het blijkbaar de blaadjesvochtigheid wel.

Wij zullen hier te maken hebben met aanhangend vocht, zooals ook in droge tijden door dauwvorming kan optreden, maar evenzeer met mogelijke variaties in de waterhoeveelheid binnen de plant. Het meer constante vochtgehalte van de stelen, hoewel nog meegaande met de vochtgehalteveranderingen van de blaadjes, is zeer wel met het aanhangende water te verklaren, daar dit aanhangende water voor de stelen een geringere hoeveelheid zal zijn terwijl het minder aan verandering onderhevig is. Door den verticalen stand zal men te maken hebben met een laag gelegen maximum-waarde van het aanhangende water, begrensd nl. door afdruppen. Verder is het oppervlak relatief veel kleiner dan bij de blaadjes. En



tenslotte heeft men te maken met de vochtige atmosfeer onder het blade-rendek. Aan den eenen kant zal dit laatste het vochtgehalte hoog houden, aan den anderen kant zal het oorzaak zijn van een meer constant vochtgehalte en dus van een geringere variatie in het vochtgehalte van de stelen.

Het verschil tusschen de twee uiterste vochtgehalten op denzelfden dag, dat uit een oogpunt van de analyse, zooals Doak die toepaste, van belang is, bedraagt bij een gemiddeld vochtgehalte van 80–85% van 3 tot 4 eenheden van het vochtgehalte, met dien verstande dat, zooals bij de Nieuw-Zeelandsche klaver no 5 op 15 September 1939, dit verschil kan stijgen tot meer dan 8 eenheden.

In geval het HCN-gehalte uitsluitend bepaald wordt voor selectie- en keuringsdoeleinden, zooals Doak deed, zal men dus wel kunnen werken met dit gehalte betrokken op de groene massa, mits de vochtgehalteschommelingen per dag beperkt blijven tot 3 à 4 eenheden (hetgeen overeenkomt met 5%) en men daartoe, wanneer gelijktijdige bemonstering, b.v. wegens het groote aantal, niet mogelijk is, zooveel mogelijk gelijkwaardige tijdstippen, wat de vochtigheid van het gewas betreft, uitkiest. Men zal dan een plotselinge afwijking van 8 eenheden, welke overeenkomt met 10%, zooals die eveneens door ons geconstateerd werd, kunnen vermijden.

Bij vergelijking van de uitkomsten van *verschillende* dagen, ook al beperken wij ons tot de uren rond het middaguur, vinden wij als hoogste vochtgehalte 85,9% en als laagste 79,3% (Tabel 7). Deze variatie van dag tot dag bedraagt dus eveneens minstens 8–10%, hetgeen al een zeer redelijke verklaring schijnt voor de dag-tot-dag-variaties, die Doak in het HCN-gehalte vond. Uit deze impasse redde Doak zich, volkomen afdoende, door inschakelen van standaardperceelen.

Terloops zij gezegd, dat bij het gebruik van pikrinezuurpapier deze moeilijkheden door de tekortkomingen van de methode niet worden opgemerkt.

Verder kan men dan nog denken aan uiteenloopende vochtgehalten bij verschillende stammen van witte klaver, zooals bij de 3 × 2 Nieuw-Zeelandsche klavers (zie Tabel 4 en 7), hetgeen pleit voor het betrekken van het gehalte op de groene massa, vooral uit een oogpunt van de vergiftigingskansen.

En tenslotte bestaan nog de verschillen in vochtgehalte bij witte klavers van diverse herkomst. De door ons genoemde vochtgehalten omvatten niet de uiterste mogelijkheden. Zoo noemt Wolff (1936) de volgende vochtgehalten voor 12 witte klavers, afkomstig van verschillende plaatsen in Duitschland: 77,9; 81,4; 83,1; 83,4; 83,6; 83,6; 84,6; 86,6; 87,6; 87,9; 90,9; 93,2. Mach en Herrmann (1934) geven nog cijfers van twee Duitse monsters: 72,6 % en 85,3 %.

De twee uiterste waarden voor het vochtgehalte van witte klaver, die wij in de literatuur hebben gevonden, bedragen dus 72,6% en 93,2%.

TABEL 7

	datum	uur	neer- slag mm	vocht %		massa blaadjes massa stelen		HCN-gehalte blaadjes HCN-gehalte stelen	
				blaad- jes	stelen	groene massa	droge stof	groene massa	droge stof

## Nieuw-Zeelandse witte klaver no 6

3-8-'38	9.00	0,0 )				2,00			
15-8-'38	12.00	2,8	85,0			1,06			
15-8-'38	18.00	2,8	82,9			1,00			
16-8-'38	8.15	2,8	86,1			0,86			
16-8-'38	12.15	1,5	83,0			0,85			
16-8-'38	18.00	1,5	82,1			1,00			
17-8-'38	8.30	1,5	87,4			0,88			
17-8-'38	12.00	1,3	84,0			0,76			
17-8-'38	18.00	1,3	83,1	90,5		0,81	1,43	5,42	3,03
18-8-'38	8.15	1,3	83,8	90,1		0,81	1,32	4,71	2,87
18-8-'38	12.30	0,2	84,3	90,4		0,79	1,21	4,55	2,76
18-8-'38	18.00	0,2	82,4			0,76			
19-8-'38	8.00	0,2	83,6			0,77			
20-9-'38	8.00	0,0	85,8	90,9		1,00	1,56	2,94	1,87
20-9-'38	12.00	0,1	82,2	89,8		0,82	1,42	3,25	1,85
20-9-'38	18.00	0,1	81,8	90,2		0,85	1,58	3,91	2,09
21-9-'38	8.00	0,1	85,2	90,7		0,92	1,47	2,83	1,91
21-9-'38	13.15	0,0	82,5	90,0		0,80	1,40	3,76	1,57
21-9-'38	18.00	0,0	82,5	90,0		0,75	1,31	3,42	1,95
22-9-'38	8.00	0,0	84,4	89,9		1,09	1,68	2,62	1,69
22-9-'38	12.00	0,0	80,4	89,4		0,94	1,73	2,86	1,58
22-9-'38	18.00	0,0	81,7			0,92			
23-9-'38	8.15	0,0	84,5			0,77			
23-9-'38	10.00	0,0	83,9			0,75			
23-9-'38	12.30	0,0	82,5			0,76			
23-9-'38	14.30	0,0	81,3			0,76			
23-9-'38	18.00	0,0	81,9			0,78			
23-9-'38	20.15	0,0	82,8			0,79			
8-9-'39	14.00	0,0	78,3						
8-9-'39	16.00	0,0	77,6						
8-9-'39	19.30	0,0	80,2						
9-9-'39	9.00	0,0	79,2						
9-9-'39	11.30	0,0	80,1						
27-9-'39	9.00	0,0	84,0						
27-9-'39	14.00	0,0	80,6						
27-9-'39	19.00	0,0	81,2						
28-9-'39	6.15	0,0	84,1						
28-9-'39	7.30	0,0	84,4						
28-9-'39	9.30	0,0	83,0						
28-9-'39	18.45	0,0	80,9						
29-9-'39	9.00	0,0	82,0						

1) Eveneens in voorgaande etmalen.

Vervolg TABEL 7

	datum	uur	neer- slag mm	vocht %		massa blaadjes massa stelen		HCN-gehalte blaadjes HCN-gehalte stelen	
				blaad- jes	stelen	groene massa	droge stof	groene massa	droge stof
<i>Nieuw-Zeelandsche witte klaver no 5</i>									
	15-9-'39	7.00	4,6	86,4					
	15-9-'39	9.00	0,0	85,2					
	15-9-'39	11.00	0,0	81,9					
	15-9-'39	15.00	0,0	78,2					
	15-9-'39	19.00	0,0	81,5					
	16-9-'39	9.00		80,8					
<i>Nieuw-Zeelandsche witte klaver</i>									
no 1 . . . . .	22-8-'38	12.00	4,8	83,1	88,5	1,25	1,84	3,80	2,20
no 2 . . . . .	22-8-'38	12.00	4,8	83,2	90,0	1,10	1,85	5,34	3,17
no 3 . . . . .	23-8-'38	12.00	0,0	81,1	87,4	0,70	1,05	7,71	5,27
no 4 . . . . .	6-8-'38	20.45	11,6	84,5					
no 4 . . . . .	22-8-'38	12.00	4,8	84,2	90,0	0,90	1,42	1,86	1,18
no 5 . . . . .	22-8-'38	12.00	4,8	85,9		0,90			
no 5 . . . . .	23-8-'38	12.00	0,0	83,1	88,7	0,68	1,02	7,38	4,79
<i>Nederlandsche witte klaver-klonen</i>									
no 111 . . . . .	7-9-'38	12.30	0,0	79,3		1,29			
no 127 . . . . .	7-9-'38	12.30	0,0	81,4		1,27			
				% vocht blaadjes + steel					
no 131 . . . . .	8-9-'38	8.30	0,0		86,6				
no 143.1 . . . . .	16-9-'38	8.00	0,0		84,6				
no 143.2 . . . . .	8-9-'38	8.30	0,0		87,3				
no 148.1 . . . . .	16-9-'38	8.00	0,0		80,8				
no 150 . . . . .	8-9-'38	9.30	0,1		82,7				
no 157.1 . . . . .	8-9-'38	9.30	0,1		83,0				
no 166 . . . . .	9-9-'38	10.00	0,3		84,2				
no 167.1 . . . . .	9-9-'38	10.00	0,3		82,6				
no 170.1 . . . . .	12-9-'38	12.00	0,0		83,4				
no 170.2 . . . . .	12-9-'38	12.00	0,0		83,8				
no 173 . . . . .	12-9-'38	12.00	0,0		81,6				
no 215 . . . . .	12-9-'38	3.00	0,0		80,0				
no 221.1 . . . . .	12-9-'38	3.00	0,0		82,3				
no 230 . . . . .	12-9-'38	3.00	0,0		83,3				
no 248 . . . . .	14-9-'38	12.00	10,0		80,0				
no 252 . . . . .	14-9-'38	12.00	10,0		80,1				
no 274.2 . . . . .	14-9-'38	12,00	10,0		80,3				
Pajbjerg Grass- mark (Wiersum)	14-9-'38	2.00	10,0		87,4				
Morsø (v. d. Have)	13-9-'38	3.00	0,0		87,2				
Special Stock Nordfolk (C.B.)	13-9-'38	3.00	0,0		87,2				
Wilde witte klaver Oud weiland Essex (C.B.)	14-9-'38	3.00	10,0		85,7				

Zoals reeds in de noot op pag. 13 geconstateerd werd, is het door Seddon gebruikte percentage van 60% in onze oogen, althans voor Nederlandsche en Duitse toestanden, wel erg laag; wij bezitten geen aanwijzingen, dat dit percentage voor Australië wel zou gelden.

Samenvattend mogen wij concludeeren, dat onder bepaalde voorzorgen berekening van het HCN-gehalte op de groene massa voor keurings- en selectie-doeleinden toelaatbaar is, gezien den arbeid verbonden aan de vochtbepaling; voor wetenschappelijke onderzoekingen is deze berekeningswijze echter ontoelaatbaar. Men komt dan tot het betrekken op de droge stof. In Tabel 8 zien wij b.v. voor no 5 de HCN-gehalten berekend op de droge stof goed overeenstemmen, terwijl de gehalten, berekend op de groene massa, zeer veel verschillen.

In de door Doak gevolgde werkwijze verdient nog een ander punt onze aandacht.

Reeds Mirande (1912) geeft aan, dat de bladsteel betrekkelijk weinig blauwzuur afgeeft, tegen de blaadjes zeer veel.

Hij noemt de volgende cijfers:

blaadjes	0,0102%	HCN in de groene massa
bladstelen	0,0025%	HCN in de groene massa
stengels	0,0010%	HCN in de groene massa

Ook Askew (1934) constateerde hetzelfde. Daar hij zijn cijfers opgeeft in  $\text{cm}^3 \text{AgNO}_3$ , zullen wij die hier niet citeeren. De verhouding van het HCN-gehalte in de groene massa der blaadjes tot dat der stelen is bij hem voor één onderzochte klaver op twee verschillende data 7,00 : 1 en 7,46 : 1 en voor een andere klaver 3,33 : 1 en 2,63 : 1. Voor Mirande's cijfers zou dit 4,08 : 1 worden.

Ware (1925) kon met zijn pikrinezuurpapier geen HCN ontdekken in fijngemaakte wortels, stengels, bladstelen, bloemstelen en bloemen van het bedoelde gewas.

In Tabel 7 zijn gegevens hierover te vinden. Eenige malen konden wij de verhouding van de HCN-gehalten berekenen, zoowel uitgedrukt op groene massa als op droge stof. Uit deze cijfers zien wij, dat de verhouding in gehalte van blaadjes en stelen van stam tot stam zeer kan verschillen, terwijl ook bij één stam (geen klone) deze verhoudingen niet stabiel zijn, al is dit bij de berekening op de droge stof in meerdere mate het geval dan bij berekening op de groene massa.

Wanneer men dus het HCN-gehalte van blaadjes en stelen te zamen bepaalt, dan wordt de uitkomst mede beïnvloed door genoemde wisselende verhouding in gehalte van HCN in blaadjes en stelen. Een dergelijk cijfer mag dan waarde hebben uit een oogpunt van het vervoederde product, uit plantenfysiologisch oogpunt heeft het geen waarde, zooals ook te verwachten was, gezien de totaal verschillende functie van bladschijf en -steel.

Er bestaat echter nog een ander bezwaar tegen het bemonsteren van blaadjes plus stelen. De gewichtsverhouding van blaadjes en stelen in het monster behoeft niet constant te zijn. Bij vergelijking van verschillende klaverrassen t.o.v. het HCN-gehalte speelt dus ook deze verhouding een rol.

Uit de cijfers van Tabel 7 zien wij, dat deze verhouding van klaverstam tot klaverstam sterk kan variëren, b.v. 1,25 : 1 bij no 1 in de groene massa en 0,9 : 1 bij no 5 (monsternamen op zelfden dag en uur), terwijl de verhouding voor Nieuw-Zeelandsche klaver no 6 op verschillende dagen en uren ook zeer uiteenloopt. Bij deze komen wij van 2,0 : 1 (3-8-'38) op 1,09 : 1 (22-9-'38) en 0,75 : 1 (21 en 23-9-'38), dus alles binnen één stam.

Het is goed extra te onderstrepen, dat de hier berekende  $\frac{\text{blaadjes}}{\text{steel}}$ -verhouding niet de voor den stam karakteristieke verhouding is, maar de voor het monster karakteristieke verhouding. Er is toch geen enkele voorzorg genomen, dat de bladstelen volledig werden geplukt, zoodat hierin variaties hun verklaring kunnen vinden.

Wij hebben hier dus te maken met een contrôle op de regelmatige samenstelling van een mengmonster blaadjes en stelen. Uit dien hoofde is dus de bemonstering van blaadjes en stelen te zamen te verwerpen. Dit neemt niet weg, dat de voor den stam karakteristieke verhouding van blaadjes en stelen grooten invloed zal hebben op de verhouding in het monster.

Het door Doak bepaalde HCN-gehalte van witte klaver in de totale groene massa (blaadjes en stelen te zamen) was dus niet alleen afhankelijk van het vochtgehalte (uitwendig en inwendig), maar tevens van de  $\frac{\text{blaadjes}}{\text{steel}}$ -verhouding in het monster, welke afhankelijk is van variaties, die optreden bij een zooveel mogelijk gelijke wijze van bemonsteren, en welke eveneens wordt beïnvloed door de  $\frac{\text{blaadjes}}{\text{steel}}$ -verhouding karakteristiek voor den onderzochten klaverstam, die wisselt met het groeistadium; verder was dit gehalte afhankelijk van de verhouding van het HCN-gehalte in blaadjes en stelen. Al met al een gecompliceerd verband, dat men in zijn factoren zal moeten splitsen, wil men het verder onderzoeken. Voor een aanzienlijk deel zal men hier de oorzaak moeten zoeken van de dag-tot-dag-schommelingen en de schommelingen van seizoen tot seizoen, welke door Doak werden geconstateerd.

Plantenphysiologisch zal men dus goed doen te werken met de blaadjes alleen. Voor praktijkbepalingen, gelijk voor een keuringsschema, heeft dit een groot nadeel, nl. de enorme hoeveelheid werk, die verbonden is aan het scheiden van blaadjes en stelen, zoolang voor het quantitatief bepalen van het blauwzuur uitgegaan moet worden van groote quanta blaadjes, omdat de gebruikte HCN-bepaling (Liebig-Denigès) niet gevoelig genoeg is. Ook hier geldt weer, dat men vaak veel aan nauwkeurigheidseischen zal opofferen om cijfers te verkrijgen, die nog practisch te bepalen zijn bij

het aanwenden van weinig arbeid en, daarmee veelal gepaard gaande, bij het verrichten van groote aantallen analyses per dag.

Dit geldt als algemeene eisch, wil selectie op chemische eigenschappen uitvoerbaar zijn. Oppervlakkig bezien voldoet hieraan het pikrinezuur-papier, echter is hierbij de nuanceering te gering.

Opnieuw werd thans het HCN-gehalte bepaald van de Nieuw-Zeeland-sche klavers, die in Nederland waren uitgezaaid.

De resultaten zijn neergelegd in Tabel 8, waarbij zij opgemerkt, dat de bepaling voor no 6, ter vergelijking, uit andere reeksen van waarnemingen werd gelicht.

TABEL 8

*HCN-gehalte van 6 Nieuw-Zeeland-sche witte klavers, in 1938 in Nederland verbouwd*

no	klasse	datum	uur	HCN in de blaadjes		HCN in de stelen	
				groene massa	droge stof	groene massa	droge stof
1	Uncertified . . .	22-8-'38	12.00	0,0018	0,011	0,0005	0,005
				0,0020	0,012		
2	Uncertified . . .	22-8-'38	12.00	0,0064	0,038	0,0012	0,012
				0,0064	0,038		
3	Permanent Past. .	23-8-'38	12.00	0,0110	0,058	0,0014	0,011
				0,0106	0,057		
4	Permanent Past. .	22-8-'38	12.00	0,0044	0,028	0,0022	0,022
				0,0038	0,024		
5	Mother Seed . . .	22-8-'38	12.00	0,0128	0,090		
				0,0130	0,092		
				23-8-'38	12.00		
6	Mother Seed . . .	18-8-'38	12.30	0,0152	0,090	0,0044	0,046
				0,0194	0,124		
				0,0204	0,130		

De beteekenis van het berekenen van het HCN-gehalte op de droge stof wordt in Tabel 8 fraai geïllustreerd aan no 5 op 22 en 23 Augustus 1938, bij welke bepalingen de gehalten in de groene massa niet kloppen, maar die berekend op de droge stof wel. Reeds in Tabel 6 werd geconstateerd, dat het HCN-gehalte van no 2 hooger ligt dan uit hoofde van de keuringsklasse verwacht mocht worden; dit wordt thans bevestigd. No 2 en 4 hadden in Tabel 6 nog ongeveer gelijke waarden, thans blijkt no 2, zoowel bij berekening op de groene massa als op de droge stof, een hooger gehalte te hebben dan no 4. Nemen wij no 5 als standaard voor de beide dagen, waarop monsters zijn genomen, dan is de uitkomst voor no 3, wat betreft het gehalte aan HCN in de groene massa (blaadjes) te corrigeren en wel tot 0,0090%. De rangschikking der witte klavers was, zooals wij hen geklasseerd uit Nieuw-Zeeland ontvingen (van laag naar hoog):

1-2-3-4-5-6, terwijl volgens onze Tabel 8 de rangschikking wordt: 1-4-2-3-5-6. Hier kan worden opgemerkt, dat men de Nieuw-Zeelandse klassegrenzen niet op onze cijfers mag toepassen, daar zij gelden voor blaadjes plus stelen en dus volgens normale verwachting lager zullen liggen dan voor blaadjes alleen, die wij analyseerden.

Er restte ons nog na te gaan of in de in Nederland gevonden witte klaver HCN kan worden aangetoond en of het hierbij gaat om even groote variaties en hoeveelheden als in Nieuw-Zeelandse witte klaver.

Hiertoe konden wij beschikken over een aan de Afdeling Landbouwplantenteelt van de Landbouwhoogeschool bijeengebrachte verzameling witte-klaver-klonen. Deze collectie was ontstaan, doordat in 1935 rijpe bloemhoofdjes van witte klaver, over geheel Nederland verspreid, in graslanden of op grasbermen voorkomend, waren verzameld; deze zijn hoofdjesgewijs uitgezaaid, nadien stam- en plantsgewijs beoordeeld, langs ongeslachtelijken weg vermenigvuldigd tot klonenveldjes van 1 m<sup>2</sup> en kort gekarakteriseerd.

De HCN-bepalingen werden verricht aan planten, die drie jaar oud waren, terwijl de beschrijving was opgesteld aan tweejarige planten. In Tabel 9 zijn de resultaten samengevat. Wij bepaalden, ondanks bovenstaande uiteenzettingen, het HCN-gehalte van blaadjes en stelen te zamen. Dit gebeurde om deze eerste uitkomsten, verkregen aan Nederlandsche witte klavers, direct te kunnen vergelijken met het keuringsschema van Nieuw-Zeeland.

Van de 19 onderzochte Nederlandsche witte-klaver-klonen waren er op grond van het HCN-gehalte 6 geschikt voor plaatsing in de Nieuw-Zeelandse gecertificeerde klassen Mother Seed of Permanent Pasture. Tweemaal waren twee van deze zes verkregen uit hetzelfde bloemhoofdje; deze hadden dus dezelfde moederplant, zoodat wij te maken hebben met afstammelingen van vier planten van drie verschillende vindplaatsen in ons land.

Als aanhang werd in Tabel 9 nog een enkele waarde voor andere witte-klaver-stammen gegeven, welke wederom aan het verschil gecultiveerde en wilde witte klaver voldoen.

De bovengenoemde Nederlandsche witte-klaver-klonen toonden, hoewel in het wild verzameld, in vele gevallen geen uitgesproken „wilde witte klaver“-type. Het is in dit verband merkwaardig, dat bij de beoordeeling te velde op 12 Juli 1938<sup>1)</sup>, als goede witte klavers werden genoteerd 6 klonen, waartoe o.a. behoorden de no's 157.1 en 167.1 als zijnde meer weide-typen, terwijl deze bij de HCN-analyse juist zeer arm aan HCN bleken. Echter werd ook onder genoemde zes genoteerd no 143.2, met meer een karakter van gecultiveerde witte klaver; no 143.2 heeft echter een hoog HCN-gehalte.

---

<sup>1)</sup> De beoordeeling van de mate van wintervastheid stamt van later datum.

TABEL 9

## HCN-gehalte van in Nederland verzamelde witte klaver (klonen)

sel. no.	vindplaats (grondsoort) van het zaad	datum	uur	procenten HCN in blaadjes + stelen	
				groene massa	droge stof
111	Harenkarspel; klei . . . . .	7-9-'38	12.30	0,0020	0,010
				0,0016	0,008
127	Wateringen; zavel . . . . .	7-9-'38	12.30	0,0013	0,007
				0,0010	0,005
131	„ „ . . . . .	8-9-'38	8.30	0,0006	0,004
				0,0008	0,006
143.1	„ „ . . . . .	16-9-'38	8.00	0,0042	0,027
				0,0037	0,024
143.2	„ „ . . . . .	8-9-'38	8.30	0,0039	0,031
				0,0032	0,025
148.1	Naaldwijk; zavel . . . . .	16-9-'38	8.00	0,0025	0,013
				0,0027	0,014
150	„ „ . . . . .	8-9-'38	9.30	0,0003	0,002
				0,0005	0,003
157.1	„ „ . . . . .	8-9-'38	9.30	0,0005	0,003
				0,0003	0,002
166	De Lier; zeer zware klei . . .	9-9-'38	10.00	0,0012	0,008
				0,0010	0,006
167.1	„ „ „ „ „ . . .	9-9-'38	10.00	0,0006	0,003
				0,0004	0,002
170.1	Dordrecht; zware klei . . . .	12-9-'38	12.00	0,0123	0,075
				0,0128	0,078
170.2	„ „ „ . . . .	12-9-'38	12.00	0,0089	0,055
				0,0098	0,060
173	„ „ „ . . . .	12-9-'38	12.00	0,0045	0,025
				0,0043	0,024
215	Rouveen; laagveen . . . . .	12-9-'38	15.00	0,0015	0,008
				0,0018	0,009
221.1	Mandjeswaard (Kampen); klei	12-9-'38	15.00	0,0020	0,011
				0,0017	0,009
230	„ „ „	12-9-'38	15.00	0,0018	0,011
				-	-
248	„ „ „	14-9-'38	12.00	0,0073	0,036
				0,0072	0,036
252	„ „ „	14-9-'38	12.00	0,0017	0,008
				0,0015	0,008
274.2	Zutphen; leemh. zandgrond .	14-9-'38	12.00	0,0020	0,010
				0,0018	0,009
	Gecultiveerde witte klaver, Pajbjerg Grassmark (Wiersum)	14-9-'38	14.00	0,0014	0,011
				0,0013	0,010
	Gecultiveerde witte klaver, Morsö (van der Have)	13-9-'38	15.00	0,0009	0,007
				0,0010	0,008
	Gecultiveerde witte klaver, Special Stock Norfolk (Centr. Bur.)	13-9-'38	15.00	0,0019	0,015
				0,0016	0,013
	Wilde witte klaver, Oud weiland Essex (Centr. Bureau)	14-9-'38	14.00	0,0118	0,083
				0,0106	0,074



Een korte beschrijving van de Nederlandsche klaver-klonen volgt hier:

- no 111. Iets omhoog groeiende plant, sterk spreidend, weinig bloem (gesteelde bloempjes), middelmatig groot blad. Goede plant. Heeft de strenge winters niet overleefd.
- no 127. Eenigszins spreidend, vrij veel bloem, donker, middelmatig groot blad. Heeft de strenge winters niet overleefd.
- no 131. Middelmatig aantal bloemen, dichte bladbezetting, donker, tamelijk groot blad.
- no 143.1. Matig spreidend, vroeg bloeiend, middelmatig aantal bloemen, dichte bladbezetting, middelmatig groot blad. Uitgewinterd.
- no 143.2. Lager dan 143.1, weinig, rose getinte bloemen. Vrij goed overwinterd. Goede plant.
- no 148.1 Laag, tamelijk spreidend, middelmatig aantal bloemen, vroeg bloeiend, dichte bladbezetting, vrij klein blad.
- no 150. Weinig spreidend, vrij donker, middelmatig groot blad. Goed door de winters gekomen.
- no 157.1. Laag, bijzonder veel massa. Goede witte klaver. Een weidetype.
- no 166. Hoog, veel lange uitloopers, geen bladmerk, vrij groot blad, vroeg bloeiend.
- no 167.1. Laag, vroeg bloeiend, vrij veel bloemen, donker, middelmatig klein blad. Meer een weide-type. Goede plant.
- no 170.1. Spreidend, weinig bloemen, middelmatig groot blad. Mooie plant. Helaas uitgewinterd.
- no 170.2. T.o.v. no 170.1: lager, meer bloemen, kleiner blad. Uitgewinterd.
- no 173. Heel laag, fijn, kruipend type. Veel bloem. Goed door de winters gekomen. (In 1941 de eenige nog overgebleven goede witte klaver van alle klonen uit deze collectie.)
- no 215. Middelmatig groot blad. Goed door de winters gekomen.
- no 221.1. Sterk spreidend weide-type, laat en weinig bloeiend, mooi, donker, klein blad.
- no 230. Mooi hoog type, laat bloeiend, middelmatig groot blad.
- no 248. Vrij hoog, laat met matig aantal bloemen, slechte bladbezetting, klein blad.
- no 252. Mooie pol, veel late bloei, dichte bebladering, blad niet te groot. Goed door de winters gekomen.
- no 274.2. Veel massa, klein blad, laag blijvend.

Teruggrijpende op Hoofdstuk II zou men hier in deze beschrijvingen kunnen gaan zoeken naar correlaties tusschen HCN-gehalte en bepaalde plantenkenmerken, speciaal die, welke een sterke stikstofvoeding aangeven. Neemt men die moeite, dan zal men geen enkele regelmaat kunnen ontdekken bij dit betrekkelijk kleine aantal gevallen, geheel in overeen-

stemming met de uitspraak van Ware (1925). Daarbij komt, zooals wij reeds opmerkten, dat zich onder deze, in het wild verzamelde, Nederlandsche witte klavers de meest uiteenlopende typen bevinden, neigende aan den eenen kant naar de gecultiveerde witte klaver en aan den anderen kant naar het weide-type.

Wanneer men dus een bevestiging zoekt van onze stikstofhypothese, dan zal men witte-klaverplanten moeten vergelijken, die zooveel mogelijk gelijk zijn, hetgeen naar onze meening voor de zes Nieuw-Zeelandsche klavers het geval was. Een dergelijke stikstofvoedings-modificatie zal vooral dan spreken, wanneer het verschil groot is, misschien mag men zeggen: wanneer het verschil in HCN-gehalte groot is. Ook dit ging voor de Nieuw-Zeelandsche klavers op. Aan deze eischen voldoen echter ook de verwante Nederlandsche klavers 170.1 en 170.2, waarbij wij dan ook weer de stikstofvoedings-symptomen terug vinden. Voor het verwante paar 143.1 en 143.2, die veel minder in HCN-gehalte verschillen, gaat het verband niet op.

De resultaten van de tot hier weergegeven waarnemingen kunnen als volgt worden samengevat.

Nieuw-Zeelandsche klaverstammen, in Nederland gegroeid, geven in het eerste groeijaar een HCN-gehalte van dezelfde orde van grootte als in Nieuw-Zeeland werd gevonden.

Nieuw-Zeelandsche onderzoekers hebben last van schommelingen in het HCN-gehalte van dag tot dag en van seizoen tot seizoen. Dit zal gedeeltelijk geweten moeten worden aan het feit, dat zij hun gehalten berekenen op de groene massa en niet op de droge stof en aan het feit, dat zij het HCN-gehalte bepalen van het mengsel van blaadjes en stelen, een mengsel waarvan de mengverhoudingen niet vaststaan en waarvan het HCN-gehalte van de componenten in verhouding evenmin constant is.

In klonen van Nederlandsche witte klaver, in het wild verzameld, werden HCN-gehalten aangetroffen van dezelfde orde van grootte als in de Nieuw-Zeelandsche witte klavers. Daarmede is vast komen te staan, dat in Nederland aandacht aan het cyanophore karakter van witte klaver dient te worden geschonken, gezien de Nieuw-Zeelandsche onderzoekingen.

Er zijn aanwijzingen, dat een hoog HCN-gehalte van een witte-klaverplant, hetgeen een specifieke eigenschap is, bepaald of bevorderd wordt door een sterke stikstofvoeding. Deze aanwijzingen, welke niet uit de literatuur of eigen waarnemingen afdoende kunnen worden weerlegd, zijn echter vooralsnog vaag.

## HOOFDSTUK IV

### PERIODIEKE SCHOMMELINGEN GEDURENDE DEN DAG VAN HET BLAUWZUURGEHALTE VAN ONDER NATUURLIJKE OMSTANDIGHEDEN GEGROEIDE WITTE KLAVERS

In het vorige Hoofdstuk hebben wij eenige oorzaken kunnen aangeven voor de variaties in het HCN-gehalte van dag tot dag, zooals deze door Doak en andere auteurs werden vastgesteld, nl. het vochtgehalte, de verhouding van blaadjes-massa tot steelmassa en de verhouding van het HCN-gehalte in de blaadjes tot het HCN-gehalte in den steel.

Men vindt echter in de literatuur aanwijzingen, dat het gehalte aan glucosiden in planten een dagelijkschen periodieken gang vertoont. Daar men zich uit deze aanwijzingen echter nog geen klaar beeld kan vormen, zullen wij deze hier stuk voor stuk weergeven.

Men vindt deze gegevens voor glucoside-planten in het algemeen, dus zoowel voor cyaan-glucosiden als voor andere. Men komt hen dan ook tegen in de plantenfysiologische en de landbouwkundige literatuur, zoowel als in die betreffende geneeskrachtige gewassen.

Bij deze laatste groep komen tevens de alcaloïde-planten zeer vaak ter sprake, waarbij men eveneens zoekende is naar een dagelijksche periodiciteit; uit den aard der zaak blijven deze gegevens betreffende alcaloïden hier buiten beschouwing.

Weevers (1902a,b) vermeldt in zijn proefschrift eenige waarnemingen betreffende salicine (geen cyaan-glucoside; voorkomende bij de geslachten *Salix* en *Populus*). Hem bleek een vermindering van 20 tot 30% van de salicine-hoeveelheid in de bladeren gedurende den tijd van na zons-  
ondergang tot vlak voor zonsopgang, in zijn geval bedragende totaal 8 uur. Gedurende den dag neemt het gehalte weer toe. Deze onderzoekingen hadden plaats in Nederland.

Treub (1904) heeft de variatie in HCN-gehalte gedurende den dag nagegaan bij *Phaseolus lunatus*. Hij bemonsterde te Buitenzorg de planten iederen dag driemaal, nl. omstreeks 6 uur a.m. (zonsopgang), omstreeks 12 uur en omstreeks 5 uur p.m., eenmaal gedurende een tijdvak van 9 achtereenvolgende dagen en eenmaal gedurende 5 achtereenvolgende dagen. Voor beide perioden vermeldt Treub tevens meteorologische gegevens (minimum-, maximum- en gemiddelde temperatuur; neerslag, relatieve luchtvochtigheid en aantal zonne-uren). De periode van 9 dagen

was abnormaal regenachtig. Treub komt tot de conclusie (pag. 100): „L'examen des chiffres... fait ressortir l'absence de toute régularité entre la teneur en acide cyanhydrique et le moment de la récolte des folioles.”

Deze conclusie neemt niet weg, dat hij bij het begin van dit onderzoek opmerkt (pag. 97): „Si l'on examine de grand matin (vers 6 h.) par la méthode comparative, des folioles ou des parties de folioles, de feuilles à moitié développées, on en trouve ne présentant pas ou presque pas de réaction de bleu de Prusse. L'examen, à midi ou le soir à 6 h., des folioles ou des parties correspondantes à celles du matin, démontre une augmentation plus ou moins prononcée de l'acide cyanhydrique (sous sa forme quasi-libre).” „Dans de jeunes feuilles on trouve parfois des différences analogues entre les folioles récoltées le matin, à midi et le soir.”

Elders zegt Treub (1907) over deze onderzoeken (pag. 103): „Lors de l'investigation du *Phaseolus lunatus*, j'ai trouvé parfois dans les feuilles une augmentation de l'acide cyanhydrique dans le courant de la journée, ou bien un maximum vers midi. Quelques exemples en ont été donné ici même. Mais un grand nombre de dosages faits sur les trois folioles des mêmes feuilles, récoltées le matin, à midi et le soir, a fait ressortir pour les feuilles de cette plante, l'absence de tout rapport régulier entre les proportions de l'acide cyanhydrique et les moments de la récolte des folioles.”

Terzelfder plaatse deelt Treub (1907) mede, dat ook bij *Indigofera galeoides* geen enkel verband is geconstateerd tusschen HCN-gehalte en uur van pluk der bladeren, ondanks „fort nombreux dosages”. Bij *Passiflora minima* werd echter door hem een maximum om het middaguur geconstateerd, al zijn de verschillen in gehalte gering. Bij dit laatste onderzoek (gedurende 12 dagen) werden de bladen geoogst één uur na zonsopgang, op het middaguur en één uur voor zonsondergang. De gehaltecijfers zijn berekend op het versche blad; de HCN-bepalingen geschieden met zilvernitraat.

Dezelfde onderzoeker vermeldt ook nog het volgende (Treub, 1910): „...M.M. Ravenna et Peli ont trouvé que dans la grande majorité des cas le principe en question (het blauwzuur, Schr.) subit une augmentation bien prononcée dans le courant d'une seule journée. Il se trouva, ensuite, que cette augmentation n'est pas due à l'action directe de la lumière solaire, mais qu'elle est en rapport avec la formation de produits de l'assimilation du carbone.”

Dit onderzoek van Ravenna en Peli (1907) had plaats aan *Sorghum vulgare*; de monsters, waaruit bovenstaande conclusie werd afgeleid, werden genomen des morgens vroeg en des avonds.

Willaman en West (1916) werkten eveneens met *Sorghum vulgare*, dus een cyaan-glucoside-houdende plant. Hoe het mogelijk is, gezien boven uiteengezette uitlatingen van Treub, dat deze auteurs hem „doen vinden”, dat *Pangium edule* een HCN-maximum vertoont om het middaguur, is ons niet duidelijk. Om dit feit te controleeren voor *Sorghum*, verrichtten

Willaman en West eenige analyses bij zonsopgang en zonsondergang (sic), met het volgende resultaat:

		% HCN (vermoedelijk op de droge stof)	
		zonsondergang	zonsopgang
varieteit N . . . . .	bladen	0,015	0,012
varieteit N . . . . .	stengels	0,013	0,014
Dakota Amber . . . . .	bladen	0,020	0,023
Dakota Amber . . . . .	stengels	0,023	0,031

„There seems to be no constant variation in sorghum between night and day. This lends support to the view that dhurrin<sup>1)</sup> is not a food storage.” (De plaats van onderzoek is vermoedelijk Minnesota).

Dafert (1921) werkte met *Digitalis purpurea* L. Bij *Digitalis* heeft men te maken met een mengsel van glucosiden, die te zamen de geneeskrachtige werking geven (geen cyaan-glucosiden). Deze eigenschap werd door Dafert, op de gebruikelijke wijze, door injectie bij kikvorschen, bepaald. Hij bemonsterde op tweemaal twee achtereenvolgende dagen des namiddags (om 5.15 uur en de 2de maal om 6 uur) en des morgens (om 4 uur en om 3.45 uur). Dafert concludeert: „Die nachmittags gewonnene Droge ist demnach bedeutend wirksamer als die Frühdroge,...” „Man wird also die Pflanzen am besten dann sammeln, wenn sie am wirksamsten sind, das ist nach ausreichender Assimilation.” (Plaats van onderzoek vermoedelijk Weenen).

Narasimha Acharya (1933) (te Coimbatore, Britsch-Indië) werkte wederom met *Sorghum vulgare*; hij geeft de volgende cijfers:

uur van den dag	mg HCN per 100 g droge stof
6 a.m. . . . .	34,7
8 a.m. . . . .	42,3
10 a.m. . . . .	54,2
12 's middags . .	60,8
2 p.m. . . . .	66,9
4 p.m. . . . .	62,8
6 p.m. . . . .	59,1
6 a.m. . . . .	36,2

Hij concludeert: „The figures show that the prussic acid content per plant is lowest in the mornings and increases to a maximum at about 2 p.m., after which there is a slow fall till 6 p.m. followed by a rapid decrease in the night. The variation in prussic acid content shows a striking parallelism to the variation in photosynthetic activity and of

<sup>1)</sup> Het glucoside in *Sorghum*.

protein metabolism in the plant, and lends support to the hypothesis that the formation of the cyanogenetic compounds is a normal part of the protein metabolism of the plant."

Deze cijfers rechtvaardigen niet het onderscheid, dat Narasimha Acharya maakte voor de daling van het HCN-gehalte na 2 uur maar voor 6 uur en die na 6 uur. De eerste zou langzaam en de tweede snel zijn, terwijl in werkelijkheid per uur berekend de hoeveelheid HCN daalt van 2-4 uur met 2,05 mg, van 4-6 uur met 1,85 mg en van 6 uur p.m.-6 uur a.m. met 1,57 mg per uur.

De bepaling van HCN door Marais en Rimmington (1934) in *Dimorphotheca cuneata* LESS. kan buiten beschouwing worden gelaten, daar de bepaling, verricht aan 's morgens vroeg geplukt materiaal en die, verricht aan materiaal verzameld op het middaguur van een warmen dag, niet met elkaar mogen worden verbonden, daar zij blijkbaar niet van denzelfden dag zijn (althans wordt dit niet uitdrukkelijk vastgesteld). Wel is hier frappant, dat het gehalte aan HCN in de bladen des middags ongeveer driemaal (352,2 mg HCN/100 g droge stof) het gehalte van 's morgens bedraagt (131,4 mg HCN/100 g droge stof).

Leemann (1935) bespreekt het onderhavige punt; hij merkt daarbij op, dat hij in *Eustachys paspaloides* meer HCN vond in den morgen dan in den namiddag. De weergave door Leemann van het onderzoek van Willaman en West (1916) is onjuist.

Kerstan (1934) ging de dagelijksche schommelingen na in het glucosidegehalte van bladen van *Aesculus carnea*, *Aesculus Hippocastanum* en *Salix fragilis*. Hij deed dit door de in de glucosiden gebonden hoeveelheden suiker te bepalen; tevens bepaalde hij monosen, saccharose en zetmeel. Hij vond de volgende cijfers.

datum	uur	mg glucoside-suiker per g groene massa
<b>Aesculus carnea:</b>		
3-8-'31 . . . . .	20.00	1,45
4-8-'31 . . . . .	4.00	0,57
13-8-'31 . . . . .	8.15	0,84
	12.00	1,56
	16.00	2,01
	19.45	1,44
<b>Aesculus Hippocastanum:</b>		
12-7-'32 . . . . .	18.00	1,49
13-7-'32 . . . . .	8.00	0,62
	12.15	1,81
<b>Salix fragilis:</b>		
17-8-'32 . . . . .	18.00	2,56
18-8-'32 . . . . .	9.00	0,80
	12.00	1,97

Deze onderzoeker concludeert hieruit: „..., ist tagesperiodisch eine auffallende Parallelität zwischen den K.H. (koolhydraten, Schr.) und Glukosidschwankungen zu verzeichnen. Die Glukoside nehmen bei Nacht entsprechend den K.H. ab und reichern sich im Laufe des Tages im Blatt wieder an, schon mittags finden wir 100–200% Zunahme des Morgenwertes. Am Nachmittag ist dann die Zunahme entsprechend derjenigen der übrigen K.H. geringer. Die Menge und daher auch die Zunahme des Glukosides ist absolut gering im Vergleich zur K.H.-Synthese, sie beträgt etwa 5%, so dass die K.H. als begrenzender Faktor bei der Glukosidbildung nicht in Frage kommen. Freilich wird massenwirkungsmäßig die Glukose hier allein eine Rolle spielen. Wir finden auch stets nur wenig Monosen, irgendwelche quantitativen Beziehungen zum Glukosidzucker lassen sich aber aus den Ergebnissen nicht ablesen.”

Stekelenburg (1931, pag. 365 e.v.) vindt voor *Prunus Laurocerasus* L. voor de hoeveelheid HCN in de bladen, bij bepaling van een ochtendwaarde en een avondwaarde, voor één bepaalden dag een toename overdag, maar kan gedurende één nacht, waarbij alweer een avond- en een ochtendwaarde werden bepaald, geen afname van HCN constateeren, eerder een toename!

Seiler (1922) vond echter wel een afname van HCN gedurende den nacht bij *Prunus Laurocerasus*.

Overzien wij deze gegevens, dan blijken Weevers, Ravenna en Peli, Willaman en West, Dafert, Stekelenburg en ook Seiler telkens met elkaar vergeleken te hebben twee waarden, die zijn aan te duiden als een avondwaarde en een ochtendwaarde, waarbij gevonden werd, dat het glucoside-gehalte overdag toenam en des nachts afnam. Wij concludeeren dit ondanks de enkele afwijkende waarnemingen, nl. bij Willaman en West en bij Stekelenburg.

Tegenover deze beide kunnen ook nog gesteld worden de meer gedetailleerde cijfers van Narasimha Acharya en van Kerstan, waaruit bij vergelijking der ochtend- en avondwaarden eveneens een toename overdag en een afname des nachts valt te concludeeren. Bij Treub vinden wij bij vergelijking der ochtend- en avondwaarden beide gevallen terug.

Het bepalen van twee punten is echter in het algemeen niet voldoende om een behoorlijk physiologisch inzicht te krijgen in de gedragingen van de glucosiden gedurende den dag en den nacht. Treub, Narasimha Acharya en Kerstan hebben daarmede dan ook geen genoegen genomen. Treub nam meestal drie punten, nl. des morgens, des middags en des avonds. Hoewel hij in eenige gevallen geen regelmaat kon ontdekken, vond hij bij één geval het maximum rond het middaguur. Wij vestigen er hier de aandacht op, dat Treub zijn bepalingen vele dagen achtereen voortzette, zoodat, hoewel zijn onderzoekingen mee van de oudste zijn, zij ook tot de meest complete behooren. Dit maximum rond het middaguur behoeft

niet in strijd te zijn met de waarnemingen van de bovengenoemde auteurs, die slechts twee punten bepaalden.

Bij Ravenna en Peli vindt men een aantal bepalingen waar de „avondbepaling” reeds om 15 uur, eenmaal zelfs om 14 uur, werd genomen. Men krijgt van deze cijfers den indruk, dat bij vergelijking van deze middagcijfers met het ochtendcijfer, het verschil grooter is dan bij vergelijking van avond- en ochtendcijfers. Dit zou wijzen in de richting van een maximum overdag.

Narasimha Acharya deed 8 bepalingen gedurende 24 uur en vond het maximum rond 2 uur in den middag. Dit onderzoek, zoowel als dat van Treub is in de tropen verricht. Het onderzoek van Narasimha Acharya behoeft wederom niet noodzakelijk in strijd te zijn met dat van Treub, want Treub bepaalde slechts drie punten. Blijft tenslotte het onderzoek van Kerstan, dat plaats vond in een gematigd klimaat (Leipzig). Deze vond bij één meer gedetailleerde bepaling het maximum om 16 uur.

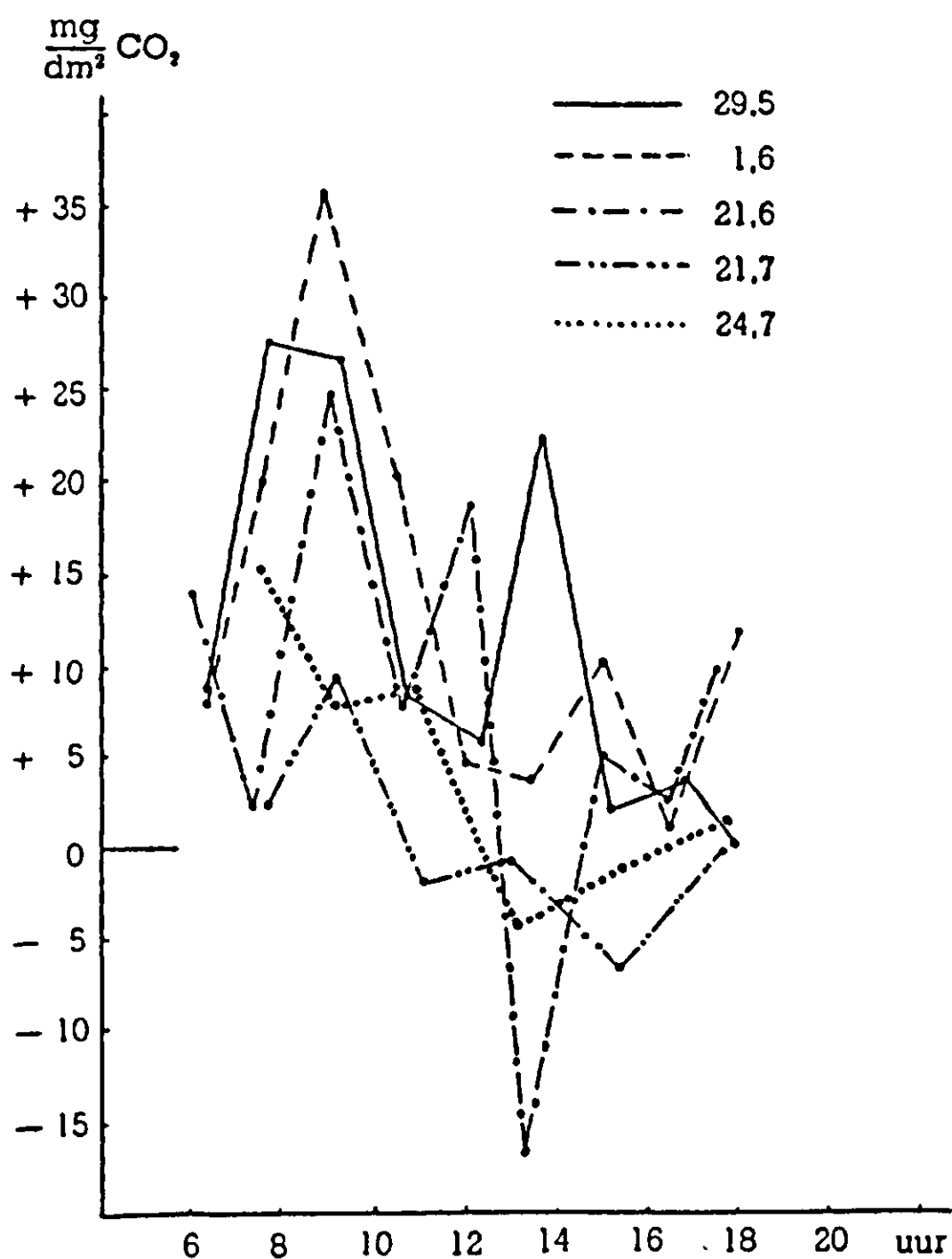
Er rest ons nog de opmerking van Leemann, die een maximum des ochtends meent gevonden te hebben.

In de citaten hebben wij reeds naar voren doen komen, dat de verschillende auteurs de periodiciteit in het optreden van HCN in de plant meenen te moeten zien in verband met de koolzuurassimilatie. Hierbij wordt dus meer aandacht geschonken aan dat gedeelte van de glucosiden, dat een suikerkarakter heeft, terwijl wij in Hoofdstuk II het witte-klaver-glucoside meer geplaatst hebben in het kader van de stikstofverbindingen en de stikstofvoorziening van de plant. Sinds Treub de bekende hypothese opstelde, waarbij aan het HCN een plaats werd toegekend in de eiwit-synthese, zijn de cyaan-glucosiden zeer veel van uit dien hoek belicht. Dit neemt niet weg, dat ook het andere gedeelte van het glucoside ten aanzien van het ontstaan en verdwijnen daarvan een rol zal spelen. Het enzymatische afbraak-proces van de glucosiden is, zooals bekend, een omkeerbaar proces; dezelfde enzymen zijn in staat het glucoside wederom op te bouwen, wanneer de concentratie van de componenten daartoe gunstig is. De dagelijksche periodiciteit, welke wij hierboven uit de literatuur hebben beschreven, is zoowel geconstateerd bij cyaan-glucosiden als bij andere. Het is dus niet aannemelijk, dat deze periodiciteit in verband staat met den cyaan-component (het aglucon) van het glucoside en daardoor in verband staat met de stikstof-stofwisseling. Veeleer is het waarschijnlijk, dat deze periodiciteit verband houdt met het suikerachtige gedeelte (het glucon) van het glucoside.

Daarbij komen dan de waarnemingen van het meerendeel der boven aangehaalde auteurs, die een treffende overeenkomst vonden tusschen de gehalten 's morgens en 's avonds met de gehaltewijzigingen van de assimilaten, zooals deze vastgesteld zijn in de proeven van Sachs. Kerstan (l.c.) die beide naast elkaar bepaalde (éénmaal met 4 punten) vond een volledige parallelliteit.



De waarnemingen van Treub, Narasimha Acharya en van Leemann met hun maximum aan HCN rond het midden van den dag, waarvan die van de eerste twee, hetgeen wij niet moeten vergeten, de meest uitvoerige zijn, passen echter moeilijk binnen dit kader. Nogmaals zij opgemerkt, dat beide onderzoeken plaats hadden in de tropen. Leemann verwijst in dit verband naar een onderzoek van Yap (1920)



Grafiek 3. Assimilatie-curven van *Trifolium repens* L. volgens Kostytschew.

en brengt daarmee de vraag naar het verband tusschen glucosiden en verzamelde assimilaten over op glucosiden en assimilatie-intensiteit. Yap vond voor suikerriet op de Philippijnen een assimilatie-intensiteit, gemeten aan de hoeveelheid verbruikt koolzuur, die van 8 tot 10 uur des morgens het grootste was, daarna van 10 tot 12 en van 12 tot 14 uur aanzienlijk was gedaald, om van 14 tot 16 uur weer te stijgen. Leemann vestigt in zijn korte opmerking vooral den nadruk op het in den voormiddag gelegen maximum aan assimilatie-intensiteit. Yap merkt nog op, dat het maximum aan zonnestralings-intensiteit ongeveer rond 14 uur lag. Eenzelfde maximum aan assimilatie-intensiteit gedurende den voormiddag vonden Heinicke en Childers (1937) vrij regelmatig bij hun zeer uitgebreide waarnemingen aan een appelboom. Deze niet regelmatige curven voor de assimilatie-intensiteit zijn later eveneens gevonden door

Kostytschew c.s. (1928, 1930 en meerdere andere publicaties); zij hebben toen nog al wat stof doen opwaaien, daar hiermede de voorstelling van de regelmatig verloopende assimilatie werd aangetast. Vermeld wordt o.a. ook een dergelijke curve voor *Trifolium repens*, welke (bij die uitwendige omstandigheden) tweetoppig was, nl. met een top om  $\pm 9$  uur en een om  $\pm 17.30$  of later (laatste waarneming van de reeks). In Grafiek 3 is deze curve met de andere drie waarnemingen betreffende *Trifolium repens* afgebeeld. Eenige regelmaat is niet te bespeuren. Opvallend is het ontbreken van assimilatie gedurende vele uren rond het middaguur. In Nederland kon Boonstra (1930) dit verschijnsel bij geen van de verschillende door hem onderzochte gewassen constateeren.

Tusschen deze assimilatie-curven en de lichtintensiteit kon geen direct verband worden gelegd; vele andere factoren spreken hier eveneens mede. Zonder nu de metingen aan suikerriet op de Philippijnen of aan witte klaver in den Trans-Kaukasus representatief te achten, kunnen wij wel concludeeren, dat men er op voorbereid moet zijn, dat de assimilatie-curve niet regelmatig behoeft te verlopen, maar dat dit eerder onregelmatig zal zijn onder natuurlijke omstandigheden.

Vertoont de assimilatie-curve echter onregelmatigheden, dan zal men er rekening mee moeten houden, dat, wanneer men verband zoekt tusschen de assimilaten-curve en de glucoside-curve, waarbij men naar een regelmatig verloop van dergelijke curven zoekt, deze regelmaat eveneens kan zijn verstoord.

Reeds Treub heeft naar verband tusschen weersgesteldheid en glucosidegehalte gezocht, zonder voor de dagelijksche periodiciteit enig verband te kunnen vinden. In afwijking van het onderwerp vestigen wij er de aandacht op, dat hij wel verband vond tusschen de gemiddelde hoogte van het HCN-glucoside-niveau, genomen over den geheelen dag en het weer van den voorgaanden dag.

Zooals gezegd, moet men er op verdacht zijn, wanneer men zekere wetmatigheden onder natuurlijke omstandigheden voor de dagelijksche periodiciteit van het HCN-gehalte in planten wil vaststellen, waarbij op een of andere wijze dan gedacht wordt aan een verband met de koolhydraatvorming in de plant, dat deze regelmatigheid slechts zal optreden òf als gemiddelde van vele waarnemingen òf onder zekere stabiele, ideale omstandigheden.

Men kan dit alles ook nog als volgt uitdrukken: wanneer Treub's waarneming juist is, dat het weer van het voorgaande etmaal bepalend is voor het gemiddelde HCN-niveau van de plant, dan zal men slechts een eventueele periodiciteit gedurende den dag terug vinden, als het niveau van meerdere opeenvolgende etmalen gelijk is, daar anders de dagelijksche periodiciteit overheerscht zal worden door de veranderingen in niveau, die zich voltrekken.

Ten aanzien van de beteekenis van de glucosiden hebben, in het algemeen gesproken, drie hypothesen opgeld gedaan (zie hierover b.v. als samenvatting Robinson, 1930). De eerste heeft betrekking op een zekeren beschermenden invloed, die deze vaak zeer vergiftige stoffen voor de plant zouden hebben. Wij behoeven hierop verder niet in te gaan. Veel aanhang telt deze hypothese niet meer.

In de tweede plaats heeft men de glucosiden wel beschouwd als stofwisselings-afvalproducten. Wanneer dit juist zou zijn, dan zou men met recht de vraag kunnen stellen, welk verband er bestaat tusschen deze afvalproducten en de eigenschappen, die Doak daarmee bij witte klaver vindt correleeren. Veel aannemelijker wordt deze correlatie bij de derde hypothese, waarbij aan de glucosiden gedurende het stofwisselings-proces een plaats wordt ingeruimd (dus niet als eindproduct). Dit is in de eerste plaats het geval bij de hypothese van Treub, terwijl men de glucosiden ook vaak het karakter van meer of minder tijdelijke reservestof heeft toegekend, dit laatste dan wederom meer of minder in verband met de koolhydraten-stofwisseling. Uit een dergelijk oogpunt is dan de dagelijksche periodiciteit aannemelijker te verklaren.

Wenden wij ons thans tot de witte klaver, dan valt dus in de eerste plaats na te gaan of iets van de besproken dagelijksche periodiciteit is waar te nemen, terwijl daarbij dan aanwijzingen kunnen worden gevonden betreffende de beteekenis van het HCN-glucoside. Blijkt deze beteekenis voor witte klaver te liggen binnen de eerste belangrijke stofwisselingsprocessen, dan is daarmee een aanwijzing verworven, dat de belangrijke plaats, welke Doak bij de selectie van witte klaver aan het blauwzuur inruimt, ook theoretisch gerechtvaardigd is, ofschoon het directe verband nog niet vast staat.

Daartoe zijn door ons de volgende proeven verricht.

Van Nieuw-Zeelandsche klaver no 6 werden op eenige achtereenvolgende dagen op drie verschillende tijdstippen monsters genomen en onderzocht op HCN, volgens de methode Liebig-Denigès. De drie tijdstippen komen overeen met des morgens, des middags en des avonds. Het HCN-gehalte werd zoowel berekend op de groene massa als op de droge stof. De cijfers hebben betrekking op de gehalten in de blaadjes, welke dus van de stelen werden gescheiden. Het meerendeel der bepalingen werd in duplo verricht; dit zijn dus duplo-monsters, niet b.v. alleen duplo titratie-cijfers. Een en ander is in Tabel 10 opgenomen. Hieraan zijn tevens toegevoegd de minimum- en maximum-temperatuur in °C, gemeten 2 m boven den grond, en de neerslag in mm, zooals opgenomen aan de Afdeeling Landbouwplantenteelt. Deze cijfers hebben steeds betrekking op één etmaal, dat des morgens om 8 uur aanvangt. Van meer beteekenis zal blijken te zijn de eveneens opgenomen zgn. Iw-waarde, uitgedrukt in gcal per cm<sup>2</sup>,

zijnde een maat voor de „dagsom van de watergefilterde horizontale straling”<sup>1)</sup>, welke waarde representatief is voor de photosynthetische straling. Deze straling wordt gemeten vanwege het Natuurkundig Laboratorium van de Landbouwhoogeschool, waarvan de uitkomsten zijn neergelegd in een publicatie van Zuidhof en de Vries (1940).

TABEL 10

datum	uur	% HCN in de groene massa	% HCN in de droge stof		Iw $\frac{\text{gcal}}{\text{cm}^2}$	neerslag mm	temp. °C	
				gem.			max.	min.
15-8-'38	12.—	0,0152	0,101	0,101	177	2,8	22,0	12,4
		—	—					
	18.—	0,0167	0,098	0,101				
		0,0180	0,104					
16-8-'38	8.15	0,0164	0,119	0,119	131	1,5	22,4	14,0
		—	—					
	12.15	0,0192	0,113	0,113				
		0,0190	0,112					
	18.—	0,0181	0,101	0,098				
		0,0168	0,094					
17-8-'38	8.30	0,0168	0,133	0,135	144	1,3	19,3	12,2
		0,0174	0,138					
	12.—	0,0192	0,120	0,120				
		0,0194	0,121					
	18.—	0,0196	0,116	0,115				
		0,0194	0,115					
18-8-'38	8.15	0,0208	0,128	0,130	150	0,2	18,8	12,0
		0,0216	0,133					
	12.30	0,0194	0,124	0,127				
		0,0204	0,130					
	18.—	0,0214	0,122	0,120				
		0,0208	0,118					
19-8-'38	8.—	0,0222	0,136	0,135	252	1,1	24,2	14,8
		0,0218	0,134					

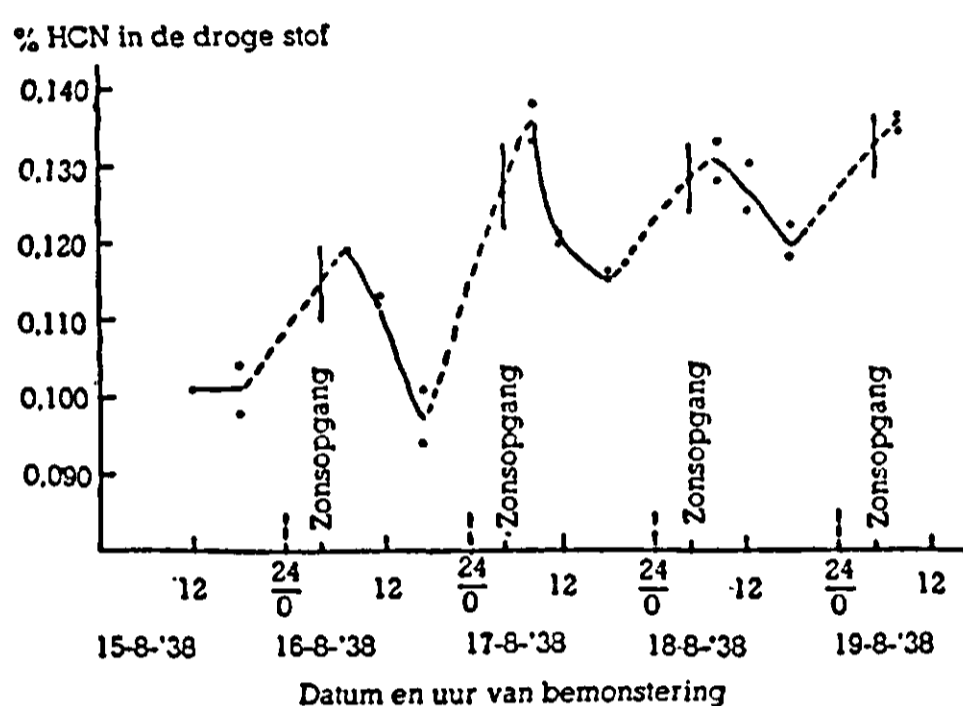
Alle uren zijn opgegeven in zonnetijd. De duplo-bepalingen kloppen behoorlijk met elkaar. Het grootste verschil bedraagt 0,0013 % in de groene massa; dit is een relatieve fout van 7,5 %, waarbij men bedenken moet, dat de duplo-cijfers afkomstig zijn van duplo-monsters, die dus digereeren, destilleeren, enz. zelfstandig hebben doorgemaakt. Waar bij deze bepalingen steeds werd uitgegaan van 50 g groene massa, wil de bovengenoemde afwijking zeggen, dat beide duplo's een verschil van 0,65 mg HCN gaven, overeenkomende met 0,6 cm<sup>3</sup> AgNO<sub>3</sub> 0,02 n bij de titratie. In volgende tabellen zijn de duplo-waarden niet meer vermeld.

Blijkens de neerslag-cijfers waren de dagen niet absoluut droog, er viel een weinig regen. Omtrent de temperatuur valt weinig op te merken. De Iw-waarde laat zien, dat van den eersten op den tweeden dag geen sprake

<sup>1)</sup> D.w.z. de watergefilterde stralings-energie in gcal per horizontale cm<sup>2</sup> per

is van een regelmatig verloop, wij maken daar een sterken val mee; dit wordt nog geaccentueerd door de waarden voor de vorige dagen, die voor 13-8-'38 en 14-8-'38 resp. bedroegen 121 en 222 gcal/cm<sup>2</sup>. In tegenstelling daarmee is de opeenvolging van waarden van den 16, 17 en 18 Augustus betrekkelijk regelmatig, nl. 131, 144, 150. Dus een lichte stijging. De waarde voor den laatsten dag is weer aanzienlijk gestegen, maar hiermede hebben wij niet meer te maken.

Bezien wij het percentage HCN in de groene massa, dan moeten wij concluderen, dat geen enkele regelmaat is te bespeuren. De cijfers volgen, over den dag verdeeld, in even groote grilligheid op elkaar, als de grilligheid, welke opvalt bij het bekijken van de cijfers, die Treub (l.c.) reproduceert voor HCN-bepalingen in de groene massa bij *Phaseolus lunatus*.



Grafiek 4, behorende bij Tabel 10.

Bezien wij echter het percentage HCN in de droge stof, dan krijgen wij een geheel ander beeld. Deze cijfers zijn afgebeeld in Grafiek 4. Vanaf 15 Augustus 18 uur zien wij een regelmatig verloop, met gedurende den dag steeds een daling van de lijn. Alleen de eerste bepaling sluit zich hier niet bij aan. Deze nu geeft het cijfer, dat onder invloed heeft gestaan van onregelmatigheden in het weer, die wij reeds aan de Iw-waarde demonstreerden.

Wanneer men in de Grafiek overeenkomstige uren op de verschillende dagen met elkaar verbindt, krijgt men een indruk van het verloop van het HCN-gehalte, afgezien van de dagelijksche, periodieke schommelingen. Treub nam ter demonstratie hiervan de gemiddelde waarde van alle waarden van een dag. Volgt men één van dit soort werkwijzen, dan kan men een correctie op de uurwaarden aanbrenge voor deze weersschommelingen, waardoor de absolute grootte van de dagelijksche periodiciteit nog beter te voorschijn treedt.

Bij de HCN-gehalte-cijfers, welke wij bepalen, hebben wij blijkbaar te doen met de uitkomst van één slingerende lijn (de dagelijksche periodiciteit) om een andere slingerende lijn (de weersschommeling). Dat uit een

dergelijke ingewikkelde figuur (vermoedelijk is de slingering van de dagelijksche periodiciteit wel regelmatig, althans tot op zekere hoogte, maar de weersslingering niet, terwijl beide ook nog een zekere binding vertoonen) uiteindelijke waarden te voorschijn kunnen komen, welke op het eerste gezicht niet zijn te interpreteren, behoeft geen verwondering te wekken.

En tenslotte het belangrijkste punt, dat uit Tabel 10 is af te lezen.

Wij vinden hier voor witte klaver in de maand Augustus gedurende den dag van 8 tot 18 uur een daling van het HCN-gehalte ondanks het feit, dat het totale gemiddelde HCN-gehalte op de onderzochte dagen stijgende is.

Op het eerste gezicht schijnt hiermede de onzekerheid haar toppunt te hebben bereikt. Uit de literatuur kennen wij zoowel de stijging overdag, als de stijging en daling overdag (maximum-curve); thans voegen wij daaraan een dalende curve toe. Dit is echter niet geheel juist. De stijgingen overdag, in de literatuur vermeld, zijn waargenomen tusschen zonsopgang en zonsondergang. Onze curven beginnen echter niet met zonsopgang (welke op 17 Augustus 1938 om 4.49 uur viel), maar eerst enkele uren later. Het is dus niet uitgesloten, dat deze curven, wanneer zij verder waren doorgetrokken geweest, zouden hebben behoord tot het type van de curve met een maximum, waarbij het maximum zeer vroeg ligt. Reeds eerder merkten wij op, dat ook de twee-punten-waarnemingen, welke een stijging gedurende den dag aangaven, niet principieel behoeven af te wijken van een dergelijke curve met top; de daling is dan bij zonsondergang nog niet zoover voortgeschreden (deze kan toch vermoedelijk den geheelen nacht doorgaan), dat de HCN-waarde reeds lager ligt dan bij zonsopgang, zoodat het lijkt of de curve stijgt.

Terloops kan worden opgemerkt, dat een dergelijke daling van het HCN-gehalte gedurende den dag, mits men de eerste waarneming betrekkelijk laat in den ochtend doet, niet alleen beperkt is tot de boven gebruikte Nieuw-Zeelandsche klaver, maar dat zij ook kan worden gevonden bij Nederlandsche witte klaver, zooals uit Tabel 11 voor klonen 173.1 op 27 September 1939 blijkt. Het verschijnsel was dus evenmin beperkt tot 1938.

De Iw-waarde bedroeg op 26-9-'39: 121 gcal/cm<sup>2</sup>. De stralingsintensiteit vertoonde dus een krachtige stijging gedurende de drie hier vermelde

TABEL 11

datum	uur	% HCN in de groene massa	% HCN in de droge stof	Iw gcal cm <sup>2</sup>	neerslag mm	temp. °C		% glucose in de droge stof
						max.	min.	
27-9-'39	9.00	0,0093	0,0448	178	0,0	11,6	-0,2	17,2
	15.00	0,0095	0,0408					24,0
28-9-'39	7.15	0,0076	0,0415	196	0,0	14,1	4,7	21,7
	13.30	0,0103	0,0415					25,2

dagen, krachtiger stijging dan die in Tabel 10. Neerslag viel er niet. In den nacht van 27 op 28 September daalde de temperatuur onder 0 °C. Er werd aangeteekend, dat het gewas op 28 September om 7.15 uur beijzeld was. Naast de HCN-waarde werd het totaal gehalte aan koolhydraten bepaald, in de Tabel aangegeven als berekend op glucose, verkregen door inversie met 3% HCl gedurende 3 uur bij 85°C, waarna Fehling-titratie. Deze gehalten stijgen normaal met het vorderen van den dag.

Het HCN-gehalte daalde op 27 September tusschen 9 en 15 uur (tweepunten-bepaling). Op den 28sten werd de eerste bemonstering aanzienlijk naar zonsopgang (om 5.56 uur) verschoven, terwijl daarmee vergeleken werd een monster kort na het middaguur genomen; de waarden zijn gelijk. Er valt reeds nu op te merken, naar aanleiding van de meening van Kerstan, dat van eenige parallelliteit tusschen HCN-gehalte en koolhydraat-gehalte hier geen sprake is.

Het valt op, dat het gehalte aan HCN op 28 September des morgens om 7.15 uur hooger is dan op 27 September om 15 uur. Wij zullen nog herhaaldelijk in de gelegenheid zijn, te constateeren, dat de waarde bij zonsondergang lager is, dan bij den daaropvolgenden zonsopgang. Bij betere voorbeelden dan het onderhavige zullen wij in de gelegenheid zijn er op in te gaan.

Wij gaven Tabel 11, omdat dit een van de weinige waarnemingen is, die wij betreffende de dagelijksche HCN-schommelingen verrichtten aan Nederlandsche witte klaver. Overigens leenden deze klavers ten gevolge van hun lager HCN-gehalte (althans de ons ter beschikking staande klonen) zich minder goed voor deze onderzoekingen, zoodat verder gebruik werd gemaakt van verschillende Nieuw-Zeelandsche witte klavers.

Wij hebben boven verondersteld, dat de dalende curve van Tabel 10, mits zij verder naar zonsopgang ware doorgetrokken geweest, tot het type van een curve met een maximum zou blijken te behooren en wel in dit geval met het maximum zeer vroeg.

Dat dit zich inderdaad voordoet, moge in eerste instantie blijken uit Tabel 12.

Tabel 12 heeft betrekking op Nieuw-Zeelandsche klaver no 6. Ook bij deze bepalingen kunnen wij een assimilaten-cijfer vermelden, zijnde alle na inversie ontstane reduceerende suikers als glucose uitgedrukt. Behalve de Iw-waarde, zijn wij in de gelegenheid eveneens te vermelden de uurwaarden voor de It (zie de reeds genoemde publicatie van Zuidhof en de Vries, 1940), zijnde de totale stralingsintensiteit, zonder waterfiltering. Deze uurwaarden worden niet van de Iw berekend. Het Natuurkundig Laboratorium van de Landbouwhoogeschool (Directeur Prof. Dr J. A. Prins) was zoo welwillend deze gegevens te onzer beschikking te stellen.

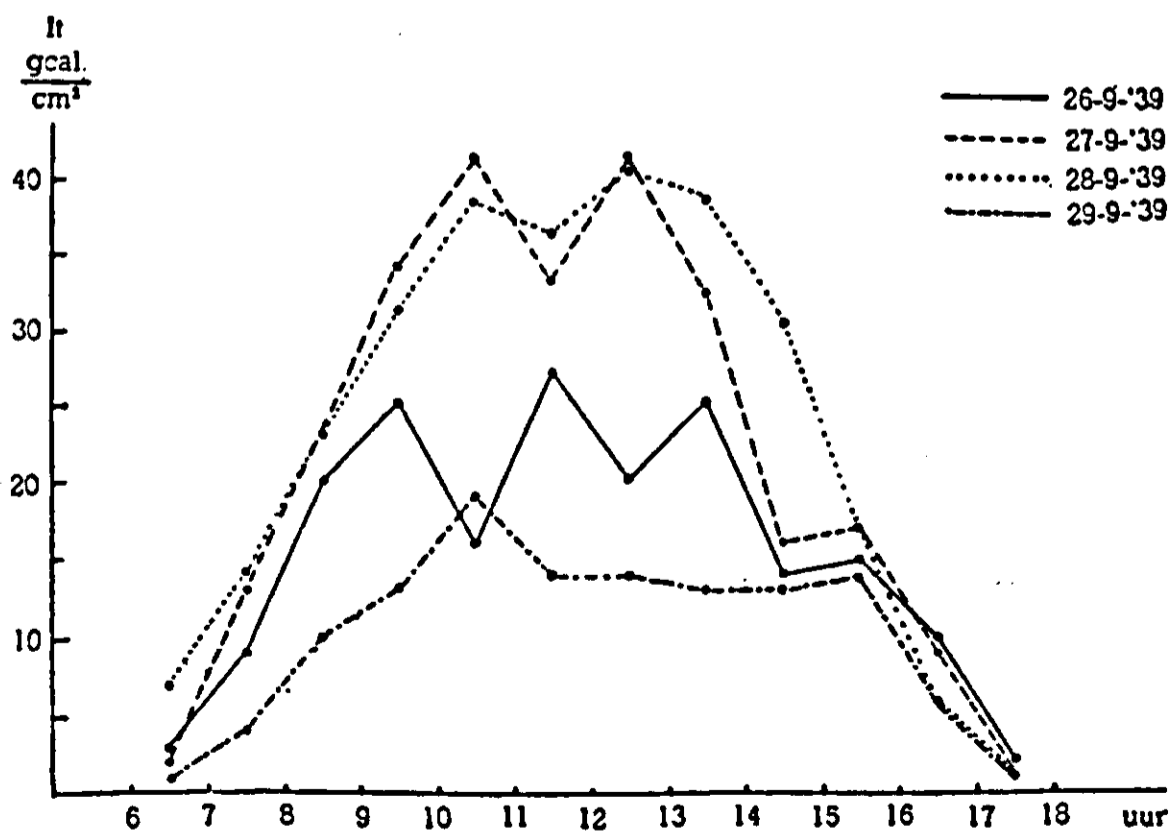
Tabel 11 en Tabel 12 hebben betrekking op dezelfde dagen. Wij constateerden, dat deze dagen lagen in een stijgende lijn van de Iw. Be-

TABEL 12

datum	uur	% HCN in de groene massa	% HCN in de droge stof	Iw gcal cm <sup>3</sup>	neerslag mm	temp. °C		% glucose in de droge stof
						max.	min.	
27-9-'39	18.00	0,0250	0,1330	178	0,0	11,6	-0,2	23,6
28-9-'39	5.15	0,0184	0,1150					19,75
	5.56	zonsopgang						
	6.30	0,0162	0,1040	196				19,5
	8.30	0,0253	0,1485		0,0	14,1	4,7	18,9
29-9-'39	17.45	0,0186	0,0975					26,4
	8.00	0,0186	0,1036	77	0,0	14,8	7,2	16,6

zien wij de uurwaarden der It, zooals weergegeven in Grafiek 5, dan valt direct op, dat het groote onderscheid ligt tusschen 26 en 27 September, maar, dat 27 en 28 September zeer gelijkvormig zijn, zoodat 28 September volgens deze gegevens zeer goed voldoet aan den eisch, dien wij reeds bij de bespreking van Tabel 10 ontwikkelden, nl. dat, om de werkelijke periodieke schommelingen terug te vinden, men moet beschikken over waarnemingen op dagen, die niet of weinig afwijken van de voorgaande dagen, dus op dagen, waarop men uit het oogpunt van de weersschommelingen een constant HCN-niveau mag verwachten.

Wij zien hier nu, dat van zonsondergang op 27 September tot even voor zonsopgang op 28 September het HCN-gehalte is gedaald, welke daling zich tot kort na zonsopgang voortzet, om daarna in 2 uur en dus binnen 3 uur na zonsopgang te stijgen met ongeveer 50% (zie ook Grafiek 6). Van 8.30 tot 17.45 vinden wij dan wederom een even groote daling. Bij vergelijking met Tabel 10 zal men zien, dat onze bepalingen daar eerst om



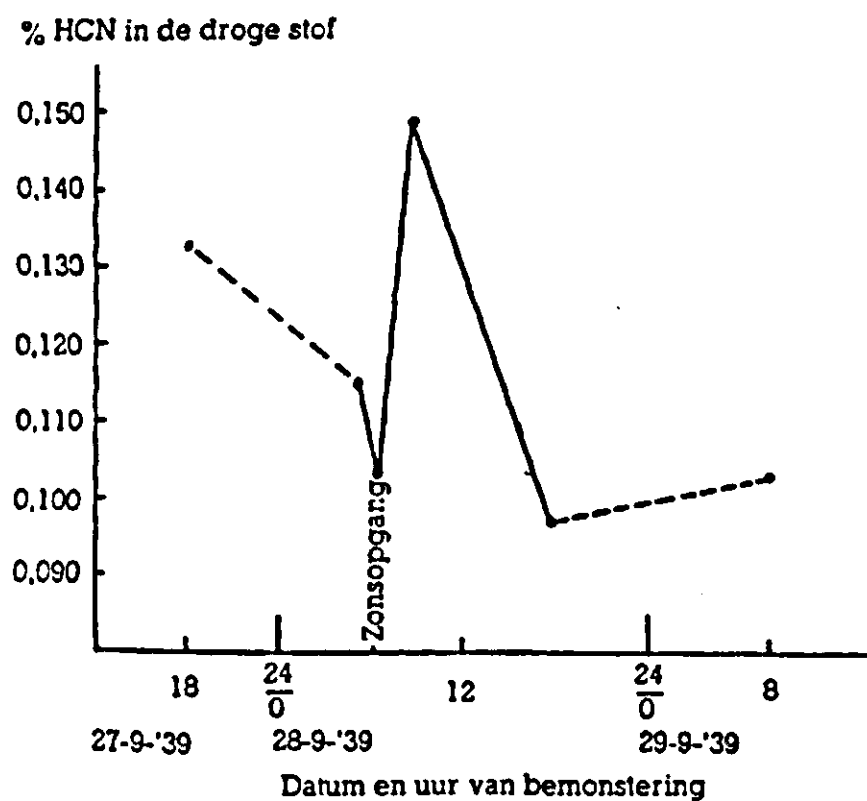
Grafiek 5. Uurwaarden van It.



8 uur en 8.30 uur aanvingen, waarbij dan nog te bedenken valt, dat de zon eerder opging.

De HCN-waarde op 29-9-'39 om 8 uur is laag vergeleken bij den vorigen dag (8.30 uur), nl. 103,6 mg HCN per 100 g droge stof tegenover 148,5 mg. De Iw van 29 September is ook laag (77). Duidelijker spreken echter nog de sommen der uurwaarden van It tot 8 uur. Deze bedroegen op 27 September 15, op 28 September 21, maar op 29 September 5 gcal/cm<sup>2</sup>.

Ten aanzien van de glucose in de droge stof laat zich het volgende opmerken. De daling gedurende den nacht zet door tot omstreeks 8.30 uur, dat is tot na zonsopgang. De afname van koolhydraten heeft dus blijkbaar plaats tot lang na zonsopgang. Dit punt zal nogmaals ter sprake komen.

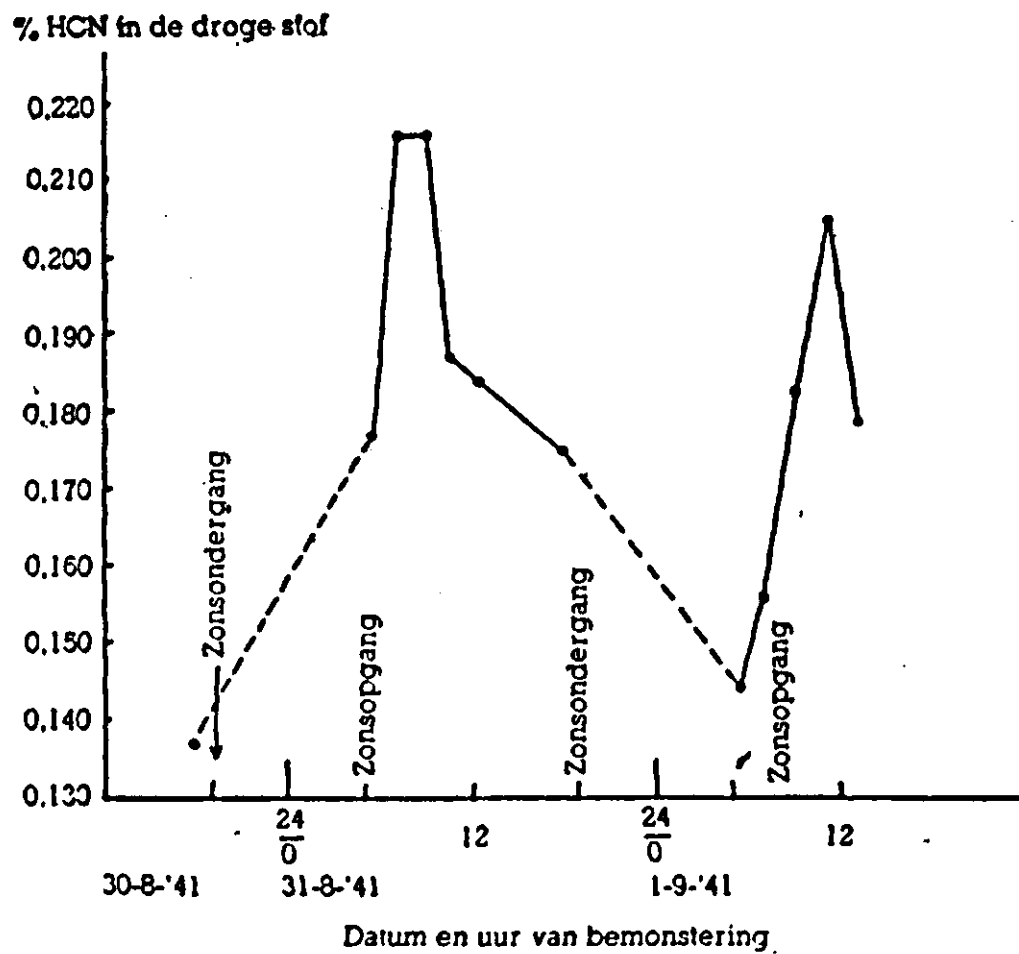


Grafiek 6, behorende bij Tabel 12.

Plaatsen wij thans de waarden van Tabel 11 van 28 September en wel van 7.15 uur en 13.30 uur in het kader van de waarnemingen uit Tabel 12, dan wordt het zeer aannemelijk, dat deze beide gelijke waarden (% HCN in de droge stof) ieder aan een anderen kant van het maximum liggen. Omgekeerd volgt hieruit voor Tabel 12, dat wanneer de waarde, welke wij om 8.30 uur hebben gevonden, niet het maximum is, dit maximum voor 12 uur gelegen moet zijn.

Dezelfde bepaling werd nogmaals herhaald aan klonen-materiaal door ons verkregen uit Nieuw-Zeelandsche klaver no 6. Op deze wijze werd dus een mogelijkheid van foutieve bemonstering — daar men, bij het plukken van bladen uit een door zaaiing verkregen veldje, nu eens terecht zal komen bij gemiddeld sterker cyanophore planten dan weer bij minder sterk cyanophore — uitgeschakeld. De bepalingen hadden wederom in een ander jaar plaats, nl. in 1941.

Tabel 13 en Grafiek 7 laten zien, dat, nadat om 5 uur des morgens van den 31sten Augustus 1941 de zon was opgegaan, een maximum HCN-gehalte in de droge stof werd bereikt tusschen 6.50 uur en 8.50 uur, waarna dit gehalte gedurende den verderen dag regelmatig maar zwak



Grafiek 7, behorende bij Tabel 13.

daalde, om in den nacht van 1 September verder te dalen tot zonsopgang. Op dezen dag werd na regelmatige stijging het maximum bereikt om 11 uur, waarna wederom daling intrad.

Hier doet zich opnieuw het geval voor, dat het HCN-gehalte bij zonsopgang op 30 Augustus 1941 lager is dan het gehalte bij den volgenden zonsopgang.

TABEL 13

datum	uur	% HCN in de groene massa	% HCN in de droge stof	Iw <sup>1)</sup> gcal cm <sup>2</sup>	neerslag mm	temp. °C.	
						max.	min.
30-8-'41	18.05	0,0200	0,137	164	12,4	17,1	10,5
	18.54	zon onder					
31-8-'41	5.12	zon op	0,177	209	0,0	17,8	9,2
	5.25	0,0226					
	6.50	0,0270					
	8.50	0,0300					
	10.20	0,0296					
	12.20	0,0324					
	17.50	0,0242					
1-9-'41	18.52	zon onder	0,183	209	0,0	19,0	11,4
	5.13	zon op					
	5.35	0,0208					
	7.05	0,0236					
	9.05	0,0300					
	11.05	0,0354					
	13.05	0,0344	0,179				

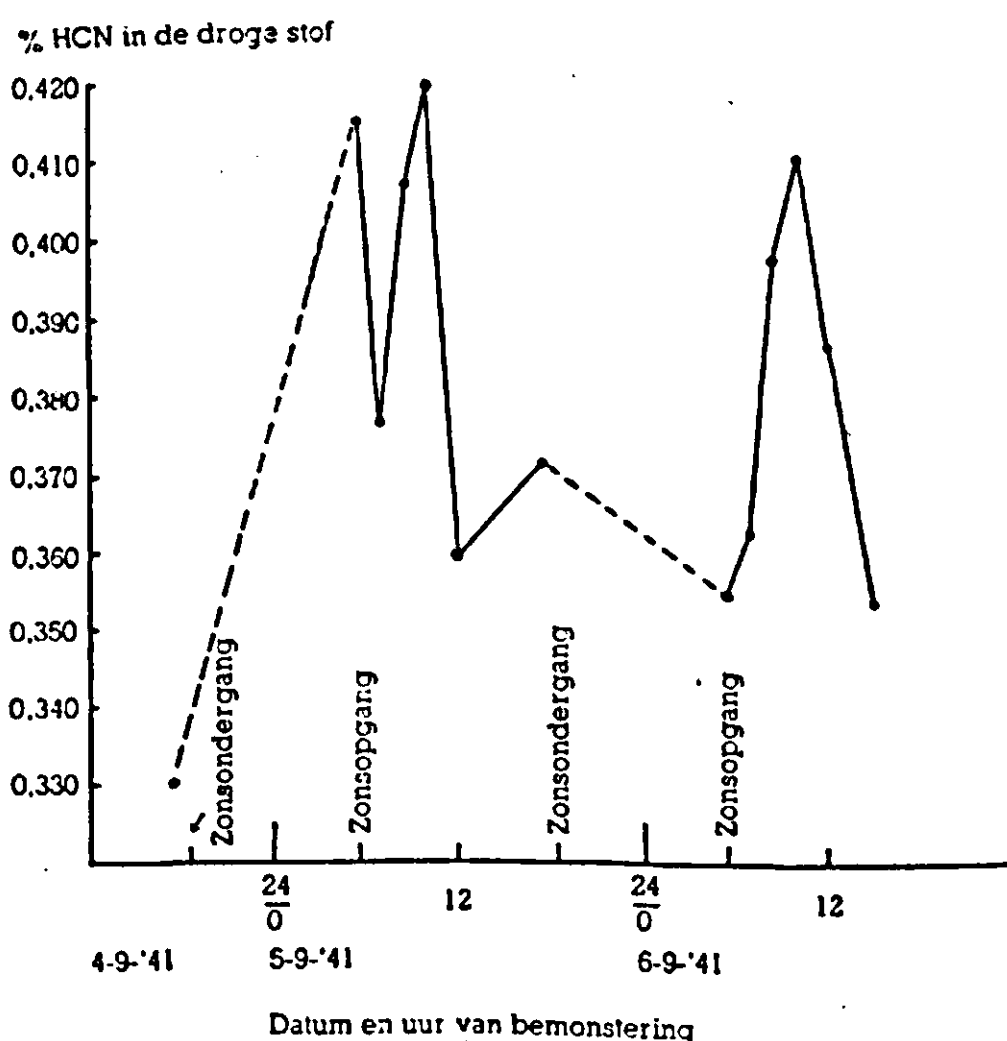
<sup>1)</sup> In dit geval is de dagsom Iw niet gemeten maar verkregen door de dagsom It te vermenigvuldigen met 0,69.

TABEL 14 (zie ook Grafiek 8)

datum	uur	% HCN in de groene massa	% HCN in de droge stof	Iw <sup>1)</sup> $\frac{\text{gcal}}{\text{cm}^2}$	neerslag mm	temp. °C.	
						max.	min.
4-9-'41	17.40	0,0568	0,330	276	0,0	23,4	12,3
	18.43	zon onder					
5-9-'41	5.20	zon op	0,415	204	0,0	25,2	11,7
	5.30	0,0581					
	7.05	0,0520					
	8.35	0,0586					
	9.55	0,0672					
	12.05	0,0618					
	17.35	0,0626					
	18.41	zon onder					
6-9-'41	5.22	zon op	0,354	208	0,0	22,0	10,2
	5.35	0,0527					
	7.05	0,0546					
	8.35	0,0616					
	10.00	0,0697					
	12.05	0,0684					
	14.50	0,0670					

<sup>1)</sup> In dit geval is de dagsom Iw niet gemeten maar verkregen door de dagsom It te vermenigvuldigen met 0,69.

Het zal uit deze gegevens duidelijk zijn, dat onze waarnemingen zich voegen bij die van Treub, Narasimha Acharya, Leemann en ook Kerstan. De HCN-gehalte-curve vertoont gedurende den dag een maximum, zoowel in verschillende wereldstreken als bij verschillende planten-



Grafiek 8, behorende bij Tabel 14.

species. Omtrent het uur, waarop het maximum gevonden wordt, bestaat eenig verschil. De beide in de tropen uitgevoerde onderzoeken leggen dit maximum om en bij het middaguur (driepunts-curve, dus het maximum kan even goed er voor als er na liggen), resp. om 2 uur des namiddags. Dat men in detail-punten verschillen vindt, behoeft a priori geen verwondering te wekken; een maximum rond het middaguur of iets later is zeer goed te zien als een verschuiving van het maximum, dat wij bij witte klaver vóór het middaguur en in de meeste gevallen reeds vroeg in den ochtend, vinden.

Leemann's waarneming past zich hierbij goed aan. Alleen Kerstan, met het maximum rond 16 uur, waargenomen in een gematigd klimaat, blijft over. Het is moeilijk dit geval thans te verklaren.

Bezien wij de waarnemingen aan een klone uit Nieuw-Zeelandsche witte klaver no 6, vastgelegd in Tabel 14.

In de eerste plaats valt te constateeren, dat het HCN-gehalte zich op 6 September zoo gedraagt als wij tot nu toe hebben gevonden, nl. een regelmatige stijging vertoonend na zonsopgang tot een maximum vermoedelijk tusschen 8.35 en 10 uur, om daarna wederom te dalen. Ook de nacht gedroeg zich normaal; de waarde bij zonsondergang den vorigen avond was hooger dan die bij zonsopgang.

Thans echter de eerste dag. Hier is de ochtendwaarde wederom hooger dan de waarde bij ondergaande zon den vorigen avond. De veronderstelde nachtelijke daling zet zich hier na zonsopgang voort. Daarna treedt de gebruikelijke ochtendtop op. Echter de waarde om 17.35 uur is hooger dan de waarde om 12.05 uur. Dit geval, dat in den middag het HCN-gehalte weer iets gestegen schijnt te zijn, staat niet alleen.

Ten slotte vestigen wij de aandacht op de buitengewoon hooge HCN-gehalten.

In Tabel 13 en 14 laten de gevonden HCN-gehalte-curven weer op overtuigende wijze toe een verband te leggen met de Iw.

In de Tabellen 15 en 16 zijn nog twee gevallen vastgelegd, waarbij in den namiddag het HCN-gehalte wederom is gestegen.

TABEL 15

datum	uur	% HCN in de groene massa	% HCN in de droge stof	Iw gcal cm <sup>2</sup>	neerslag mm	temp. °C		% glucose in de droge stof
						max.	min.	
8-9-'39	13.00	0,0180	0,083	—	0,0	27,3	15,2	
	15.00	0,0190	0,083					19,5
	18.30	0,0177	0,089					23,4
9-9-'39	8.00	0,0208	0,100	—	0,0	26,5	16,3	16,6
	10.30	0,0182	0,092					19,9

Wij zien in Tabel 15 in den loop van den namiddag van 8 September

een lichte stijging van het HCN-gehalte; daarna is het gedrag in den ochtend van 9 September, voor zoover dit aan twee bepalingen te zien is, weer normaal, vertoont nl. reeds een daling tusschen 8.00 en 10.30 uur. Het betrof hier Nieuw-Zeelandsche klaver no 6.

Een soortgelijk geval demonstreert Tabel 16, welke wederom betrekking heeft op de witte klaver van Tabel 12, Nieuw-Zeelandsche klaver no 6. Men kan dus Tabel 16 plaatsen voor Tabel 12; de waarde van 27 September 1939 om 18 uur is in beide opgenomen.

TABEL 16

datum	uur	% HCN in de groene massa	% HCN in de droge stof	Iw gcal cm <sup>3</sup>	neerslag mm	temp. °C		% glucose in de droge stof
						max.	min.	
27-9-'39	8.00	0,0180	0,116	178	0,0	11,6	-0,2	23,7
	13.00	0,0180	0,096					20,2
	18.00	0,0250	0,133					23,6

Ook hier is dus de avondwaarde hoger dan de middagwaarde. Echter vertoont de glucose-curve geen normaal verloop: er heeft geen regelmatige stijging gedurende den dag plaats gehad. Blijkbaar hebben wij met een abnormalen dag te maken. In beide gevallen, waarin de Iw bekend is (Tabellen 14 en 16) volgt de dag met, laten wij het noemen, een secundairen middagtop op een dag, waarvan de Iw aanmerkelijk lager ligt, zoodat het gemiddelde dagelijksche HCN-gehalte moet stijgen. Mocht dus een dergelijke secundaire middagtop bestaan, dan moet hij beschouwd worden als een product van het onregelmatig verloop van het HCN-gehalte ten gevolge van de weersschommeling. Overigens doet een dergelijke tweetoppige curve denken aan de assimilatie-curven, zooals Kostytschew (l.c.) die vond (zie Grafiek 3).

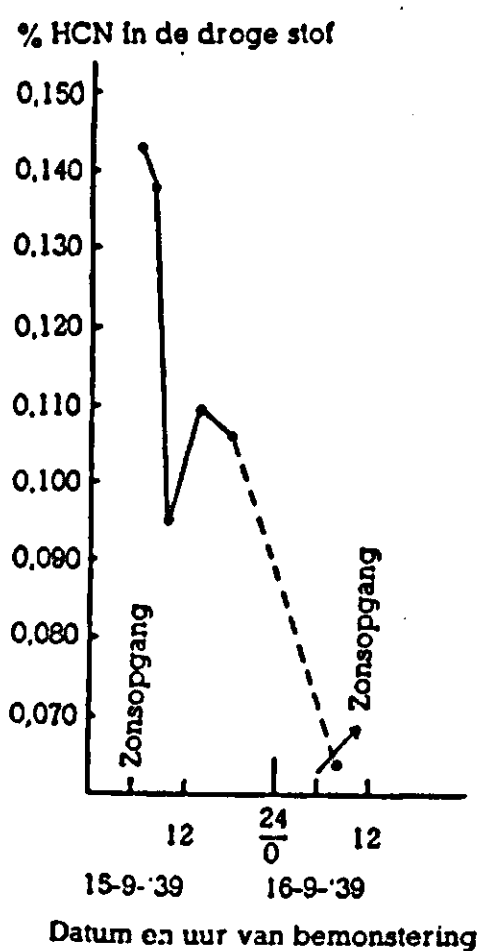
Dat zich in geval van onregelmatigheden in het weer de meest afwijkende HCN-gehalte-curven kunnen voordoen, is duidelijk te demonstreeren aan Tabel 17, waar gebruik gemaakt werd van Nieuw-Zeelandsche klaver no 5.

TABEL 17 (zie ook Grafiek 9)

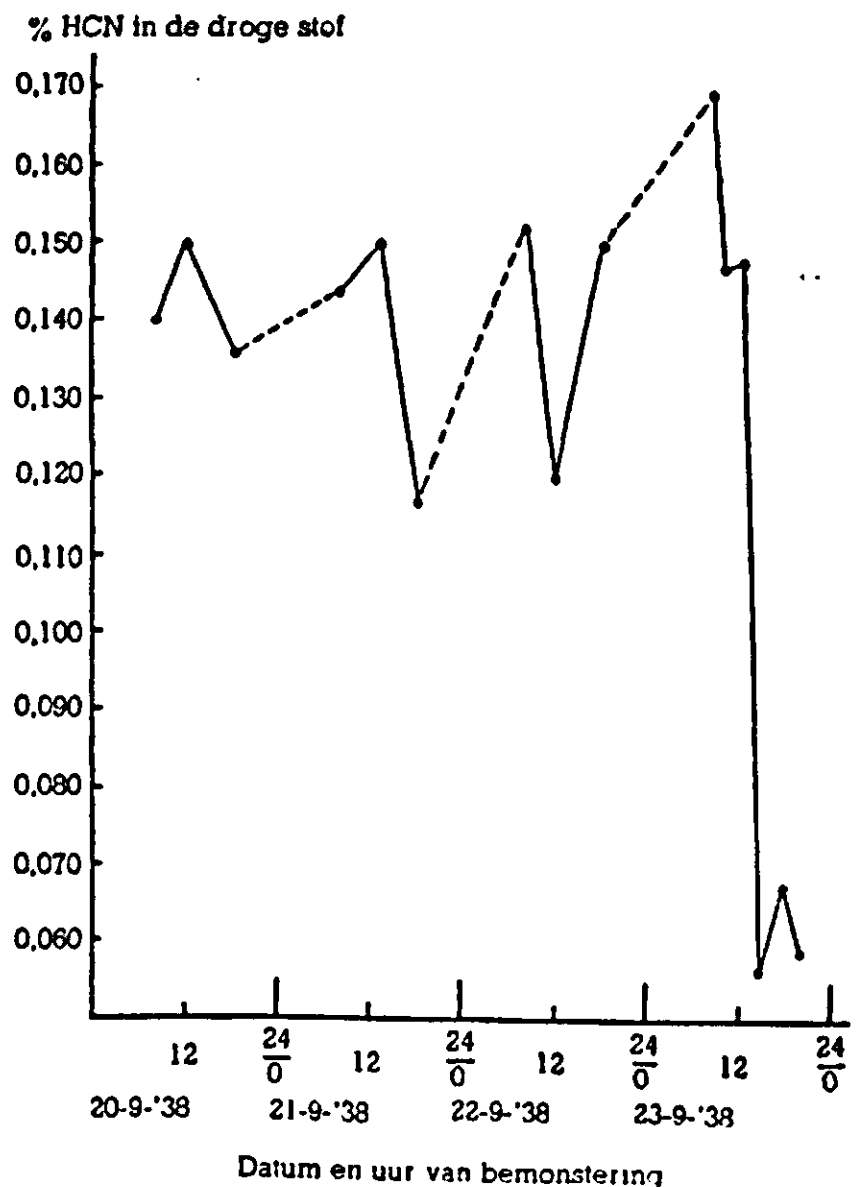
datum	uur	% HCN in de groene massa	% HCN in de droge stof	Iw gcal cm <sup>3</sup>	neerslag mm	temp. °C		% glucose in de droge stof		
						max.	min.			
15-9-'39	6.00	0,0195	0,1432	213	4,6	17,8	9,5	14,8		
	8.00	0,0205	0,1385		0,0			18,3	9,4	10,5
	10.00	0,0173	0,0953							12,8
	14.00	0,0239	0,1096							13,2
	18.00	0,0196	0,1059							16,2
16-9-'39	8.00	0,0123	0,0640	167				11,4		

Wij zien hier een dalen van het HCN-gehalte van zonsopgang (op 15-9 om 5.34 en op 16-9 om 5.36 uur) tot omstreeks 10 uur, waarna een stijging optreedt tot 14 uur, om daarna wederom licht te dalen. Moeten wij hier aannemen, dat de nachtelijke daling zoolang doorgaat, waardoor een „ochtendtop” om plus minus twee uur ontstaat, dan wel dat het „secundaire middagtopje” hier zeer vroeg valt? Zooals gezegd, deze curve is ontstaan onder abnormale omstandigheden; de Iw is 213 gcal/cm<sup>2</sup>, maar deze bedroeg den voorgaanden dag slechts 92, dus een buitengewoon groote sprong. Daarbij komt, dat gedurende deze dagen het percentage, dat Iw van It is en dat gemiddeld 69% bedraagt, op 14 September 67 % was, op 15 September 87 % en op 16 September 59 %. Ook hierin was dus 15 September abnormaal.

In dit geval zette de afname van koolhydraten tot na zonsopgang door. Wij vestigen de aandacht op de geringe stijging van 10 tot 14 uur.



Grafiek 9,  
behoorende bij Tabel 17.



Grafiek 10,  
behoorende bij Tabel 18.

Bezien wij tenslotte wederom 4 achtereenvolgende dagen bij Nieuw-Zeelandsche klaver no 6, in het jaar 1938, waarvoor op de eerste drie dagen telkens drie punten werden bepaald en voor den laatsten dag zes.

Deze tabel sluit dus in opzet aan bij Tabel 10, met dit verschil, dat de waarnemingen ongeveer een maand later in het jaar werden gedaan, nl. van 20 tot 24 September tegenover Tabel 10 van 15 tot 20 Augustus. Deze verschuiving had ten gevolge, dat, nu wij onze eerste bepaling weder-

om om 8 uur verrichtten, deze aanzienlijk dichter bij zonsopgang werd genomen, nl.  $2\frac{1}{4}$  uur na zonsopgang tegenover  $3\frac{1}{4}$  uur na zonsopgang. Terwijl wij dus in Tabel 10 van 8 uur af steeds een daling van het HCN-gehalte waarnamen, zonder de oorspronkelijke stijging in dit gehalte te constateeren, hadden wij nu kans deze stijging wel te constateeren, waar wij dan ook in geslaagd zijn.

De resultaten zijn opgenomen in Tabel 18 en Grafiek 10.

TABEL 18

datum	uur	% HCN in de groene massa	% HCN in de droge stof	Iw gcal cm <sup>2</sup>	neerslag mm	temp. °C		Stelen % HCN in de droge stof
						max.	min.	
20-9-'38	8.00	0,0200	0,140	197	0,1	21,1	12,6	0,075
	12.00	0,0270	0,150					0,081
	18.00	0,0248	0,136					0,066
21-9-'38	8.00	0,0214	0,144	107	0,0	22,5	12,8	0,076
	13.15	0,0260	0,150					0,092
	18.00	0,0205	0,117					0,060
22-9-'38	8.00	0,0236	0,152	157	0,0	22,4	15,5	0,090
	12.00	0,0237	0,120					0,076
	18.00	0,0274	0,150					
23-9-'38	8.15	0,0262	0,169	164	0,0	24,8	13,5	
	10.00	0,0236	0,147					
	12.30	0,0260	0,148					
	14.30	0,0104	0,056					
	18.00	0,0120	0,067					
	20.15	0,0102	0,059					

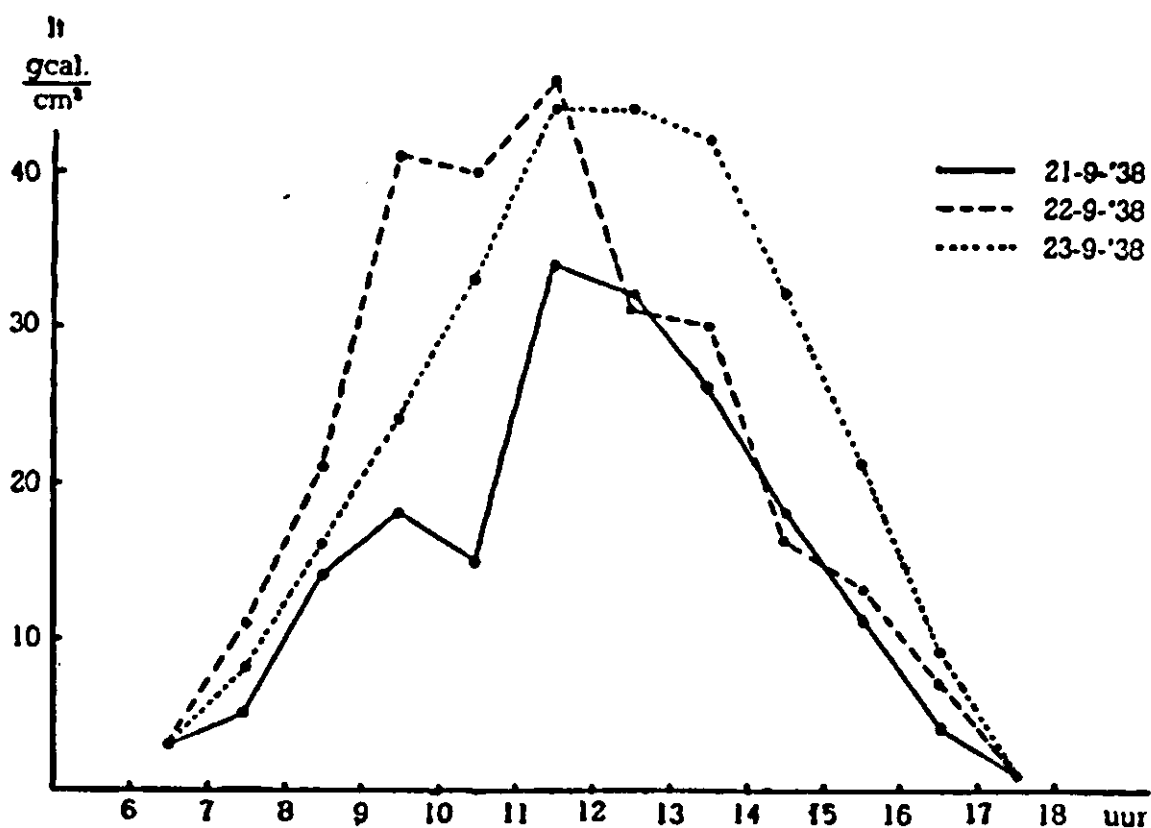
Op 20 en 21 September zien wij een curve met top. Op 22 September vertoont de curve echter een inzinking. Kijken wij nu wederom naar de Iw, dan zien wij, dat deze in de voorgaande dagen sterk is gestegen en gedaald; zij bedroeg nl. op 19 September 164 gcal/cm<sup>2</sup> en de volgende dagen eindigende met 22 September 197, 107 en 157 gcal/cm<sup>2</sup>. Wel is ook het verloop vóór 21 September verre van regelmatig, maar het schijnt, dat een daling van de HCN-weers-curve, niet diën verstorenden invloed op de dagelijksche periodiciteit heeft; deze daling kan ook binnen het normale kader worden bereikt, wat hier dan ook schijnt te hebben plaats gevonden.

Wij kunnen ons deze minimum-curve, evenals voor Tabel 17, wederom ontstaan denken als voortzetting van de nachtelijke daling, maar meer waarschijnlijk als curve, waarbij ons de ochtendtop ontging en waarbij een middagtop is opgetreden, in verband met de stijgende Iw.

Ten slotte zien wij op 23 September, wanneer wij deze curve als driepunts-curve (om 8.15 – 12.30 – 18 uur) bezien, onze dalende curve uit Tabel 10 optreden. De Iw is wederom regelmatig geworden. Dat zoowel op dezen dag als op den vorigen dag de ochtendtop ons is ontgaan, kan steun vinden in de uurwaarden van It op deze dagen, waarvan de som

gedurende de eerste uren betrekkelijk hoog is, resp. 14 en 11 (zie Grafiek 11). De HCN-gehalten, die op 23 September verder, nog zijn bepaald, geven geen aanleiding tot opmerkingen. Zoo men wil, kan men een minimaal-klein middagtopje constateeren. Wel valt de buitengewoon sterke daling van het HCN-gehalte gedurende dezen dag op.

Ten slotte werd in dit geval een aantal HCN-gehalten van de bladstelen bepaald. Men ziet, dat ook hier dezelfde periodieke schommeling valt te constateeren. Deze gelijkvormigheid van gedrag van het HCN-gehalte in bladen en bladstelen moet aanleiding geven tot conclusies omtrent de rol en beteekenis van het glucoside in blad en steel.



Grafiek 11. Uurwaarden van It.

Bezien wij de praktische vraag of men van deze schommelingen gedurende den dag last zal hebben bij de indeeling van de witte klaver volgens het classificatie-schema van Doak, dan meenen wij dit bevestigend te moeten beantwoorden.

Niet, dat wij beschikken over cijfers van een witte klaver, die het eene moment van den dag tot Mother Seed en het andere moment tot Permanent Pasture gerekend moet worden, daar wij grootendeels met Nieuw-Zeelandsche klaver no 6 hebben gewerkt, waarbij de HCN-gehalten zeer hoog lagen. In Tabel 11 (een Nederlandsche klaver) hebben wij echter een voorbeeld, hoe hoogste en laagste waarde een aanzienlijk deel van het traject van de Mother Seed klasse beslaan. De veronderstelling is niet te gewaagd, dat iets dergelijks ook kan voorkomen met overschrijding van de klassegrenzen. Wij vestigen er de aandacht op, dat men bij deze beschouwing moet kijken naar de % HCN in de groene massa, daar het Nieuw-Zeelandsche schema daarop is opgebouwd. Dit is geen inconsequentie onzerzijds.

De variatie in HCN-gehalte gedurende een dag is verschillende malen gebleken zeer groot te zijn. Zoo zien wij op 23 September 1938 (Tabel



18) een daling van 60%; dalingen van 15 tot 30% komen vaker voor. Wil men ook deze moeilijkheden uitschakelen, door, gelijk Doak deed, standaardmonsters mede te bepalen, dan zal dit minder eenvoudig zijn, daar men dan, wil men consequent zijn, niet alleen iederen dag den standaard mede moet bemonsteren, maar zelfs bij iedere monstername.

Op deze wijze werkende en wij denken daarbij speciaal aan de mogelijkheid om veel witte-klover-planten te onderzoeken ten behoeve van de selectie, zou men van het standaardperceel doorlopend de volledige HCN-gehalte-curve moeten bepalen, om deze als basis voor de vergelijkingen te gebruiken. Dit is natuurlijk buitengewoon bewerkelijk, zoo niet onuitvoerbaar. Doet men het niet, dan loopt men de kans enkele planten, met een gemiddeld hoog HCN-gehalte, door toevallige omstandigheden te verwijderen. Deze fout is onherstelbaar, maar voorloopig vermoedelijk bij selectie niet onoverkomelijk. In het omgekeerde geval — dus bij een plant met een gemiddeld te laag HCN-gehalte, welke door toevallige omstandigheden te hoog geclasseerd is — laat de fout zich later herstellen. Bij selectie zal men dus met deze schommelingen in eerste instantie geen rekening behoeven te houden.

Daarentegen mag een Regeerings-instantie, oordeelende over werk van anderen, niet het risico loopen, door toevallige omstandigheden een onrechtvaardigheid te begaan.

De hoogte van het HCN-gehalte in witte klover is blijkbaar afhankelijk van vele factoren. In het algemeen kan worden geconstateerd, dat het uiteenrafelen van deze factoren met hun gevolgen steeds een moeilijke opgave is, die in het bijzonder moeilijk is op te lossen, wanneer men dit tracht te doen aan plantenmateriaal, dat gegroeid is onder natuurlijke, dus meerendeels niet constante, omstandigheden. Dit neemt niet weg, dat wij in dit Hoofdstuk in de gelegenheid zijn geweest juist aan dergelijke natuurlijk gegroeide planten eenige verschijnselen te constateeren.

In de eerste plaats constateerden wij voor witte klover een schommeling van het HCN-gehalte gedurende den dag, welke schommeling een zekere regelmaat vertoont. Deze regelmatigheid bestaat daarin, dat na zonsopgang een stijging van het HCN-gehalte begint, welke stijging na een (meest klein) aantal uren een maximum bereikt. Dit maximum valt gemeenlijk voor witte klover voor het middaguur. Hoewel in de literatuur dit punt nog nimmer ten volle de aandacht had genoten, zijn er bij enkele auteurs aanwijzingen te vinden, gevonden aan andere plantenspecies en op andere plaatsen, die dit feit steunen. Wij zelf zullen in het laatste Hoofdstuk nog naderen steun vinden bij waarnemingen aan witte klover, gegroeid bij constante belichting. Het moet dan ook in het algemeen als onjuist worden beschouwd, althans voor de witte klover, maar vermoedelijk ook voor andere planten, wanneer door diverse auteurs aan een direct verband tusschen glucoside-gehalte en assimilaten-curve wordt gedacht, waarbij

men dan speciaal op het oog heeft de toename der assimilaten gedurende den dag, zoodat des avonds de grootste hoeveelheid van assimilaten en glucosiden wordt verwacht. Iets dergelijks kan men b.v. bij Hecht (1931, pag. 45) lezen: „Versuche mit Begasung (Kohlensäure) und Mängeldüngung (bij Digitalis, Schr.) steigern den pharmakologischen Wert; dieser Umstand weist im Zusammenhange mit *der schon bekannten Tatsache des höheren Gehaltes in den Abendstunden*<sup>1)</sup> auf einen unmittelbaren Zusammenhang der Glykosidbildung mit der Kohlensäureassimilation.”

Wij kunnen constateeren, dat er geen samengaan van HCN-gehaltecurve en assimilaten-curven, hoe dan ook, is waargenomen. Dit punt is van belang voor de verklaring van de rol, die de glucosiden in de stofwisseling spelen. Wij zullen in het laatste Hoofdstuk, gesteund door daar vermelde feiten, in staat zijn een poging te wagen, het waargenomene oorzakelijk naast elkaar te plaatsen. Daarbij komen dan nog twee punten, die eveneens in dit Hoofdstuk de aandacht hebben getrokken, nl. het optreden van een vermoedelijk secundaire middagtop bij het HCN-gehalte en het herhaaldelijk geconstateerde feit van een hooger HCN-gehalte bij zonsopgang dan bij den voorafgaanden zonsondergang. Dit laatste wijst er op, dat 's nachts niet altijd de steeds aangenomen regelmatige daling plaats heeft. Het secundaire middagtopje trad alleen dan op, wanneer met behulp van de stralingsintensiteit waarschijnlijk kon worden gemaakt, dat de opeenvolgende dagen sterke onderlinge afwijkingen vertoonden voor de glucoside-productie. Deze onregelmatigheden in het weer kunnen ten slotte de oorzaak zijn, dat de boven geconstateerde regelmatige schommelingen gedurende den dag totale wijziging ondergaan, zoodat voorshands geen spoor van regelmaat meer is terug te vinden. De periodieke dagschommelingen worden dan overheerscht door de schommelingen van dag tot dag. Dat de Iw bruikbaar is als maatstaf bij de beoordeling der dagen op hun regelmatigheid, wijst op een nauw, hoewel niet direct, verband tusschen glucoside-vorming en stralingsintensiteit.

Zooals gezegd, men zal niet in staat zijn dieper door te dringen in de beteekenis van de geconstateerde feiten, tenzij men plantenmateriaal gaat onderzoeken, dat gegroeid is onder constante, te controleeren omstandigheden. Dit kan slechts met kleine aantallen planten geschieden, waardoor slechts weinig materiaal voor onderzoek ter beschikking komt. Men zal dus kleine hoeveelheden HCN moeten kunnen bepalen.

Om dit mogelijk te maken dient men te beschikken over een HCN-bepaling, gevoeliger dan die van Liebig-Denigès.

---

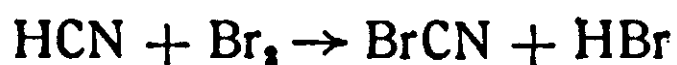
<sup>1)</sup> Cursiveering van Schrijver.

## HOOFDSTUK V

### BEPALING VAN KLEINE HOEVEELHEDEN BLAUWZUUR IN PLANTENDESTILLATEN

Wij zien ons dus thans voor de vraag geplaatst naar een methode van HCN-bepalen, welke gevoeliger is dan die volgens Liebig-Denigès. In Hoofdstuk I bespraken wij uitsluitend de door de Nieuw-Zeelandsche onderzoekers gebruikte methoden onder belichting van hun verdiensten en tekortkomingen.

De jodometrische methode volgens Fordos en Gélis was weliswaar veel gevoeliger dan de methode Liebig-Denigès, haar bezwaren zijn echter te groot. Anders is dit met de bromometrische bepalingen, welke berusten op de reactie:



Rosenthaler (1932) geeft hiervan de volgende uitwerking: overmaat Br verwijderen door lucht doorzuigen en HBr titreeren met 0,1 of 0,01 n loog op methylrood (1 cm<sup>3</sup> 0,01 n loog = 0,270 mg HCN).

De uitwerking, die Schulek (1923) echter aan deze bepaling gegeven heeft (zie ook Klaassen, 1931 en Kolthoff, 1928), nl. toevoeging van KJ in zuur milieu en titratie van het vrijkomende J (BrCN + 2HJ → J<sub>2</sub> + HCN + HBr) is minder lastig te hanteeren (men mist het doorzuigen van lucht) en is tevens nog gevoeliger (1 cm<sup>3</sup> 0,01 n thio = 0,135 mg HCN). Klaassen (l.c.) komt tot de conclusie, dat de methode Schulek ver de voorkeur verdient boven de andere methoden, mede omdat ook in niet zuiver HCN-milieu slechts weinig storingen optreden; met name storen Cl noch Br, noch sulfiden, sulfieten en thiosulfaten (zie Kolthoff (1928), pag. 388). Kolthoff (l.c.) noemt de methode „recht brauchbar” en Karstens (1938) paste haar bij zijn biologisch onderzoek, iets gewijzigd, toe.

Een en ander was aanleiding haar in een vergelijkend onderzoek met de methode Liebig-Denigès te betrekken. Voorshands kan men de Schulek-methode als bezwaar aanrekenen, dat gewerkt moet worden met Br-water.

Kolthoff (l.c.) geeft op pag. 255 nog een methode aan, behorende tot de mercuri-metrie. Deze methode is niet door Klaassen in zijn overzicht opgenomen. Zij berust daarop, dat de dissociatie van mercuri-cyanide kleiner is dan die van mercuri-rhodanide. Voegt men nu aan een cyanide-oplossing mercurinitraat en salpeterzuur toe, dan kan de overmaat mercuri worden teruggetitreerd met rhodaan op ferri-ammonium-aluin als indicator. Kolthoff geeft aan deze methode de voorkeur boven

die van Volhard, zoodat ook zij in het bovenbedoelde vergelijkende onderzoek werd betrokken. Hierbij is  $1 \text{ cm}^3 0,005 \text{ n KCNS} = 0,125 \text{ mg HCN}$ .

Verdere mogelijkheden dienen bij de volgende bepalingmethoden onder oogen te worden gezien.

In de eerste plaats een bepaling met behulp van natrium tetrathionaat afkomstig van Kolthoff, behoorende tot de groep van bepalingen door middel van ammoniumsulfide, van welke bepaling Karsten (1934, pag. 165) een nadere uitwerking geeft, welke tot de titrimetrische colorimetrie behoort. Deze werkwijze is, afgezien van andere bezwaren, te omslachtig.

De eenige door de Commission internationale des Réactions et Réactifs analytiques nouveaux de l'Union internationale de Chimie (1938) aanbevolen reactie op cyaniden, nl. met  $\text{CuS}$ , bestaat slechts in kwalitatieve uitvoering (zie ook Feigl (1938), pag. 290). De auteur van deze bepaling, Barnebey (1914), geeft zelf te verstaan, dat deze methode niet geschikt is voor een quantitative uitvoering: „In the presence of ferrocyanides, however, the reaction is not quantitative, inasmuch as the ferrocyanide is oxidized to ferricyanide more or less completely during titration.”

Van de colorimetrische bepalingen zijn er juist bij het onderzoek aan plantenmateriaal verschillende gebruikt.

Klaassen noemt 1. Berlijnsch-blauw-methoden, 2. rhodaan-methoden, 3. pikrinezuur-methode en 4. oxydatie-reacties.

Hiervan is de Berlijnsch-blauw-methode zeer veel toegepast. Voor de uitvoering bestaan zeer uiteenlopende voorschriften, waarop wij hier niet nader zullen ingaan. Reeds Kolthoff (1917) gaf bij de bespreking van deze methode, als quantitative bepaling, als zijn meening te kennen, dat hem de reactie alleen van uit een kwalitatief oogpunt van belang scheen. In Amerika behoorde deze colorimetrische bepalingwijze tot die, welke vergeleken werden met de methode Liebig-Denigès (Greene en Breazeale, 1937); zij werd algemeen onvoldoende geacht. In het daarop betrekking hebbende Rapport ging men zelfs veel verder (pag. 447):

„(6) That since present colorimetric methods involve considerable manipulation, and have no advantages over the titration method, no further study be given to such methods.” Het groote voordeel der Berlijnsch-blauw-methode is, dat zij specifiek is.

De rhodaan-methoden (waartoe ook de boven reeds genoemde tetrathionaat-methode van Kolthoff in titrimetrisch-colorimetrische uitvoering behoort) hebben eveneens het voordeel specifiek te zijn. Na een langdurig onderzoek moest men in Amerika (Greene en Breazeale, 1937) besluiten tot de onbruikbaarheid van deze methoden. Ook Coleman en Gardner (1939) kregen absoluut onvoldoende uitkomsten met bepalingen volgens dit type.

Terwijl de beide behandelde bepalingstypen tenminste nog het voor-

deel hebben specifiek te zijn voor HCN, kan dit niet gezegd worden van de beide volgende, de pikrinezuur-methode en de oxydatie-reacties. Dit is reeds voldoende bezwaar tegen deze methoden, hoewel de oxydatie-reacties buitengewoon gevoelig zijn. Daar echter juist van de pikrinezuur-reactie bij het witte-klover-onderzoek veel gebruik is gemaakt, merken wij daarover nog het volgende op.

Kolthoff (1917) geeft aan, dat de roodkleuring niet alleen veroorzaakt wordt door HCN, maar door vele reduceerende stoffen. Hij noemt als eveneens roodkleurend:  $\text{SO}_2$ , aldehyden,  $\text{H}_2\text{S}$  en aceton. Wij hebben in de Inleiding reeds gezien, dat mogelijk aceton ontstaat naast HCN bij de afbraak van het in witte klover aanwezige glucoside. Vrij algemeen kent men bij de pikrinezuur-methode alleen aan een negatieve uitkomst waarde toe.

De gevoeligheid van dit reactie-type is vrij groot. Kolthoff (1917) geeft o.a. een voorschrift, waarbij 1 mg HCN per liter bij vergelijking kan worden aangetoond (1 : 1.000.000). Later geeft Schoorl (1941) als gevoeligheid (modificatie Chapman) 1 : 400.000. Bij de methode Schulek wordt deze gevoeligheid eveneens bereikt. De gevoeligheid van de pikrinezuur-methode zal dan nog weer aanzienlijk inboeten, wanneer zij wordt toegepast als pikrinezuurpapier-reactie, een methode die speciaal bij het witte-klover-onderzoek veel is gebezigd.

Sullivan (1939) heeft nu echter deze pikrinezuur-methode zeer recent uitgewerkt als kwantitatieve bepaling, speciaal met het oog op het witte-klover-onderzoek. Volgens zijn eigen opgave is de methode geschikt voor het bepalen van hoeveelheden HCN van 0,01–0,20 mg. De methode berust op de bepaling van de hoeveelheid licht, geabsorbeerd door de te onderzoeken met pikrinezuur rood gekleurde vloeistof in vergelijking met standaardoplossingen. De uitkomsten liggen volgens de auteur 8% hoger dan die, verkregen door middel van de methode Liebig-Denigès, welke uitkomsten, zoals wij weten, ook reeds te hoog liggen. Naast het bezwaar tegen de reactie, waarop deze bepaling berust, heeft de uitwerking nog het nadeel van het benodigde kostbare instrumentarium. De methode schijnt ons dan ook geen voordeelen te bieden. Uit het nawoord van zijn, ons bekende, jongste publicatie blijkt, dat Doak (1938) eveneens de pikrinezuur-methode kwantitatief is gaan gebruiken evenals Boyd, Aamodt, Bohstedt en Truog (1938). Noch Doak, noch Boyd c.s. geven nauwkeurig op, welke uitwerking door hen aan de methode werd gegeven.

Samenvattend kunnen wij dus zeggen, dat slechts bij de titrimetrische methoden bepalingswijzen zijn gevonden, die voldoen.

In Hoofdstuk I hebben wij de bestaande bepalingsmethoden verdeeld in macro- en micro-methoden. Van deze laatste noemt Klaassen (l.c.) er drie: 1. omzetting van zilver-jodide-sol (Denigès), 2. bromometrische methode (Schulek) en 3. joodamylum-methode (Rosenthaler). De eerste berust op de reactie van  $\text{AgJ}$ -sol met cyaan. Deze methode komt dus dicht

bij de methode Liebig-Denigès. De eerste overmaat aan toegevoegd AgJ-sol wordt geconstateerd door het optreden van het Tyndall-effect, dus nephelometrisch; Klaassen geeft een verfijnde uitwerking van deze titratie. Het bezwaar tegen deze methode is, dat men met optisch leeg vloeistoffen dient te werken. Klaassen beschouwt haar als de meest gevoelige methode, waarover wij beschikken. Zij wordt echter sterk gestoord. Gevoeligheid tot 0,0027 mg HCN. De methode Schulek bleek ook hier weer zeer bruikbaar. Klaassen bracht een modificatie, waarbij getitreerd wordt met 0,001 n thio, onder verkleining van het totaal volume. Wij komen op deze variatie nog terug. Uit zijn geheele onderzoek volgt, dat Klaassen de methode Schulek hoog op prijs stelt. De derde methode wordt noch door Klaassen noch door Rosenthaler (1932) verder besproken.

Het resultaat van deze beschouwingen was, dat besloten werd de methode van Liebig-Denigès te vergelijken met de uitkomsten verkregen volgens de methode Schulek en om tevens in het vergelijkende onderzoek te betrekken de door Kolthoff aangegeven methode met mercurinitraat, welke methode in de literatuur nog niet op haar bruikbaarheid was getoetst.

Uitgegaan werd van een KCN-oplossing. Hiertoe werden 0,3356 g KCN pr.a. (afkomstig van Schering-Kahlbaum en bevattende volgens etiketgarantie 97 % KCN) opgelost tot 500 cm<sup>3</sup> (= 135 mg HCN/500 cm<sup>3</sup>).

De bepalingen volgens Liebig-Denigès, Schulek en de mercurinitraatmethode werden uitgevoerd, zooals door Kolthoff (1928) aangegeven resp. op pag. 229, 288 en 255.

TABEL 19

methode	voorgelegde cm <sup>3</sup> KCN-opl.	gevraagde cm <sup>3</sup>	gevonden mg HCN	mg HCN in 500 cm <sup>3</sup> KCN-opl.	buret
Liebig-Denigès	10	AgNO <sub>3</sub> 0,02 n			
		a. 2,65			50/0,1
		b. 2,60	2,8	140	50/0,1
	25	c. 2,55			50/0,1
		a. 6,35	6,85	137	50/0,1
	25	b. 6,35			50/0,1
Mercurinitraat- methode	10	a. 6,34	6,85	137	10/0,02
		b. 6,34			10/0,02
	25	Rhodaan 0,051 n			
Schulek	10	a. 2,0 (25,6-23,6)	2,75	138	50/0,1
		a. 5,0 (25,6-21,6)	6,88	138	50/0,1
	25	b. 5,0 (25,6-21,6)			50/0,1
Schulek	25	Thio 0,101 n			
		a. 5,0			50/0,1
		b. 4,9	6,7	134	50/0,1
		c. 4,9			50/0,1

De resultaten zijn neergelegd in Tabel 19.

De titervloeistoffen zijn zoo gekozen, dat voor het bepalen van gelijke hoeveelheden HCN ongeveer gelijke hoeveelheden van deze vloeistoffen moeten worden gebruikt, nl. voor 25 cm<sup>3</sup> KCN-oplossing  $\pm$  5 cm<sup>3</sup> titer-vloeistof. De nauwkeurigheid der bepalingen is dus in dat opzicht dezelfde. De gevoeligheid der methoden spreekt dan uit de normaliteiten der titer-vloeistoffen: AgNO<sub>3</sub> 0,02 n, rhodaan 0,05 n en thio 0,1 n.

De hoeveelheden HCN, die de verschillende methoden in de KCN-oplossing aangeven, zijn niet gelijk. De met de methode Schulek gevonden waarde (134 mg) komt goed overeen met de theoretische waarde. Dat de methode Liebig-Denigès een hogere waarde geeft, behoeft niet te verwonderen. Bij deze methode zal toch de opalescentie of troebeling, welke het eindpunt der titratie aangeeft, bij een beduidende overmaat titervloeistof optreden, zoodat altijd te hooge waarden worden gevonden. Klaassen (1931, pag. 25) schat deze fout op een halven druppel, overeenkomende met 0,03 mg HCN. Wanneer men 135 mg in ons geval als de juiste waarde aanneemt, dan beteekent de overmaat van 2 mg, die met de methode Liebig-Denigès is gevonden, een overmaat van  $1\frac{1}{2}$  à 2 druppels. Deze overmaat moet ons inziens voor deze titraties nog niet overdreven worden geacht. De mercurinitraat-methode gaf uitkomsten, welke nog hooger lagen dan die van de methode Liebig-Denigès. Vermoedelijk zal men dit mee moeten wijten aan de techniek der bepaling, nl. de terugtitratie.

Bij alle bepalingen werden de te onderzoeken hoeveelheden KCN-oplossing eerst verdund tot 50 cm<sup>3</sup>. Verder werd de voorzorg genomen steeds dezelfde buret en dezelfde pipetten te gebruiken.

De vergelijking der drie methoden geschiedde tot hier aan relatief groote hoeveelheden HCN, nl.  $\pm$  6 mg. Bij verdunning van de oorspronkelijke KCN-oplossing kregen wij de volgende resultaten.

Voor de methode Liebig-Denigès werd uitgegaan van 25 cm<sup>3</sup> KCN-oplossing 1:4, waarbij in het eene geval werd opgevuld tot 50 cm<sup>3</sup> en in het andere geval niet werd opgevuld. Het eerste vroeg 1,64 cm<sup>3</sup> 0,02 n AgNO<sub>3</sub> (buret 10/0,02), overeenkomende met 142 mg HCN in 500 cm<sup>3</sup>. Bij deze verdunning is het omslagpunt buitengewoon moeilijk te zien. Reeds bij 1,58 cm<sup>3</sup> werd een begin van opalescentie vermoed, overeenkomende met 136,5 mg HCN in 500 cm<sup>3</sup>. Deze waarneming zal dus juist zijn geweest. Wel volgt er uit, dat bij deze verdunning de methode Liebig-Denigès niet meer te gebruiken is (1,7 mg HCN in 50 cm<sup>3</sup>). Werd 25 cm<sup>3</sup> KCN-oplossing voorgelegd zonder verdunning tot 50 cm<sup>3</sup>, dan werden voor titratie gevraagd 1,55 en 1,57 cm<sup>3</sup> AgNO<sub>3</sub> 0,02 n, overeenkomende met 135,6 mg HCN in 500 cm<sup>3</sup> voor de hoogste waarde. Dank zij de geringere verdunning was dus het omslagpunt hier eerder en beter waar te nemen, alhoewel dit blijkens de aantekeningen nog alles behalve duidelijk was.

Wij mogen dus constateeren, dat de methode Liebig-Denigès bij een

concentratie van 6,8 mg HCN in 100 cm<sup>3</sup> op den rand van bruikbaarheid staat, terwijl zij bij een concentratie van 3,4 mg HCN in 100 cm<sup>3</sup> onbruikbaar is geworden, wanneer men in beide gevallen  $\pm 1,7$  mg HCN bepaalt. Uit deze grenzen volgt, dat de methode Liebig-Denigès voor verder gebruik bij het witte-klover-onderzoek ongeschikt moet worden geacht.

Ten aanzien van de mercurinitraat-methode het volgende.

Oorspronkelijk werden alle hiervoor gebruikte vloeistoffen verdund 1 : 10, zoowel de KCN-oplossing, de mercurinitraat-oplossing, als de rhodaan-oplossing. Bij voorleggen van 25 cm<sup>3</sup> KCN-oplossing bleek bij de titratie met rhodaan (0,0051 n) het omslagpunt op ferri-ammonium-aluin niet of zeer moeilijk waar te nemen, ook bij vergelijking met een blanco in colorimeterglazen. De verklaring hiervoor is, dat bij de gebruikte rhodaan-normaliteit gewerkt wordt op de grens van de gevoeligheid van den indicator. Hieruit valt af te leiden, dat het niet gewenscht is rhodaan-oplossingen verder te verdunnen dan tot 0,01 n.

Werkende met  $\pm 0,01$  n rhodaan-oplossing werd het volgende verkregen.

Voor 25 cm<sup>3</sup> KCN-oplossing 1/10 (eind-milieu: 25 cm<sup>3</sup> Hg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + 25 cm<sup>3</sup> KCN-oplossing + 5 cm<sup>3</sup> HNO<sub>3</sub> + 10 cm<sup>3</sup> rhodaan =  $\pm 55$  cm<sup>3</sup>, aan het einde der titratie  $\pm 65$  cm<sup>3</sup>) werden gebruikt bij terugtitratie 2,2 cm<sup>3</sup> rhodaan 0,0102 n (titratie-cijfers 10,3 en 10,3 cm<sup>3</sup> rhodaan), overeenkomende met 0,605 mg HCN of 121 mg HCN in 500 cm<sup>3</sup> standaard-KCN-oplossing. Deze waarde ligt hier dus te laag. De afwijking bedraagt 135 — 121 = 14 mg HCN. Bij de titratie ligt dus de waarde 0,07 mg te laag. Een cm<sup>3</sup> 0,0102 n rhodaan = 0,275 mg HCN. De titratie ligt dus 0,25 cm<sup>3</sup> te

TABEL 20

voorgelegde cm <sup>3</sup> KCN-oplossing	buret	gevraagde cm <sup>3</sup> thio	gevonden mg HCN	mg HCN in 500 cm <sup>3</sup> oplossing	voorgelegde mg HCN
25 1 : 1	50/0,1	a. 4,9 0,101 n b. 4,9 „	6,68	133,6	6,68
25 1 : 10	50/0,1	a. 4,9 0,0101 b. 4,9 „ c. 4,9 „	0,668	133,6	0,668
25 1 : 10	10/0,02	a. 4,92 „ b. 4,92 „	0,671	134,2	0,668
25 1 : 25	10/0,02	a. 1,97 „ b. 1,97 „	0,269	134,3	0,267
25 1 : 50	10/0,02	a. 1,00 „ b. 1,00 „ c. 1,00 „ d. 1,01 „	0,136	136,4	0,134
10 1 : 50	10/0,02	a. 0,44 „ b. 0,44 „ c. 0,44 „ d. 0,44 „	0,138 0,060	137,7 150,0	0,053



laag, m.a.w. had het omslagpunt bij de terugtitratie 0,25 cm<sup>3</sup> eerder moeten zijn waargenomen. Dat deze waarde te laag ligt, zal vermoedelijk geweten moeten worden aan de terugtitratie en aan het feit, dat nog steeds getitreerd wordt bij de grens van de gevoeligheid van den indicator. Eindconclusie: met de mercurinitraat-methode laat zich 0,675 mg HCN in  $\pm 55-65$  cm<sup>3</sup> oplossing (overeenkomende met 1,04-1,23 mg HCN per 100 cm<sup>3</sup>) niet meer goed bepalen. Voor gebruik bij ons onderzoek is deze methode ongeschikt.

Wat betreft de methode Schulek werden de volgende cijfers aan de standaard-oplossing en aan verschillende verdunningen bepaald.

De kleuromslag op zetmeel was bij alle titraties scherp te zien. Bij deze bepalingen werd de KCN-oplossing niet nogmaals verdund tot 50 cm<sup>3</sup>; het volume, waarin de titratie plaats had, bedroeg dus steeds  $\pm 40$  cm<sup>3</sup>, behalve in het laatste geval 25 cm<sup>3</sup>.

Wij zien, dat deze methode onberispelijke uitkomsten geeft tot een bepaalde hoeveelheid van 0,136 mg HCN (afwijking 0,002 mg = 1,5 %) in een volume van 40 cm<sup>3</sup>, overeenkomende met 0,340 mg HCN in 100 cm<sup>3</sup> bij een bepaalde hoeveelheid van 0,136 mg HCN.

Bij de kleinste voorgelegde hoeveelheid HCN (nl.  $\pm 0,050$  mg bij een concentratie van 0,200 mg HCN in 100 cm<sup>3</sup>) werd een te hoge waarde gevonden, relatieve fout  $\pm 14$  %. Met andere woorden uitgedrukt betekent het, dat bij de titratie drie druppels te veel werden toegevoegd. De hoeveelheid titervloeistof wordt voor de gebruikte buret te klein; met een buret verdeeld in 0,01 cm<sup>3</sup> zouden zeker nog betere resultaten zijn verkregen.

De hier door ons verkregen resultaten zijn goed in overeenstemming met de gegevens van Schulek (1923) zelf. In de eerste plaats geeft hij aan, dat de methode bruikbaar is van 0,1-40,0 mg HCN in 50 cm<sup>3</sup>. In de tweede plaats geeft hij op (l.c. Tabel V): voorgelegd 0,1 mg HCN, gevonden 0,097 mg HCN, afwijking 3 %. Verder merkt hij nog op, dat 0,01 mg HCN in 50 cm<sup>3</sup> nog een sterke blauwkleuring geeft.

De methode Schulek berust op de gevoeligheid van de jood-amylumreactie. Kolthoff (1928, pag. 337) geeft hiervoor op  $1-2 \times 10^{-5}$  n jodium. Bij de Schulek-titratie, uitgevoerd met de hoeveelheden bij onze bepalingen gebruikt, wordt de omslag verkregen met één druppel = 0,02 cm<sup>3</sup> 0,01 n thio in  $\pm 40$  cm<sup>3</sup> milieu, d.w.z. een normaliteits-wijziging van  $0,5 \times 10^{-5}$ . Men zal dus practisch doen, niet in nog verdunder milieu te gaan werken. Het toepassen van b.v. 0,001 n thio verdient alleen dan aanbeveling, wanneer men het eindvolume, waarin de reactie plaats heeft, reduceert tot ongeveer op een tiende.

Op deze wijze heeft Klaassen (1931) ook inderdaad bereikt, dat van de voorgelegde 0,0197 mg HCN er 0,018 mg werden bepaald. Bij deze quanta een zeer bevredigende uitkomst. De inkrimping van volume wordt o.a. bereikt door vloeibare phenol te gebruiken in plaats van een 5%

phenol-oplossing. Karstens (1938) heeft op dit punt geen wijziging gebracht. Laatstgenoemde titreerde wederom met 0,01 n thio; waarom in dat verband niet van de oorspronkelijke Schulek-methode werd gebruik gemaakt, wordt door hem niet verklaard. De cijfers, die Karstens bepaald heeft aan zuivere KCN-oplossingen ter contrôle van zijn bepalmethode, kunnen hier buiten beschouwing blijven, daar het HCN eerst werd overgedestilleerd, zoodat zij veeleer een contrôle op deze destillatietechniek vormen.

Deze concentratie van uitgangsooplossing is bij ons onderzoek niet te bereiken, daar wij toch steeds werken met destillaten. De resultaten, die wij met de oorspronkelijke methode Schulek hebben gekregen, zijn echter volkomen voldoende voor onze doeleinden. Stel, dat wij oorspronkelijk uitgingen van 100 g klaverblaadjes om daarin b.v. 10 mg HCN te vinden ( $= \pm 10 \text{ cm}^3 \text{ AgNO}_3 \text{ 0,02 n}$ ), dan kunnen wij bij de methode Schulek volstaan met 5 tot 10 g blaadjes of zelfs nog minder.

Tot hier gekomen, mogen wij dus concludeeren, dat de methode Schulek zeer verkieselijk is. Eén punt dient echter nog onder oogen te worden gezien. Tot nu hebben wij het HCN-gehalte van zuivere cyanide-oplossingen bepaald. Het is echter reeds lang bekend, dat in verschillende destillaten van plantaardig materiaal het zgn. „vrijgemaakte” HCN geheel of ten deele gebonden kan zijn aan b.v. benzaldehyde. Hierbij is sprake van een evenwicht, dat in alcalisch milieu zeer snel verschuift onder ontleding der verbinding, wanneer een der componenten, in dit geval het HCN, b.v. bij titratie, wordt weggenomen.

Een dergelijke reactie vertoont amygdaline. Zij verklaart de voorkeur voor de methode Liebig-Denigès, daar deze juist in alcalisch milieu plaats heeft. Zie hierover verder de thesis van Wirth (1911). Omgekeerd is dit verschijnsel zeer ten nadeele van de methode Schulek, daar deze toch juist in zuur milieu wordt toegepast, omdat bij alcalische reactie BrCN niet of niet voldoende bestendig is.

Ter illustratie hiervan het volgende: Plantendestillaten, waarin amygdaline aanwezig is, zijn b.v. de pharmaceutische producten Laurierkerswater en bitter amandelwater (Aqua Laurocerasi en Aqua amygdalarum amarum). In 10 cm<sup>3</sup> Laurierkerswater werden met behulp van de methode Liebig-Denigès 10,4 mg HCN bepaald (drievoud), terwijl met de methode Schulek gevonden werd 2,2 mg HCN (drievoud).

Afgezien van de vraag of in de klaverblaadjes-destillaten het HCN in een of anderen gebonden vorm voorkomt, dan wel vrij, in welk laatste geval de methode Schulek direct toe te passen zou zijn, schenen ons de voordeelen van de methode Schulek in het algemeen voor de analyse van blauwzuur-glucosiden van zoo groot belang, dat het de moeite waard was na te gaan of deze methode kan worden aangepast aan de gedragingen van HCN in een milieu als Laurierkerswater.

De gang van de methode Schulek is als volgt: De te onderzoeken vloeistof, zoo mogelijk 50 cm<sup>3</sup>, bevattende van 0,1–40 mg HCN, wordt in een kolf met opgeslepen stop gebracht, waarna wordt aangezuurd door toevoeging van 5 cm<sup>3</sup> 20 % phosphorzuur. Hieraan wordt toegevoegd broomwater tot blijvende diep gele kleuring, waarna de overmaat Br wordt weggenomen door 2 cm<sup>3</sup> 5% phenol-oplossing; na 15 minuten staan volgt toevoeging van 0,5 g KJ, waarna, na een half uur staan in het donker, met thio wordt getitreerd, met zetmeel als indicator.

Voor het aanzuren gebruikte Klaassen azijnzuur en Karstens zoutzuur.

De bestendigheid van BrCN is bij de methode de bepalende factor. Schulek (1923) zegt hierover alleen: „Das Cyanbromid ist, wie eigene Versuche zeigten, in schwachsaurer Lösung beständig.” Het lag voor de hand te beginnen met na te gaan, waar ongeveer de grenzen liggen voor de betrouwbaarheid van de methode Schulek ten aanzien van het pH-traject. Hiertoe kozen wij weer als uitgangspunt een KCN-oplossing. Verder werd onze richting van zoeken bepaald door de vraag of de methode in alcalisch milieu bruikbaar is.

Uitgaande van 25 cm<sup>3</sup> van de verdunning 1 : 25 van de reeds vroeger gebruikte standaardoplossing van KCN, welke met de methode Schulek 1,96 en 1,97 cm<sup>3</sup> 0,0101 n thio vroegen, bleek, bij weglaten van de toevoeging van phosphorzuur en het toevoegen van enkele druppels 0,1 n NaOH, voor de titratie slechts 1,55 cm<sup>3</sup> thio 0,0101 n te worden vereischt, met dien verstande, dat de toevoeging van de gebruikelijke hoeveelheid phosphorzuur in het laatste geval plaats had onmiddellijk na de bromeering maar voor de toevoeging van phenol. Dit wees dus in de richting van de onbestendigheid van BrCN in alcalisch milieu.

Wanneer echter 25 cm<sup>3</sup> van dezelfde KCN-verdunning werden gebromeerd zonder toevoeging van zuur of loog, welke oplossing zeer zwak rose kleurde op phenolphthaleïne, dan werden vereischt 1,95 en 1,96 cm<sup>3</sup> thio 0,0101 n, dus de juiste hoeveelheid, terwijl n.b. de aanzuring met phosphorzuur hier eerst plaats had na de toediening van phenol. Deze laatste vergissing had dus blijkbaar geen invloed. In *zeer zwak alcalisch milieu* werd dus bij dezen oriënteerenden proefopzet nog *een juiste uitkomst* gevonden. Dit was aanleiding gedetailleerder in deze richting verder te zoeken.

Aan telkens 25 cm<sup>3</sup> van de verdunning 1:50 van de standaard-KCN-oplossing werden respectievelijk toegevoegd  $\frac{1}{2}$ , 1,  $1\frac{1}{2}$  en 2 cm<sup>3</sup> 0,1 n NaOH; hiervoor werden respectievelijk geëischt 0,49; 0,26; 0,08 en 0,06 cm<sup>3</sup> 0,0101 n thio, terwijl 1,00 cm<sup>3</sup> thio van dezelfde normaliteit de juiste waarde zou zijn geweest. Bij deze bepalingen werd aan de afbraak van BrCN in alcalisch milieu alle kans gegeven door pas 15 minuten na de bromeering aan te zuren.

Bij direct aanzuren na de bromeering kregen wij, gebruik makende van 25 cm<sup>3</sup> verdunning 1 : 10 van de standaard-KCN-oplossing het volgende:

methode Schulek	vraagt	5,02 cm <sup>3</sup>	thio	0,0101 n
niet aangezuurd	„	4,84	„	0,0101 „
met 2½ cm <sup>3</sup> 0,01 n NaOH	„	4,77	„	0,0101 „
met 5 „ 0,01 „ „	„	4,45	„	0,0101 „

Deze titratie-cijfers komen overeen met 135,5; 130,7; 128,8 en 120,5 mg HCN in 500 cm<sup>3</sup> standaard-KCN-oplossing.

Bij deze bepalingen werden KCN-oplossing + NaOH steeds opgevuld tot 30 cm<sup>3</sup> eindvolume; deze concentratie was dus steeds gelijk. Bij deze reeks gaf dus de zuivere Schulek de hoogste en juiste waarde. De alcaliteit, veroorzaakt door een gift van 2,5 cm<sup>3</sup> NaOH 0,01 n op 30 cm<sup>3</sup> eindvolume, geeft hier reeds een belangrijke afwijking.

Tenslotte werd aan een nieuwe KCN-oplossing nog de volgende reeks bepaald.

Voorgelegd 25 cm<sup>3</sup> KCN-oplossing, waarin zich theoretisch bevinden 1,014 mg HCN. KCN-oplossing + NaOH werden steeds met water opgevuld tot een eindvolume van 30 cm<sup>3</sup>.

TABEL 21

methode	bij titratie benodigde cm <sup>3</sup> 0,01 n thio	0,001 mg HCN
Schulek . . . . .	a. 7,12	961
	b. 7,14	964
niet aangezuurd . . . . .	a. 7,16	967
	b. 7,17	968
1 cm <sup>3</sup> 0,01 n NaOH . . . . .	a. 7,11	960
	b. 7,14	964
2 „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 7,11	960
	b. 7,11	960
2½ „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 7,02	948
3 „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 7,02	948
	b. 7,06	953
4 „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 6,92	934
	b. 6,94	937
5 „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 6,93	936
	b. 6,70	905

Men ziet uit deze cijfers, dat de bepalingen, die minder dan 2,5 cm<sup>3</sup> NaOH 0,01 n hebben ontvangen, zeer bevredigend overeenstemmende uitkomsten geven. De hoogste waarde (ditmaal „niet aangezuurd”; de afwijkingen zijn zeer gering) komt overeen met 19,4 mg HCN in 500 cm<sup>3</sup> KCN-oplossing (theoretisch aanwezig, 20,3 mg). De afwijking voor de toevoeging van 2,5 cm<sup>3</sup> NaOH 0,01 n is hier veel kleiner, nl. 0,015 mg HCN op 0,960 mg HCN, dan in het vorige geval, toen zij bedroeg 0,034 mg HCN op 0,670 mg HCN. De laagste HCN-concentratie werd dus het sterkst

aangetast. Dit zelfde valt nog met een ander voorbeeld te belichten. Tegelijk met de op de vorige pagina als eerste vermelde reeks (waarbij 25 cm<sup>3</sup> 1/10 standaard-KCN-oplossing, bij een toevoeging van 5 cm<sup>3</sup> NaOH 0,01 n, vragen 4,45 cm<sup>3</sup> thio, overeenkomende met 120,5 mg HCN in 500 cm<sup>3</sup> standaard-KCN-oplossing) werd een soortgelijke reeks, maar telkens met 10 cm<sup>3</sup> 1/10 standaard-KCN-oplossing, bepaald. Daarbij vroeg, bij een toevoeging van 5 cm<sup>3</sup> 0,01 n NaOH, de titratie 1,56 cm<sup>3</sup> 0,01 n thio, overeenkomende met 105,3 mg HCN in 500 cm<sup>3</sup> standaard-oplossing. Ook hier dus bij grotere verdunning sterkere aantasting.

De uitkomsten aan de KCN-oplossingen verkregen samenvattende, blijkt dat de methode Schulek ook bij geringe alcaliteit van de oplossing bevredigende uitkomsten kan geven. Ter gedachtebepaling berekenen wij nog, dat toevoeging van 2 cm<sup>3</sup> 0,01 n NaOH aan 30 cm<sup>3</sup> oplossing, aannemende dat deze oplossing precies neutraal is, ongeveer een pH van 10–11 geeft.

Bij voorbaat schijnt nu de toepassing van de methode op Laurierkerswater niet onmogelijk; bij geringe alcaliteit toch wordt BrCN niet te onbestendig, terwijl deze geringe alcaliteit vermoedelijk voldoende zal zijn als versneller van de evenwichtsreactie met benzaldehyde en HCN als eindproducten.

Uitgegaan werd van Laurierkerswater, waarvan 10 cm<sup>3</sup>, getitreerd volgens Liebig-Denigès, vroegen 9,9 cm<sup>3</sup> AgNO<sub>3</sub> 0,02 n (duplo), overeenkomende met 10,7 mg HCN.

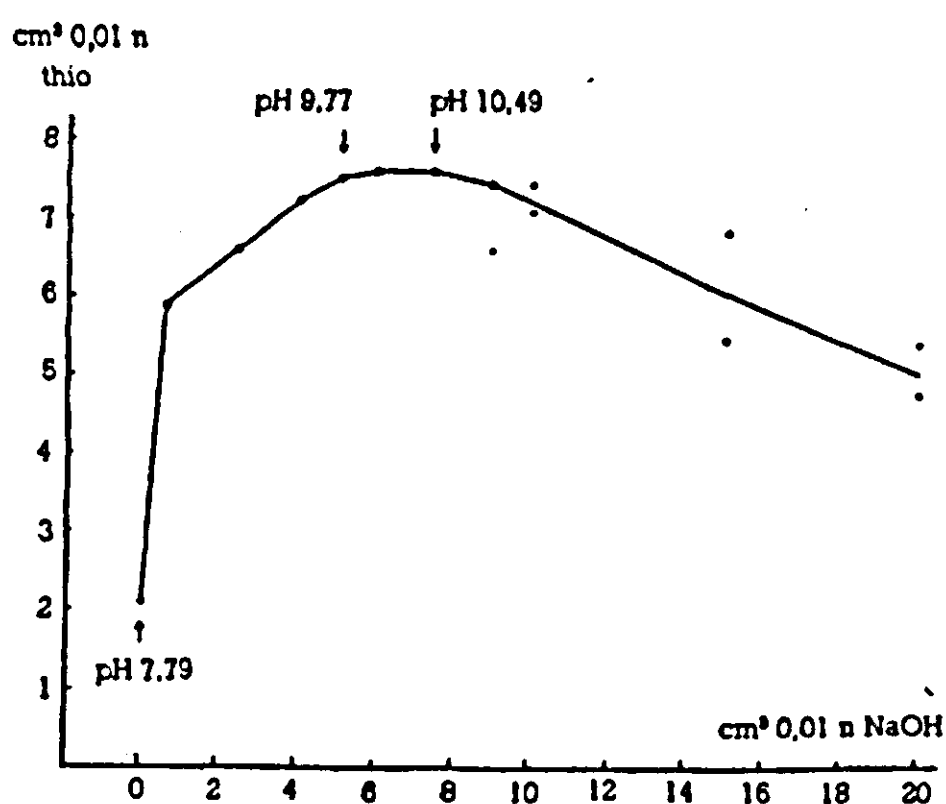
Telkens 1 cm<sup>3</sup> van dit Laurierkerswater werd verdund met 25 cm<sup>3</sup> water, waaraan werden toegevoegd 3 druppels phenolphtaleïne, vervolgens respectievelijk: eenige druppels 20% phosphorzuur of wel 1, 2, 5, 7 en 10 druppels 0,1 n NaOH, waarna werd gebromeerd en verder behandeld op de gebruikelijke wijze. Tien druppels NaOH zijn ongeveer gelijk aan 0,5 cm<sup>3</sup>; bij deze gift was de maximale kleuring met phenolphtaleïne wel ongeveer bereikt. Eén druppel 0,1 n NaOH gaf practisch nog geen kleuring te zien. Bij titratie met 0,01 n thio werden respectievelijk de volgende hoeveelheden gevraagd: 1,98 (phosphorzuur); 5,96; 6,04 en 5,84 (duplo); 6,58; 7,44; 7,71. Men ziet dus een regelmatige stijging van de hoeveelheid HCN met de toenemende NaOH-gift. Zoals wij hierboven opgaven, bevat 1 cm<sup>3</sup> Laurierkerswater volgens de methode-Liebig-Denigès: 1,07 mg HCN, terwijl 7,71 cm<sup>3</sup> 0,01 n thio volgens de methode-Schulek (laatste van de reeks: gift van 10 druppels NaOH) overeenkomt met 1,04 mg HCN. Deze overeenstemming is dus zeer behoorlijk, gezien het reeds eerder geconstateerde feit, dat de methode Liebig-Denigès steeds hogere waarden geeft dan de methode Schulek.

Thans werd voor Laurierkerswater een zoo compleet mogelijke reeks opgezet, ook met hogere NaOH-giften, om de begrenzing van het traject met juiste HCN-waarden ook naar den sterk alcalischen kant, welke begrenzing ongetwijfeld aanwezig moet zijn, vast te stellen. In stede van

uit te gaan van 1 cm<sup>3</sup> Laurierkerswater, werd met het oog op deze onnauwkeurige pipetteering uitgegaan van 10 cm<sup>3</sup> van een verdunning 1 : 10. Evenals bij de bepalingen aan de KCN-oplossing werden Laurierkerswater + NaOH steeds met water opgevuld tot een volume van 30 cm<sup>3</sup>.

Phosphorzuur werd onmiddellijk na de bromeering toegevoegd. Daar Laurierkerswater vrij instabiel is, werd opnieuw, en wel aan de verdunning 1 : 10, de HCN-waarde bepaald. Voorgelegd 50 cm<sup>3</sup> 1/10 Laurierkerswater; titratie-cijfers 4,85 en 4,8 cm<sup>3</sup> 0,02 n AgNO<sub>3</sub>, overeenkomende met 1,048 en 1,037 mg HCN in 10 cm<sup>3</sup>.

De verkregen resultaten zijn te vinden in Tabel 22 en Grafiek 12.



Grafiek 12  
Titratie van Laurierkerswater volgens de methode Schulek, waarbij het aanzuren voor de bromeering achterwege is gelaten, onder toevoeging van verschillende hoeveelheden NaOH.

Wij zien eerst met de toename van de alcaliteit een snelle stijging van de hoeveelheid HCN. BrCN wordt nog niet aangetast; de invloed van de stijgende pH op de afloopsnelheid van de besproken evenwichtsreactie wordt steeds groter. Daarna krijgen wij een vrijwel horizontaal verloopend stuk; ook hier is de onbestendigheid van het BrCN nog niet merkbaar, terwijl de afloop van de evenwichtsreactie voldoende snel is geworden. En tenslotte begint de curve langzaam te dalen, ten gevolge van de afbraak van BrCN. Deze daling is echter langzamer dan de stijging in het begin. Uit de titratiecijfers zien wij verder, dat de waarden, die voor HCN gevonden worden in het „horizontale” stuk, dus bij giften van 5, 6 en 7½ cm<sup>3</sup> 0,01 n NaOH, goed overeenstemmen met die, gevonden met de methode Liebig-Denigès, nl. 1,03 mg HCN tegen 1,04 mg HCN, waarbij de methode Liebig-Denigès weer de iets hogere waarde geeft. Wij mogen dus concludeeren, dat, door de besproken wijziging aan te brengen in de methode Schulek (vóór de bromeering alcalisch maken, na de bromeering eerst aanzuren), deze methode ook volkomen betrouwbare uitkomsten geeft bij plantaardige destillaten van het karakter van Laurierkerswater. Werd deze bepaling blanco uitgevoerd, dan bleek bij een gift van 6 cm<sup>3</sup> NaOH (alles geldende voor de gebruikte chemicaliën) een correctie noodig van ± 0,01 cm<sup>3</sup> thio 0,01 n, welke correctie groter wordt

naarmate meer NaOH wordt toegevoegd, zoo bij 15 cm<sup>3</sup> NaOH 0,01 n minstens 0,05 cm<sup>3</sup> 0,01 n thio.

TABEL 22

methode	bij titratie benodigde cm <sup>3</sup> 0,01 n thio	0,001 mg HCN
Schulek . . . . .	a. 2,12	
niet aangezuurd . . . . .	a. 2,14	
	b. 2,13	
½ cm <sup>3</sup> 0,01 n NaOH . . . . .	a. 5,86	
	b. 5,89	
2½ „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 6,54	
	b. 6,58	
4 „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 7,17	
	b. 7,18	
5 „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 7,50	1013
	b. 7,54	1018
6 „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 7,62	1029
	b. 7,69	1038
7½ „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 7,62	1029
	b. 7,63	1030
9 „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 7,38	
	b. 6,55	
10 „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 7,08	
	b. 7,46	
15 „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 5,46	
	b. 6,88 ?	
20 „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 4,77	
	b. 5,38	

Tot hier is echter de wijziging van de methode Schulek niet in een vorm gegoten, die haar praktische toepassing mogelijk maakt; ieder plantendestillaat kan toch wederom een anderen zuurgraad bezitten. De aange-  
wezen weg leek hier te zijn om de verschillende „giften NaOH” te transpo-  
neeren tot pH's van het milieu, waarin gebromeerd werd. Daartoe werden  
met de glaselectrode de volgende pH's gemeten:

Laurierkerswater 1 : 10 . . . . .	pH 7,79
toevoeging van 5 cm <sup>3</sup> NaOH 0,01 n, eindvolume 30 cm <sup>3</sup> . . . . .	„ 9,77
toevoeging van 7½ cm <sup>3</sup> NaOH 0,01 n, eindvolume 30 cm <sup>3</sup> . . . . .	„ 10,49
25 cm <sup>3</sup> KCN-oplossing + 2 cm <sup>3</sup> NaOH 0,01 n, eindvolume 30 cm <sup>3</sup> . . . . .	„ 10,28

Wij zien hieruit, dat de juiste HCN-waarden voor Laurierkerswater wer-  
den gevonden bij een pH, gelegen tusschen 9,8 en 10,5 en wel liefst zooveel  
mogelijk naar de hoogste pH verschoven. Dit is dan geheel in overeenstem-  
ming met de pH, die gevonden werd voor KCN-oplossingen, waarbij nog  
geen afbraak van BrCN plaats had, nl. 10,3.

De methode wordt dus nu praktisch toepasbaar, wanneer wij voor broeuring de vloeistof brengen op een pH van 10–10,5. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van thymolphthaleïne als indicator, waarvan het kleuromslag-traject bedraagt 9,3–10,5.

Ter contrôle van de aldus opgezette methode werden de volgende bepalingen verricht.

Van een KCN-oplossing (0,0498 g KCN Schering-Kahlbaum 97% tot 500 cm<sup>3</sup>) werd het HCN-gehalte bepaald aan telkens 10 cm<sup>3</sup> oplossing, zoowel met de methode Schulek, als met de gewijzigde methode Schulek. Met de methode Schulek werd gevonden 385 en 382 0,001 mg HCN (2,85 en 2,83 cm<sup>3</sup> 0,01 n thio) en met de gewijzigde methode Schulek 416 en 408 0,001 mg HCN (3,08 en 3,02 cm<sup>3</sup> 0,01 n thio). In 500 cm<sup>3</sup> komt dit overeen met 19,2 en 19,1 mg HCN voor de methode Schulek en voor de gewijzigde methode Schulek met 20,8 en 20,4 mg HCN, terwijl aanwezig zou moeten zijn volgens berekening 20 mg HCN. Bij herhaling werden de volgende titratie-cijfers gevonden: methode Schulek 2,83; 2,85 en 2,86 cm<sup>3</sup> 0,01 n thio en met de gewijzigde methode Schulek 3,02 en 3,06 cm<sup>3</sup> 0,01 n thio.

Bij blanco bepalingen met de gewijzigde methode Schulek bleken deze aan thio 0,01 n te eischen  $\pm 0,2$  cm<sup>3</sup>, waarmede, gezien het feit, dat de methode Schulek geen blancowaarde heeft, de hogere waarde van de gewijzigde methode Schulek verklaard is. Wij komen hierop nader terug.

Verder werden 6 verschillende monsters Laurierkerswater onderzocht op HCN-gehalte volgens de methode Liebig-Denigès en volgens de gewijzigde methode Schulek.

De volgende uitkomsten werden daarbij verkregen, waarbij voor de methode Liebig-Denigès een blancowaarde van 0,08 cm<sup>3</sup> 0,0198 n AgNO<sub>3</sub> in rekening werd gebracht en voor de gewijzigde methode Schulek een blancowaarde van  $-0,05$  cm<sup>3</sup> 0,01 n thio en een thiocorrectie van  $+0,1$  cm<sup>3</sup> (tezamen  $+0,05$  cm<sup>3</sup> thio 0,01 n). De gewijzigde-Schulek-cijfers zijn gevonden aan een verdunning van het Laurierkerswater 1 : 10; de cijfers in Tabel 23 weergegeven zijn verkregen door de uitkomst met 10 te vermenigvuldigen.

Gaf dus bij vergelijking van de beide methoden voor het opzetten van de bepaling, de methode Liebig-Denigès een uitkomst, die slechts één procent hoger lag dan die verkregen met de gewijzigde methode Schulek (zonder thymolphthaleïne), thans vinden wij bij toepassing van de volledige „gewijzigde methode”, dus bij gebruik van thymolphthaleïne als indicator ter verkrijging van de juiste alcaliteit, dat Liebig-Denigès uitkomsten geeft welke 5 tot 6% hoger liggen dan die van de gewijzigde methode Schulek.

Waar bij de toepassing van de beide methoden op zuivere KCN-oplossingen kloppende resultaten werden verkregen, geven zij bij het onderzoek van het plantendestillaat, het Laurierkerswater, eenig verschil in uit-



komsten. Wij zullen bij het bespreken van de cijfers, verkregen met de twee methoden bij de titratie van destillaten van klaverbladen, dit punt nader belichten.

TABEL 23

*mg HCN in 10 cm<sup>3</sup> Laurierkerswater*

	methode Liebig-Denigès	gewijzigde methode Schulek
Monster I . . . .	9,8	9,36
	9,8	9,36
„ II . . . .	9,85	9,25
	9,9	—
„ III . . . .	9,65	8,98
	9,65	9,03
„ IV . . . .	9,75	9,21
	9,7	9,21
„ V . . . .	9,9	9,36
	9,85	9,30
„ VI . . . .	9,5	8,81
	9,4	8,87

Bij de gewijzigde methode Schulek dient men goed op te letten, dat bij het alcalisch maken op thymolphtaleïne een behoorlijk donkere blauwkleuring wordt verkregen, daar, wanneer men alcalisch maakt tot de eerste zeer lichtblauwe verkleuring, men te lage waarden vindt, geheel in overeenstemming met het reeds opgemerkte, dat men de pH zooveel mogelijk naar de hoogste grens moet verschuiven. Thymolphtaleïne is geen gemakkelijke indicator. Een oogenblik werd aan de mogelijkheid gedacht, het brengen op een bepaalde pH met behulp van een indicator, te vervangen door een buffering van de vloeistof. Gebufferd werd met een Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/HCl-bufferoplossing, echter zonder gunstige resultaten; practisch werd geen HCN gevonden.

Methodisch valt verder nog het volgende op te merken.

Schulek (1923) schrijft voor, dat men, ter verwijdering van het vrije Br, het phenol gedurende 15 minuten moet laten inwerken, waarbij men eenige malen goed schudt. Deze termijn is door hem waarschijnlijk gekozen, als zijnde zeker voldoende. In den gang van de analyse zal deze wachttijd ook niet storen, wanneer men eenige bepalingen tegelijk verricht, daar men dezen tijd dan noodig heeft voor het afwegen van telkens 0,5 g KJ. Gedurende het gebruik van de methode hadden wij echter den indruk gekregen, dat deze termijn zeer ruim is gesteld; de ontkleuring van de vloeistof geschiedt toch meestal, bij de verdunningen door ons gebruikt, practisch op het moment van de toevoeging. Uit de volgende cijfers blijkt dit juist te zijn.

Uitgaande van een bepaald (verdund) Laurierkerswater, dus bij toe-

passing van de gewijzigde methode Schulek, werd gevonden, dat, wanneer men respectievelijk 5, 10 en 15 minuten liet staan met de phenoloplossing, bij titratie vereischt werden resp.: 4,26; 4,28 (duplo); 4,28; 4,26 (duplo) en 4,22; 4,28 (duplo) cm<sup>3</sup> 0,01 n thio. Verschillen werden dus niet gevonden. De bromeering had hierbij 10 druppels Br-water vereischt; het phosphorzuur was direct na de bromeering toegevoegd.

Een soortgelijke vraag rijst voor de toevoeging van het phosphorzuur na de bromeering. Moet dit per se direct na de bromeering geschieden dan wel kan hier ook eenige tijd overheen gaan. Deze vraag staat natuurlijk in verband met de bestendigheid van BrCN in alcalisch milieu. Om dit te controleeren werd een aantal bepalingen verricht met de gewijzigde methode Schulek aan een bepaald (verdund) Laurierkerswater.

In geval A werd het phosphorzuur toegevoegd direct na de bromeering. In geval B werd het phosphorzuur toegevoegd 5 minuten na het beëindigen van de bromeering. Het bromeeren geschiedde, volgens voorschrift, door indruppelen van Br-water tot blijvende geelkleuring. In geval C werd hierop een wijziging aangebracht: 1 cm<sup>3</sup> Br-water werd ineens toegevoegd (dit was voldoende voor blijvende geelkleuring), waarna het phosphorzuur direct werd bijgeschonken, dus als in geval A.

Van alle drie gevallen werden 10 bepalingen verricht, met de volgende uitkomsten:

- A. 4,24; 4,47; 4,33; 4,36; 4,36; 4,25; 4,37; 4,39; 4,43 en 4,41 cm<sup>3</sup> 0,01 n thio.  
 B. 4,02; 4,04; 4,19; 4,27; 3,84; 4,12; 4,21; 4,16; 4,24 en 4,15 cm<sup>3</sup> 0,01 n thio.  
 C. 4,30; 4,36; 4,27; 4,10; 4,42; 4,30; 4,37; 4,22; 4,08 en 4,29 cm<sup>3</sup> 0,01 n thio.

Het is duidelijk, dat er verschil bestaat tusschen geval A en B. De directe toevoeging van phosphorzuur geeft iets hogere waarden dan de vertraagde toevoeging. In een ander geval (de voorloopige waarneming omtrent dit punt) werd hetzelfde gevonden. Bij toevoeging van phosphorzuur direct vroeg een zeker quantum Laurierkerswater 5,32 cm<sup>3</sup> thio 0,01 n; bij toevoeging na 1 minuut 5,23 cm<sup>3</sup>; bij toevoeging na 5 minuten 5,14 cm<sup>3</sup> en bij toevoeging na 10 minuten 5,06 cm<sup>3</sup>. Chemisch staat hiermede voldoende vast, dat de toediening van phosphorzuur moet geschieden direct na de bromeering. Bovenstaande bepalingen werden echter in tienvoud ver-

richt om het gemiddelde en de middelbare fout:  $\pm \sqrt{\frac{[uu]}{n(n-1)}}$  te kunnen

berekenen. In geval A bedraagt dit 4,36 cm<sup>3</sup>  $\pm$  0,023; in geval B 4,12 cm<sup>3</sup>  $\pm$  0,040 of, wanneer men de 5de bepaling uitschakelt, hetgeen chemisch volkomen verantwoord is, 4,16 cm<sup>3</sup>  $\pm$  0,028. Het verschil van A en B en de middelbare fout van dit verschil bedragen dan 0,20 cm<sup>3</sup>  $\pm$  0,036. P (zie van Uven, 1935) bedraagt meer dan 99,99 %. Ook volgens deze berekeningswijze bestaat dus het verschil. Aardig in dit verband is de grootte van de middelbare fout van de titratiecijfers, nl. 0,023 en 0,028,

welke vrij goed overeenkomt met de grootte van één druppel van de gebruikte buret. Om te constateeren, dat men op een druppel nauwkeurig titreert, behoeft men echter geen middelbare foutenberekeningen op te zetten, dat kan men ook zoo constateeren. Wij hebben dit geval uitgewerkt om te demonstreeren, dat men bij chemische bepalingen niet steeds de foutenberekening behoeft toe te passen, met name niet daar, waar de fouten van de methode chemisch volkomen bekend zijn, zooals op analytisch terrein vrij volledig het geval is. Alleen dan is nuttige toepassing van deze berekeningen denkbaar, wanneer men uit wil gaan boven de nauwkeurigheid, die chemisch bepaald is. Meestal zal men hierin echter, zooals in ons geval, verhinderd worden, juist wederom door de begrenzing van de methode.

Vergelijken wij geval A en geval C, toevoeging van Br-water druppelsgewijs en ineens, dan zien wij, dat het verschil hier veel kleiner is, zoo het bestaat. Passen wij hier de berekeningswijzen toe, dan vinden wij voor geval C  $4,27 \text{ cm}^3 \pm 0,036$  en een verschil van A en C van  $0,09 \text{ cm}^3 \pm 0,044$ . P bedraagt 97,95 %. Men zou dus kunnen overwegen, daar waar het mogelijk is, ineens een overmaat Br-water toe te voegen. Wij zelf hebben ons steeds aan Schulek's voorschrift om te druppelen gehouden.

Schulek (1923) schrijft voor, dat men aanzuurt met phosphorzuur. Reeds eerder merkten wij op, dat Klaassen (1931) dit deed met azijnzuur en Karstens (1938) met zoutzuur. Ter oriëntering werd door ons eenmaal het gebruikelijke 20% phosphorzuur geplaatst naast 6 n zwavelzuur. Alweer op Laurierkerswater, werd met phosphorzuur verbruikt  $4,94 \text{ cm}^3 0,01 \text{ n thio}$  (gemiddelde van 2 bepalingen) en met zwavelzuur  $5,05 \text{ cm}^3 0,01 \text{ n thio}$  (id). Dit is een betrekkelijk groot verschil. Daar hierop niet verder werd ingegaan, kan hierover nader niets worden medegedeeld.

Reeds eerder werd de aandacht gevestigd op de noodzaak, alcalisch te maken tot een goede blauwkleuring op thymolphthaleïne, daar bij lichtblauwe kleuren te lage waarden worden verkregen. Ter illustratie geven wij nog de volgende cijfers, gevonden aan een verdunning van Laurierkerswater, bij directe toevoeging van phosphorzuur. Verbruikte thio  $0,01 \text{ n}$  bij een lichtblauwe verkleuring op thymolphthaleïne  $4,64$  en  $4,66 \text{ cm}^3$ ; bij een donkere verkleuring op thymolphthaleïne  $5,31$  en  $5,32 \text{ cm}^3$ . Dus een zeer aanzienlijk verschil. Men doet het beste een vergelijkingsoplossing met de juiste kleur te maken, door b.v. gebruik te maken van het buffermengsel:  $15 \text{ cm}^3 \text{ HCl } 0,1 \text{ mol} + 50 \text{ cm}^3 \text{ Na}_2\text{CO}_3, 0,1 \text{ mol}$  tot  $100 \text{ cm}^3$ ; pH 10,35.

Ten slotte de blancowaarde. Werd de Schulek-bepaling verricht op  $10 \text{ cm}^3$  water, waaraan geen thymolphthaleïne was toegevoegd, dan bedroeg de blancowaarde kloppend in viervoud bepaald:  $0,05 \text{ cm}^3 0,01 \text{ n thio}$ , dit is 2 druppels, waarbij werd aangeteekend, dat na toevoeging van den eersten druppel nog slechts een iets roode kleur overbleef, zoodat de tweede

druppel zeker te veel was. Werden echter aan deze 10 cm<sup>3</sup> water 5 druppels thymolphthaleïne toegevoegd, dan bedroeg de blankowaarde, kloppend in vijfvoud bepaald, 0,16 cm<sup>3</sup> 0,01 n thio, dit zijn 6 druppels. Bij toevoeging van 10 druppels thymolphthaleïne werden, kloppend in viervoud, 0,14 cm<sup>3</sup> thio 0,01 n vereischt (5 druppels) en bij toevoeging van 15 druppels thymolphthaleïne, de eene maal 0,14 en de andere maal 0,16 cm<sup>3</sup> 0,01 n thio. Werden echter 5 druppels thymolphthaleïne toegevoegd aan 25 cm<sup>3</sup> water, dan bedroeg de blankowaarde 0,08 cm<sup>3</sup> 0,01 n thio (3 druppels).

Er is echter bij aangeteekend, dat in deze verdunning de kleuromslag niet meer met groote zekerheid was waar te nemen, zoodat mogelijk reeds met 2 druppels had kunnen worden volstaan.

Wij mogen hieruit concludeeren, dat thymolphthaleïne zelf bij deze methode een blankowaarde heeft. Deze blankowaarde van het thymolphthaleïne (dus afgezien van de blankowaarde van de methode zonder thymolphthaleïne; wij denken daarbij aan wat eerder werd opgemerkt over een mogelijken invloed van de NaOH-gift op de blankowaarde) bedraagt ongeveer 0,15 cm<sup>3</sup> 0,01 n thio; wanneer eenmaal een bepaalde concentratie van thymolphthaleïne in de eindvloeistof is overschreden, wordt deze blankowaarde niet meer grooter. Dit is in de gevallen, dat wij 5, 10 en 15 druppels thymolphthaleïne (0,1 % alcoholische oplossing) geven op 10 cm<sup>3</sup> water. Deze bedeeing met indicator overschrijdt ook de grens van wat noodzakelijk is. Kolthoff (1928, pag. 61) geeft daarvoor op: 1–2 druppels op 10 cm<sup>3</sup>. Deze concentratie was benaderd in het geval, dat wij 5 druppels gaven op 25 cm<sup>3</sup> water, waar een lagere blankowaarde werd gevonden. Zoo bezien zal men goed doen voor een constante blankowaarde van het thymolphthaleïne te zorgen door het toedienen van een iets grooter aantal druppels dan gemeenlijk, uit een oogpunt van de werking als indicator, in de literatuur wordt voorgeschreven. Men kan daarvoor nemen 5 druppels op 10 cm<sup>3</sup>.

Ten slotte nog deze opmerking. Bij het naderen van het eindpunt der titratie (dus van J met thio) dient men zeer zorgvuldig om te schudden en na toevoeging van een druppel even te wachten, daar in tegenstelling met de normale J-amylum titratie (waar de blauwe kleur na verloop van enkele oogenblikken weer terug keert — hetgeen tenslotte ook hier geschiedt), de blauwe kleur eerst uiterst langzaam verdwijnt, vermoedelijk ten gevolge van de sterke verdunning, zoodat men geneigd is te ver te titreeren.

Keeren wij thans terug tot onze destillaten van klaverblaadjes.

In eerste instantie werd met klaverwater dezelfde bepaling verricht als met Laurierkerswater, d.w.z., dat van een bepaald klaverblaadjes-destillaat het HCN-gehalte werd bepaald, nadat eerst aan dit destillaat verschillende hoeveelheden NaOH 0,01 n waren toegevoegd. Hierbij werd dus gebruik gemaakt van de methode Schulek, met dien verstande, dat de voorgeschreven aanzuring eerst na de bromeering plaats had.

Er werd uitgegaan van telkens 10 cm<sup>3</sup> klaverwater. De uitkomsten zijn neergelegd in Tabel 24.

TABEL 24

methode	bij titratie gevraagde cm <sup>3</sup> 0,01 n thio
Schulek . . . . .	a. 3,44 b. 3,50
1½ cm <sup>3</sup> 0,01 n NaOH . . . . .	a. 3,62 b. 3,66
2 „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 3,75 b. 3,81
2½ „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 3,84 b. 3,84
4 „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 3,99 b. 4,02
5 „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 4,14 b. 4,11
6 „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 4,09 b. 4,00

Wij zien hier dus een soortgelijk verloop als bij Laurierkerswater. De daling bij te groote alcaliteit is in dit voorbeeld echter nog niet zeer duidelijk. Duidelijker is dat in het volgende geval, Tabel 25, waar wederom 10 cm<sup>3</sup> van een ander klaverwater op boven aangegeven wijze werden getitreerd.

TABEL 25

methode	bij titratie gevraagde cm <sup>3</sup> 0,01 n thio
niet aangezuurd . . . . .	a. 2,69 b. 2,70
1 cm <sup>3</sup> 0,01 n NaOH . . . . .	a. 2,83 b. 2,79
2 „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 2,84 b. 2,80
3 „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 2,78 b. 2,76
4 „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 2,74 b. 2,73
5 „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 2,60 b. 2,62
10 „ 0,01 „ „ . . . . .	a. 2,14 b. 2,24

De volgende punten moeten wij in verband met deze twee bepalingssreeksen onder de oogen zien:

1. In het eerste geval wordt de maximum-waarde bij een veel hogere NaOH-gift bereikt ( $\pm 5 \text{ cm}^3$ ) dan in het tweede geval ( $\pm 2 \text{ cm}^3$ ). De bepalingen werden aan verschillende klaverwaters verricht. Nu geschieden de bepalingen ook wel aan verschillende monsters Laurierkerswater; dit product is echter van een meer standvastige samenstelling, ook wat betreft de pH, dan de klaverwaters, welke door ons werden gestookt en die meestentijds werden opgevangen in  $10\text{--}20 \text{ cm}^3$   $0,1 \text{ n}$  NaOH, waardoor de pH zeer varieerde. Zoo is het meermalen voorgekomen, dat bij het toevoegen van thymolphtaleïne bleek, dat de uitgangsvloeistof een hogere pH bezat dan gewenscht was. Voor Tabel 24 werd dan ook aangeteekend, dat de eerste lichtblauwe verkleuring met thymolphtaleïne optrad bij een gift van  $1,85 \text{ cm}^3$   $0,01 \text{ n}$  NaOH. Hieruit volgt tevens, dat thymolphtaleïne ook hier bruikbaar is.

2. Terwijl, zooals wij gezien hebben, bij Laurierkerswater het verschil tusschen de uitkomsten van de methode Schulek en de methode, waarbij de juiste hoeveelheid NaOH is toegevoegd, zeer belangrijk is (in Tabel 22 b.v. van  $2,12 \text{ cm}^3$  tot  $7,69 \text{ cm}^3$   $0,01 \text{ n}$  thio), bedraagt dit bij klaverwater slechts enkele  $0,1 \text{ cm}^3$ . M.a.w. komt in klaverwater het HCN voor het grootste gedeelte als „vrij” HCN voor. Het verschil, dat gevonden wordt, is echter groot genoeg ( $\pm 16 \%$ ) om de wijziging van de methode Schulek ook voor klaverwater noodzakelijk te maken. Wij zullen hierna aan enkele voorbeelden zien, dat het verschil nog grooter kan zijn.

3. In het eerste geval vonden wij als hoogste waarde  $4,14 \text{ cm}^3$   $0,01 \text{ n}$  thio, hetgeen overeenkomt met  $0,559 \text{ mg}$  HCN in  $10 \text{ cm}^3$  klaverwater. Het HCN-gehalte van dit zelfde klaverwater werd bepaald met de methode Liebig-Denigès; er werd gevonden, dat  $75 \text{ cm}^3$  eischen  $4,5$  en  $4,6 \text{ cm}^3$   $0,02 \text{ n}$   $\text{AgNO}_3$ , hetgeen overeenkomt met  $0,648 \text{ mg}$  HCN in  $10 \text{ cm}^3$ . In het tweede geval vonden wij als hoogste waarde  $2,84 \text{ cm}^3$   $0,01 \text{ n}$  thio, hetgeen overeenkomt met  $0,383 \text{ mg}$  HCN in  $10 \text{ cm}^3$  klaverwater. Als het HCN-gehalte van dit zelfde klaverwater, bepaald met de methode Liebig-Denigès, werd  $0,461 \text{ mg}$  HCN in  $10 \text{ cm}^3$  gevonden ( $75 \text{ cm}^3$  vroegen  $3,15$  en  $3,2 \text{ cm}^3$   $0,02 \text{ n}$   $\text{AgNO}_3$ ). In het eerste geval vonden wij dus met de BrCN-methode slechts  $86\%$ , in het tweede geval slechts  $82 \%$  van de waarde verkregen met de methode van Liebig-Denigès.

In drie andere gevallen, waarbij nogmaals de methoden Liebig-Denigès, Schulek en gewijzigde Schulek (deze laatste dus thans met gebruik van thymolphtaleïne) met elkaar werden vergeleken, werden de waarden verkregen, in Tabel 26 afgedrukt.

De overeenstemming der herhalingen is in alle negen gevallen zeer bevredigend. Stelt men de gemiddelde uitkomst van de gewijzigde methode Schulek gelijk 100, dan zijn de gemiddelde cijfers voor de methode Schulek in de gevallen I, II en III resp. 97, 86 en 69; dit getal bedroeg in Tabel 24 84 (zie de hierboven genoemde  $16 \%$ ).

Deze onderlinge verschillen zijn belangrijk. Een verklaring kunnen wij er voorshands niet van geven.

In ieder geval geeft ook hier de gewijzigde methode Schulek andere en wel eveneens hoogere uitkomsten dan de methode Schulek, zoodat het ook bij klaverwater noodzakelijk is deze eerste methode toe te passen.

Stellen wij wederom de gewijzigde methode Schulek gelijk 100, dan vinden wij voor de methode Liebig-Denigès voor de gevallen uit Tabel 24 en 25 (bij de bespreking onder 3 behandeld) en in de gevallen I, II en III

TABEL 26

*0,001 mg HCN in 10 cm<sup>3</sup> klaverwater*

	volgens Liebig-Denigès	volgens Schulek	volgens gewijzigde methode Schulek <sup>1)</sup>
Monster I . . . . .	a. 708 b. 717	a. 583 b. 591 c. 594	a. 605 b. 609 c. 616
gemiddeld . . . . .	712 (117)	589 (97)	610 (100)
Monster II . . . . .	a. 501 b. 505	a. 389 b. 389 c. 390 d. 393	a. 451 b. 458 c. 459
gemiddeld . . . . .	503 (110)	390 (86)	456 (100)
Monster III . . . . .	a. 1480 b. 1480	a. 966 b. 968 c. 968	a. 1403 b. 1404 c. 1407
gemiddeld . . . . .	1480 (105)	967 (69)	1405 (100)

<sup>1)</sup> Thymolphthaleïne-correctie aangebracht; geen thio-correctie.

van Tabel 26 resp. 116, 121 en 117, 110, 105. De methode Liebig-Denigès geeft dus uitkomsten, die 5 tot 21% hooger liggen dan de uitkomsten met de gewijzigde methode Schulek. Nu werd in geval III (Tabel 26), waarbij dus de afwijking slechts 5% bedroeg, aangeteekend, dat de gebruikelijke bruine verkleuring van de te titreeren vloeistof bij het begin van de Liebig-Denigès-titratie achterwege bleef. In de andere gevallen trad deze bruine verkleuring wel op; het is dan ook bij de Liebig-Denigès-titratie een vrijwel normaal verschijnsel, vandaar ook de aantekening van afwezigheid. Bij Laurierkerswater is een dergelijke verkleuring niet geconstateerd. Het ligt dus voor de hand het verschil tusschen de methode Liebig-Denigès en de gewijzigde methode Schulek te wijten aan een verbruik van AgNO<sub>3</sub> door storende bijmengsels, reducties van zilver te weeg brengend, storingen, die voor de methode Liebig-Denigès in het algemeen bekend zijn, terwijl, zooals wij vroeger opmerkten, de reactie, waarop de methode Schulek berust, een veel hooger graad van specificiteit bezit. Gezien uit dit oogpunt moet dus ook bij het witte-klaver-onderzoek aan

de gewijzigde methode Schulek boven de methode Liebig-Denigès de voorkeur worden gegeven.

Zooals reeds eerder werd opgemerkt, zijn ook in de literatuur gevallen vermeld, dat de argentometrische titratie bij het witte-klover-onderzoek uitkomsten gaf, welke als volkomen foutief moesten worden beschouwd. Doak (1938) kreeg „autumn” 1938 uitkomsten, waarbij het HCN-gehalte van witte-klover-stammen absoluut niet klopt met het uiterlijk. Doak maakte meestal gebruik van de methoden van Volhard (zilvernitraat-terugtitratie met rhodaan) en van Fordos en Gélis (jodium-titratie). Volgens zijn ontdekking gaf deze jodium-titratie altijd een iets hogere waarde dan de Volhard-titratie, hetgeen hij toeschrijft aan de aanwezigheid in het destillaat van een vluchtige olie. Bij Finnemore en Cooper (1938) vindt men een opmerking, die gaat in dezelfde richting; het is echter niet uitgesloten, dat zij uit dezelfde bron komt.

Bij de bepalingen in 1938 waren de waarden gevonden met Volhard veel hoger dan die gevonden met de jodium-titratie, terwijl ook deze te hoog zouden liggen, echter lang niet in die mate. Doak (l.c.) merkt op, dat het bij de methode Volhard verkregen neerslag niet op zuiver AgCN geleek. Naar aanleiding van de onderzoekingen van Askew (1934) ging hij nu ook gebruik maken van de methode Liebig-Denigès (althans Askew gebruikte deze methode; de mogelijkheid bestaat echter, dat Doak de methode Liebig gebruikte). In zijn Tabel 3 (Doak (1938) pag. 164A) vergelijkt hij nu genoemde drie methoden aan één klover (triplicaat-bepalingen van één klaverdestillaat, of verschillende monsters van hetzelfde object?). Wij vestigen er hier de aandacht op, dat noch de methode Volhard noch de Jodium-titratie in alcalisch milieu verlopen, zoodat er van verschuivingen van evenwichten, zooals in Laurierkerswater, bij deze bepalingmethoden geen sprake kan zijn; men bepaalt dus het zgn. „vrije” HCN.

Daartegenover is dit bij de methode Liebig(-Denigès?) wel het geval. Doak vindt dan ook, dat de laatste methode een hogere uitkomst geeft dan de methode Volhard, terwijl beide veel hoger liggen dan de jodium-titratie. Ziet men af van het feit, dat de methoden Volhard, Liebig en Liebig-Denigès op zilvernitraat-titraties berusten, met de daaraan klevende fouten, welke echter voor beide bepalingmethoden toegepast op een zelfde klaverdestillaat gelijk zullen zijn, dan kan men de methode Volhard vergelijken met de methode Schulek (beide in zuur milieu) en de methoden Liebig en Liebig-Denigès met de gewijzigde methode Schulek (in eerste instantie in alcalisch milieu). Stelt men nu in Tabel 3 van Doak (l.c.) de waarde verkregen met Liebig(-Denigès?) gelijk aan 100, dan vindt men voor Volhard 75. Dit getal ligt binnen de afwijkingen, die wij vonden tusschen de methoden Schulek en gewijzigde Schulek. De verhouding van deze cijfers bij Doak kunnen wij dus niet abnormaal vinden. Hier ligt mogelijk nog een verklaring voor het feit, dat wij in Hoofdstuk III steeds



iets hogere waarden vinden bij de Nieuw-Zeelandsche witte klavers, dan overeenstemt met de klasse-grenzen; wij volgden toch steeds Liebig-Denigès, terwijl Doak gebruik maakte van Volhard, hoewel volgens zijn mededeeling de Jodium-titratie het meeste toegepast werd. Volhard en Liebig (-Denigès?) vertoonen nu beide ongeveer dezelfde fout ten opzichte van deze jodium-titratie, dus vermoedelijk de „silverfout”, welke afwijking volgens Tabel 3 van Doak zeer aanzienlijk kan zijn.

Dit alles leidt tot de conclusie, dat de gewijzigde methode Schulek in klaverdestillaten juistere HCN-waarden geeft dan de methode Liebig-Denigès.

Merken wij tenslotte nog op, dat de bepalingen, die wij verrichtten en die groote verschillen lieten zien tusschen de gewijzigde methode Schulek en Liebig-Denigès (Tabellen 24, 25 en 26), niet beperkt waren tot één tijdstip, maar aan klavermonsters van 7 Augustus en 11 Augustus 1939, 1 en 5 Augustus 1941 en 19 September 1941 plaats vonden. Deze afwijkingen zijn dus niet zoo zeldzaam als Doak's mededeeling ons zou doen kunnen gelooven.

In Tabel 26 vermeldden wij bepalingen, in triplo verricht met de gewijzigde methode Schulek, in eenzelfde klaverwater. De onderlinge fout bleef steeds beneden 2 %. In een ander geval vonden wij 1,794; 1,801 en 1,817 mg HCN; voor deze relatief groote hoeveelheid naderde de fout dus tot 1%. Ook hier bleek weer, dat het noodzakelijk is direct na de bromering aan te zuren, daar, toen men deze klaverwater-monsters na bromering 5 minuten liet staan, gevonden werd 1,728; 1,731; 1,735 en 1,744 mg HCN, dus een verlies van 0,070 mg.

Ter correcte uitvoering der methode kan niet genoeg de nadruk worden gelegd op de noodzakelijkheid de juiste kleur op thymolphthaleïne in te stellen.

## HOOFDSTUK VI

### PERIODIEKE SCHOMMELINGEN GEDURENDE DEN DAG EN DEN NACHT VAN HET BLAUWZUURGEHALTE VAN ONDER KUNSTMATIGE OF NATUURLIJKE OMSTANDIGHEDEN GEGROEIDE WITTE KLAVERS

Nu wij over een methode beschikken om zeer kleine hoeveelheden blauwzuur te bepalen, dienen wij ons te bezinnen op de vraag of wij een willekeurig *zeer klein* aantal bladen voor de bemonstering mogen gebruiken, dan wel, of ter verkrijging van een mengmonster van goede gemiddelde samenstelling niet minder dan een bepaald aantal bladen mag worden genomen. M.a.w. de cijfers, welke men bepaalt, moeten behoorlijk reproduceerbaar zijn, de duplo-bepalingen moeten behoorlijk kloppen, zooals dat bij de waarnemingen in het veld (Hoofdstuk III en IV) het geval was.

Gaat men uit van een zeer klein aantal bladen dan is te vreezen, dat de individueele eigenschappen van die paar bladen, b.v. hun ouderdom, het te bepalen cijfer sterk beïnvloeden; bij grootere aantallen heeft men meer kans op een karakteristiek gemiddelde. Om bij physiologische onderzoeken deze klip geheel of gedeeltelijk te omzeilen heeft men verschillende methoden uitgewerkt. Wij denken o.a. aan de bladhelftenmethode.

Om drie monsters van behoorlijk gelijke samenstelling van een witteklaver-plant te verkrijgen, kan men telkens ieder monster bedeele met één blaadje van één blad; men heeft dan b.v. wat betreft den ouderdom der blaadjes gelijke monsters. Treub heeft deze methode o.a. toegepast op tropische planten met drievoudig-samengesteld blad.

Verwacht men van een dergelijk drietal monsters gelijke uitkomsten, dan gaat men uit van de veronderstelling, dat de afzonderlijke blaadjes van één blad ten aanzien van b.v. het cyaan-glucoside-gehalte volkomen gelijk zijn. Het is ons echter gebleken, dat men bij gebruik van een klein aantal witte-klaver-bladen, ondanks genoemden voorzorgsmaatregel, toch nog zeer uiteenlopende uitkomsten verkrijgt, met globaal genomen een afwijking tusschen hoogste en laagste uitkomst van 25 tot 30%. Deze uitkomsten geven aanleiding om te veronderstellen, dat de blaadjes van een witte-klaver-blad niet aan elkaar gelijkwaardig zijn. De ongelijkwaardigheid der blaadjes van één blad vond haar bevestiging op ander gebied, toen een enkele maal witte-klaver-bladen op zetmeel werden onderzocht,

door kleuring met jodium na verwijderen van het bladgroen (proef van Sachs). Het bleek, dat de blaadjes onderling zeer veel verschilden in regelmatigheid van kleur en kleurintensiteit.

Tot nu toe werd het gehalte aan blauwzuur steeds berekend per gewichtseenheid. Physiologisch is het vermoedelijk juister dit te berekenen per oppervlakte-eenheid, al zal men bij een gewas als witte klaver, met een zeer dun blad, a priori geen groote verschillen tusschen beide methoden verwachten. Het was mogelijk bij gebruik van een klein aantal bladen waarnemingen hierover te verrichten. Daartoe werden van de juist geplukte klaverblaadjes op lichtgevoelig-papier afdrukken gemaakt, waarna de oppervlakte der blaadjes werd opgemeten met behulp van een schijfplanimeter, welke welwillend ter beschikking was gesteld door het Instituut voor Landmeten en waterpassen der Landbouwhoogeschool. Direct na het maken van den afdruk werden de blaadjes behandeld voor het doen van een HCN-bepaling en werd op de gebruikelijke wijze ten slotte een droge-stof-bepaling verricht. De onderlinge afwijking van triplicaatbepalingen (verkregen door telkens één blad te verdeelen over drie monsters) was bij berekening op het oppervlak wel eenige procenten kleiner, dan bij berekening op het gewicht. Practisch was deze methode echter niet te gebruiken, wanneer men met een voldoende aantal bladen wilde werken; de winst aan nauwkeurigheid weegt niet op tegen de dagenvorderende metingen. <sup>1)</sup>

Bij de vraag hoeveel of hoe weinig blaadjes men gebruiken mag, speelt ook het HCN-gehalte een groote rol.

Een en ander voerde ons tot de conclusie, dat een vaste norm niet is aan te geven. Men zal van geval tot geval moeten beoordeelen hoever men kan en moet gaan. Vraagt men ter gedachtenbepaling toch een norm, dan zouden wij als gemiddeld minimum 50 bladen per bepaling (150 blaadjes) willen noemen, hetgeen echter in bepaalde gevallen goede uitkomsten bij een kleiner aantal bladen niet uitsluit. Zoo verkregen wij o.a. werkende met een bepaalde klone steeds goed kloppende uitkomsten bij 20 bladen per bepaling.

Een en ander mogen de volgende cijfers belichten.

Nieuw-Zeelandsche witte klaver plant no 5-3-9 werd op 9 September 1940, te 14.30 uur, bemonsterd. Hiertoe werden 30 bladen op de aange-

---

<sup>1)</sup> Bij het aldus uitvoeren der vergelijking maakt men mogelijk een fout. Bij het maken van den afdruk der blaadjes heeft men nl. kans op HCN-verlies. Om dit te voorkomen kan men de blaadjes direct na den pluk opnemen in kokenden alcohol, het glucoside extraheeren en na indampen van den alcohol, door zuurtoevoeging afbreken en het HCN bepalen. De grootte der blaadjes wordt dan bepaald na extractie, waarbij men wel moet zorgen de blaadjes eerst weer op te nemen in water. Het oppervlak voor en na alcoholextractie bleek ons gelijk te zijn: oppervlak van 12 blaadjes 46,1 cm<sup>2</sup>, oppervlak zelfde blaadjes, na  $\frac{1}{4}$  h. in kokenden alcohol 96%, 46,3 cm<sup>2</sup>. Op deze wijze te werk gaande, kregen wij echter geen andere uitkomsten.

geven manier verdeeld over drie bepalingen, dus een hoeveelheid van 10 bladen per bepaling. Gevonden werd: 851, 668 en 599 0,001 mg HCN per g droge stof (procentisch 100, 78 en 70). Den volgenden dag werd dezelfde plant opnieuw bemonsterd. Wederom werden 30 bladen voor drie bepalingen genomen, thans werden echter de bladen niet regelmatig over de kolven verdeeld, dus iedere kolf ontving tien heele bladen. Uit dit oogpunt waren de monsters dus niet gelijk. De uitkomsten bedroegen 816, 764 en 679 0,001 mg HCN per g droge stof (procentisch 100, 94 en 83) dus een spreiding van 17 %; werd het HCN berekend per bladoppervlak dan werd in dit geval dezelfde spreiding van 17 % verkregen. De nauwkeurige verdeling der blaadjes over de monsters had hier dus geen voordeel opgeleverd.

Op 4 September 1940 werd Nieuw-Zeelandsche witte klaver plant no 5-1-12 bemonsterd om 14.30 uur. Twintig bladen werden op de gebruikelijke wijze verdeeld over drie kolven. Gevonden werd 1019, 827 en 821 0,001 mg HCN per g droge stof (procentisch 100, 81 en 80) en 32, 29 en 30 0,001 mg HCN per 10 cm<sup>2</sup> bladoppervlak (procentisch 100, 89 en 93). Deze bepaling is degene, die het meeste ten gunste van een berekening op het bladoppervlak spreekt. Daartegenover kunnen wij stellen de bovengenoemde bepaling aan Nieuw-Zeelandsche klaver plant no 5-3-9 op 9 September 1940, waar berekening op het oppervlak géén verbetering gaf, nl. 24, 24 en 36 0,001 mg HCN per 10 cm<sup>2</sup> bladoppervlak (procentisch 67, 67 en 100) tegenover de genoemde procentische cijfers 100, 78 en 70 bij berekening op het drooggewicht. In beide gevallen liepen g drooggewicht en cm<sup>2</sup> bladoppervlak behoorlijk evenwijdig, nl. a. 158, 162 en 151 mg droge stof tegen 43,9; 46,9 en 41,6 cm<sup>2</sup> bladoppervlak; b. 147, 154 en 141 mg droge stof tegen 36,65; 42,2 en 33,3 cm<sup>2</sup> bladoppervlak.

Deze bepalingen zijn dus alle aan een zeer gering aantal bladen verricht, terwijl ook de HCN-gehalten niet hoog zijn. Dit spreekt vooral bij de genoemde proef met klaver no 5-1-12 op 4 September 1940 met 20 bladen. De spreiding tusschen de hoogste en laagste bepaling bedraagt 3,5 0,001 mg HCN per 10 cm<sup>2</sup> bladoppervlak. Bij dit onderzoek bedroeg het bladoppervlak per bepaling ongeveer 40 cm<sup>2</sup>, zoodat bij de titratie de hoogste en de laagste bepaling  $4 \times 3,5 = 14$  0,001 mg HCN uit elkaar lagen. Dit komt overeen met  $\pm 0,1$  cm<sup>3</sup> thio 0,01 n. De verschillen bij de titratie zijn dus betrekkelijk gering.

Dat de gevonden verschillen niet veroorzaakt worden door bepalingfouten volgt uit de volgende proef. Tevens valt daarbij het licht scherp op het feit, dat bij een laag HCN-gehalte een verhooging van het aantal bladen niet altijd direct tot voldoende resultaten behoeft te leiden.

Op 28 Augustus 1940 werden van Nieuw-Zeelandsche witte klaver plant no 6-4-5 om 15.30 uur, 130 bladen geplukt en op de gebruikelijke wijze verdeeld in drieën. Van ieder der drie werd echter wederom een dublobepaling verkregen door halveering. Aldus kregen wij 6 bepalingen, nl.  $3 \times 2$ . De uitkomsten bedroegen 83 en 87 0,001 mg HCN per g droge stof,

155 en 150 0,001 mg HCN per g droge stof en 171 0,001 mg HCN per g droge stof. Van het laatste paar ging de tweede bepaling verloren. Wij zien, dat de directe duplo's goed overeenstemmen, terwijl de monsters onderling sterk van elkaar afwijken. Het HCN-gehalte was bij deze bepalingen zeer laag. Ook hier bleven wij, wat betreft het aantal bladen, nl. 43 bladen per bepaling, nog onder de door ons genoemde norm van 50 bladen per bepaling.

Wij vestigen er de aandacht op, dat bij de berekening van het HCN-gehalte op de droge stof, men bij onzorgvuldige behandeling gevaar loopt, dat het drooggewicht te hoog uitvalt door aanhangend zand enz. Als contrôle achteraf, kan men aannemen, dat de drooggewichten van de op boven aangegeven wijze verkregen drietallen monsters, nooit meer dan 10–15 % uit elkaar mogen liggen. Deze waarde is uit onze bepalingen af te leiden en is tevens in overeenstemming met het volgende.

Tweemaal werd door ons van een witte-klover-plant het groengewicht van de afzonderlijke blaadjes van 25 bladen, door weging op een torsiebalans, bepaald. In beide gevallen gaf de sommatie van de gewichten van de linker-, de midden- en de rechterblaadjes een onderlinge afwijking van 10 % te zien. De drooggewichtsbepaling geschiedde door ons na allerlei bewerkingen (HCN-destillatie), zoodat aannemelijk is, dat daarbij de spreiding iets grooter is dan bij het groengewicht, dus 10–15 %. De weging der afzonderlijke blaadjes van een blad werd in eersten aanleg uitgevoerd om na te gaan of de samenstelling van het witte-klover-blad zoo regelmatig is, dat in stede van het gewicht het aantal blaadjes als basis voor de HCN-berekening kon worden gebruikt (wel te verstaan wanneer de drie blaadjes over verschillende monsters werden verdeeld). De cijfers waren echter in die richting niet voldoende bevredigend.

Samenvattend kunnen wij dus zeggen, dat niet met een te klein aantal bladen dient te worden gewerkt en dat van geval tot geval de mogelijkheden moeten worden onderzocht. Een overeenstemming van cijfers met minder dan 10 % speling dient men echter niet te verwachten. Dit houdt een waarschuwing in voor het werken met enkele bladen bij selectie.

Voor onze eigen hierna te noemen bepalingen beteekende dit vooronderzoek een groote handicap.

Alle tot nu genoemde bepalingen werden verricht door, zooals in Hoofdstuk I beschreven werd, de blaadjes te doden bij 60 °C en te digereeren bij 30 °C gedurende een nacht, waarna het HCN werd afgedestilleerd en getitreerd volgens de gewijzigde methode Schulek. Het drooggewicht werd bepaald door na de HCN-destillatie droog te dampen en te drogen bij 105 °C.

Ten aanzien van de methodiek van het onderzoek valt nog op te merken, dat de temperatuur voor het doden der bladen niet hooger gekozen moet worden dan 60 °C. 70 °C heeft reeds een merkbaar nadeeligen invloed op de enzyme-activiteit, terwijl de minder gunstige werking van 50 °C slechts

uiterst weinig merkbaar is. Zoo werd in een bepaald geval gevonden (witte klaver Nieuw-Zeeland no 5-1-3, 1 September 1940) bij 70 °C 140 0,001 mg HCN per g droge stof; bij 60 °C 354 0,001 mg HCN per g droge stof en bij 50 °C 359 0,001 mg HCN per g droge stof.

Tenslotte vestigen wij er hier wederom de aandacht op, dat de cijfers verkregen werden aan klonen-materiaal. Alle planten stonden buiten in den vollen grond.

Wij willen hier de gelegenheid nogmaals aangrijpen om te wijzen op de groote verschillen in gehalte, die men op verschillende tijdstippen bij één klone kan vinden. Boven vermeldden wij de uitkomsten verkregen op 4 September 1940 met Nieuw-Zeelandsche klaver no 5-1-12 nl. 889 0.001 mg HCN per g droge stof gemiddeld. Deze zelfde plant werd voor hetzelfde onderzoek ook reeds bemonsterd op 29 Augustus 1939, dus ongeveer een jaar tevoren, des middags te 16.15 uur. Toen werd gevonden gemiddeld 2670 0,001 mg HCN per g droge stof, dus ongeveer het drievoudige. De plant had gedurende dat jaar dezelfde standplaats behouden.

Voor het brengen van de witte-klaver-planten onder kunstmatige, te controleeren, omstandigheden, stonden slechts primitieve hulpmiddelen ter beschikking. De proeven beperkten zich tot het doelbewust constant houden der belichting.

Temperatuur en relatieve luchtvochtigheid werden slechts gedeeltelijk beïnvloed en konden niet constant worden gehouden. Het constant houden der belichting geschiedde op verschillende wijzen. Eénmaal werd over een witte-klaver-klone op het vrije veld een hut (van gaas) gebouwd, waarbinnen lampen werden aangebracht, een ander maal werden planten in kistjes binnen deze hut geplaatst. Meerdere malen werden planten met kluit en al gebracht in een kistje en geplaatst in een donker vertrek, waar een bepaalde belichting werd gegeven. Vooral in deze opstelling was de temperatuur betrekkelijk constant, mede door de geïsoleerde ligging van het vertrek, terwijl de relatieve luchtvochtigheid kunstmatig kon worden opgevoerd. Ten slotte werd een hut gebouwd over planten in een verwarmde kas, binnen welke hut lampen werden aangebracht. In dit laatste geval werd de temperatuur in de hut gedeeltelijk beheerscht met een ventilator, terwijl door het inblazen van vochtige lucht de relatieve luchtvochtigheid op peil kon worden gehouden. Ter belichting der planten werd gebruik gemaakt, zoowel van elektrische gloeilampen als van neon-lampen, nl. de zgn. Philips-kamerplantenbestralers. Deze laatste bieden door hun groote handelbaarheid, zoowel wat betreft formaat als vereischte voltage (220 V), voordeelen, die opwegen tegen hun betrekkelijk geringe capaciteit. Het (in-) en uitschakelen geschiedde meestentijds door schakelklokken. De temperatuur werd geregistreerd met behulp van een thermograaf of afgelezen bij monsternamen. Ter bepaling van de relatieve luchtvochtigheid werd gebruik gemaakt van een eenvoudige hygrometer.

Daar dus geen goede „cultuurcellen” ter beschikking stonden, vereischte het tot behoorlijke ontwikkeling brengen van de witte klaver onder deze kunstmatige omstandigheden veel zorgen; voor het slagen der proeven moet men toch met een zooveel mogelijk normaal gewas te doen hebben. Daarvoor was het o.a. noodig om de planten eenige dagen voor de proefneming reeds onder de gekozen omstandigheden te brengen. Dit zal duidelijk zijn na wat in de vorige hoofdstukken over de lw is gezegd en het is ook uit de hierna te noemen proeven duidelijk te voorschijn getreden.

Op 10 Juli 1940 werd een witte-klaver-klone (no onbekend door de oorlogsomstandigheden) bemonsterd, die sinds 1 Juli 1940 in een licht-afsluitende gazen kooi ( $\pm 1 \times 1 \times 1$  m) licht had ontvangen van 1 neonlamp op 60 cm hoogte gedurende 12 uur per dag (van 9—21 uur). Aangevend werd, dat na deze periode van 9 dagen de plant zich blijkbaar aan de belichting had aangepast, daar de slaapstand zich had aangepast. Uit een en ander viel echter wel af te leiden, dat deze belichting op den langen duur niet voldoende was. De klone stond in kistjes. De kooi was tot halve hoogte van binnen wit, ter weerkaatsing van het licht.

De geplukte bladeren werden op de gebruikelijke manier gescheiden van de stelen, gedood bij 60 °C, gedigereerd, gedestilleerd op zandbad en getitreerd volgens de gewijzigde methode Schulek. Drooggewicht-bepaling volgde na destillatie door drogen bij 105 °C. <sup>1)</sup>

Des morgens 10 Juli 1940 werd om 9.15 uur het licht aangestoken en tegelijkertijd werd bemonsterd. De uitkomsten van dit en volgende tijdstippen zijn neergelegd in Tabel 27.

Wij vinden hier dus het beloop van de curve terug, zooals wij dit in Hoofdstuk IV vonden, nl. een maximum, in dit geval 4 uur nadat het licht is ontstoken. Deze uitkomst werd echter verkregen bij constante, weliswaar zwakke, belichting; dit in afwijking van de belichting in het vrije veld, welke niet constant is. De temperatuur was niet constant, al bedroeg de grootste schommeling van 10 tot 16.15 uur slechts 3 °C; de temperatuur was hoog.

De hut stond aan de Noordzijde van een kas en was zodoende gevrijwaard voor directe zonbestraling.

Ook hier zien wij weer het reeds vaker geconstateerde verschijnsel, dat 's ochtends het gehalte hooger is dan den vorigen middag, dit dus ondanks het feit, dat de klaverplant gedurende 10 dagen een constante belichting had ontvangen. Misschien moet men niet te veel waarde hechten aan dit bijzondere cijfer, daar het de laatste bladen van de betreffende planten waren. Onwillekeurig zullen deze minder representatief zijn, hetgeen reeds spreekt uit een iets gedaald drooggewicht van een gelijk aantal bladeren.

---

<sup>1)</sup> Later is gebleken, dat men deze klaverblaadjes beter bij 95° C kan drogen. Men voorkomt daarmee het iets bruin worden der massa en den daarmee gepaard gaanden zoeten reuk.

TABEL 27

datum en uur van monstername	temp. °C	0,001 mg HCN per g droge stof
10 Juli 1940:		
9.15 licht aan .	22,5	820
10.00 . . . . .	26	880
10.45 . . . . .	27	1055
13.30 . . . . .	29	1250
15.15 . . . . .	28,5	1060
21.15 licht uit .		
11 Juli 1940:		
9.00 . . . . .	19	1280

Ons is vaak bij deze proeven gebleken, dat hoezeer men ook streeft naar een volkomen onwillekeurige bemonstering men desondanks bij het eerste monster het hoogste drooggewicht verkrijgt, blijkbaar tengevolge van den pluk van de (grootste) boven-bladeren.

Op 21 Augustus 1940 werd des avonds een zeer grootbladige witteklaver-plant, die juist was uitgestoken en in een kist geplaatst, gebracht in een donker vertrek. Temperatuur 20 °C. Relatieve luchtvochtigheid 75%. Het weer was dien dag vrij koud en regenachtig geweest (Temp.: op 2 m max. 15,8 °C, op 10 cm 17,2 °C. Neerslag 3,3 mm).

Den volgenden ochtend, den 22sten Augustus 1940, werd vanaf 9.20 uur de plant belicht met 4 gloeilampen van 100 Watt op 60 cm hoogte boven het topblad, welke lampen in vierkantsverband boven de kist waren opgehangen. De temperatuur bedroeg op dat moment 20 °C en deze was gedurende den nacht constant gebleven (thermograaf-waarneming). De relatieve luchtvochtigheid bedroeg 70 %. Na bemonstering werden de blaadjes op de ook bij de vorige proef aangegeven wijze behandeld. De resultaten zijn neergelegd in Tabel 28.

TABEL 28

datum en uur van bemonstering	temp. °C	relatieve luchtvochtigheid %	0,001 mg HCN per g droge stof
22 Augustus 1940:			
9.00 . . . . .			1315
9.20 licht aan . . . . .	20	70	
11.20 . . . . .	21,5	82	1600
12.20 . . . . .	21	65	1225
13.20 . . . . .	21,5	81	1455
15.20 . . . . .	23	79	1610

Deze proef werd genomen met 20 bladeren per bepaling (boven als voorbeeld reeds aangehaald) terwijl de duplo-bepalingen redelijk overeenstemden. De afwijkingen bedroegen resp. 5, 12, 10, 13 en 1%.



De temperatuur was vrijwel constant, grootste afwijking 3 °C. De relatieve luchtvochtigheid vertoonde nogal groote schommelingen, de inzinking om 12.20 uur tot 65 % is echter slechts van korten duur geweest, zoodat de invloed vermoedelijk niet van beteekenis was.

Ook hier zien wij dus enkele uren na het begin der belichting een maximum van het HCN-gehalte. Na de inzinking om 12 uur begint de lijn echter weer te stijgen. Dit beeld kennen wij van de gevallen waar de periodieke schommeling van uur tot uur wordt verstoord door den gang van dag tot dag, nl. wanneer deze laatste stijgende is, dus in de gevallen, dat de opeenvolgende dagen niet gelijkwaardig zijn.

Dit nu is hier het geval; de plant is kunstmatig gebracht van een betrekkelijk kouden regenachtigen dag in een dag met hoog(er)e temperatuur bij een constante belichting, welke niet krachtig was, n.l. te vergelijken met een somberen dag. De stijging van de middaglijn zal dus wel geweten moeten worden aan de verstoring van den regelmatigigen gang; de plant was nog bezig zich op de nieuwe omstandigheden in te stellen.

Deze proefneming werd op 24 en 25 Augustus 1940 herhaald met een andere witte-klaver-plant. De opzet was geheel dezelfde, behalve dat een grooter aantal bladen per bepaling werd gebruikt en dat de plant reeds 22 Augustus in de donkere kamer werd gebracht en dus op 23 Augustus werd belicht op de aangegeven wijze.

Ter contrôle van de HCN-titraties werden in dit geval alle destillaten opgevuld tot 110 cm<sup>3</sup>, waarvan telkens 2 × 50 cm<sup>3</sup> werden getitreerd. Uitkomst: zeer goed kloppende cijfers.

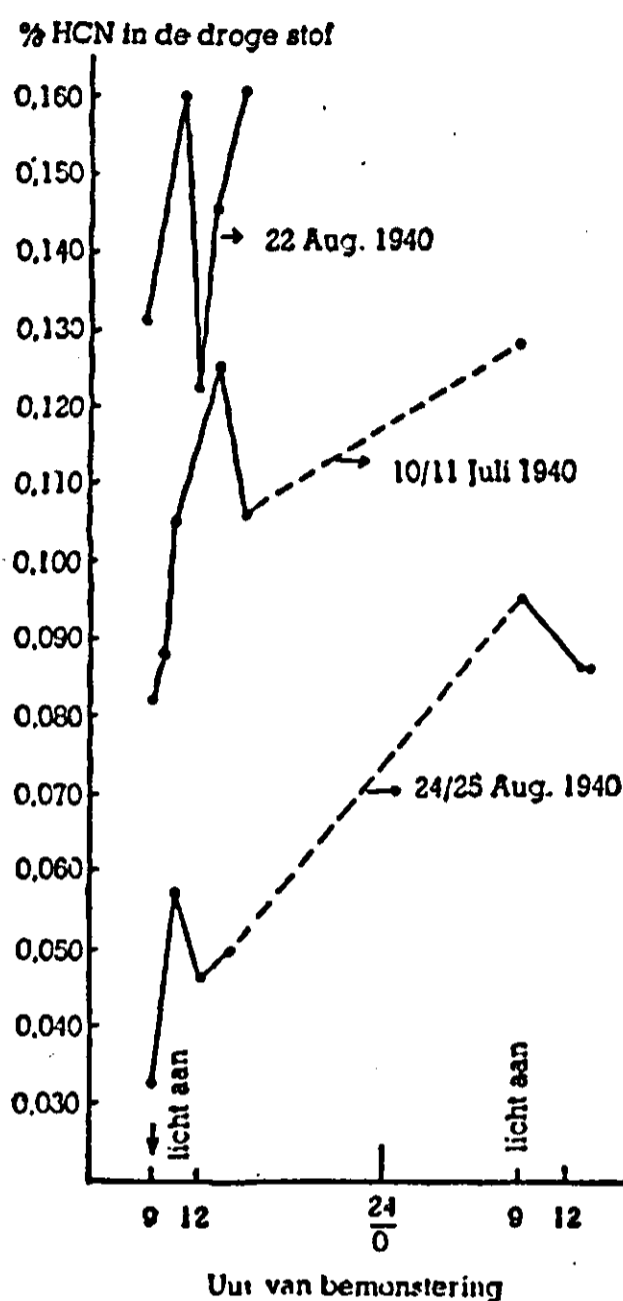
TABEL 29

datum en uur van bemonstering	temp. °C	relatieve luchtvochtigheid %	0,001 mg HCN per g droge stof
24 Augustus 1940:			
9.00 licht aan . . . .	18	70	325
10.30 . . . . .	20	80	570
12.15 . . . . .	24	87	460
14.00 . . . . .	21	77	495
21.00 licht uit . . . .			
25 Augustus 1940:			
9.00 licht aan . . . .	18	72	950
12.45 . . . . .	20,5	79	860
13.30 . . . . .	22	90	860

Bij het begin van de belichting op 24 Augustus 1940 des morgens om 9 uur stonden de blaadjes in slaapstand (den vorigen ochtend om 9 uur niet). De uitkomsten zijn opgenomen in Tabel 29.

Op den 24sten Augustus zijn temperatuur en relatieve luchtvochtigheid bij deze proefneming aanzienlijk minder constant dan bij de vorige proeven.

Ook hier zien wij weer enkele uren na het begin der belichting een top in de HCN-gehalte-curve. Blijkbaar heeft de aanpassing reeds effect gehad, want het is de vraag of 's middags de curve weer stijgt (toename 7%).



Grafiek 13, behorende bij de tabellen 27, 28 en 29.

Op den 25sten Augustus des ochtends is de HCN-waarde bij het aansteken der verlichting het dubbele van de waarde van den vorigen middag. Dezen dag heeft er van 12.45–13.30 geen stijging meer plaats; om den ochtendtop te zien te krijgen werden in dit geval te weinig monsters genomen. Zet men dezen laatsten dag grafisch uit dan heeft men wederom een voorbeeld van een bedriegelijke afbeelding.

Beschouwt men tenslotte de thans besproken curven te zamen, zooals afgebeeld in Grafiek 13, dan vraagt men zich af of de ochtendtop op 10 Juli later valt dan op 22 en 24 Augustus. Op 10 Juli werd uitsluitend belicht met 1 neon-lamp, bij de andere proeven werd gebruik gemaakt van 4 gloeilampen van 100 Watt. In het laatste geval was de belichting dus sterker. De proeven werden niet genomen met dezelfde witte-klaverplant.

Voorloopig kunnen wij concludeeren, dat bij constante belichting een bevestiging wordt gevonden van het verloop overdag van het HCN-gehalte,

zoals wij dat bij veldwaarnemingen, bij wisselende belichting, hebben vastgesteld.

Bij de volgende bepalingen werden steeds naast de HCN-titraties suikerbepalingen verricht.

In het voorgaande namen wij als verklaring voor een sterke stijging van de HCN-curve in den namiddag een verstoring van de gelijkmatigheid van de op elkaar volgende dagen aan.

De volgende twee proefnemingen zijn nogmaals zulke gevallen met bijzonder sterke stijging in den namiddag, thans dus bij constante belichting, waarbij echter nu anderszins aannemelijk kan worden gemaakt, dat wij niet met onder normale omstandigheden groeiende planten te maken hebben.

Op 30 September 1940 werd Nieuw-Zeelandsche klaver no 6-1-13 in het proefvertrek gebracht. Belicht werd met 8 lampen van 100 W en 1 neonlamp. Gedurende twee dagen verbleef de plant daar ter aanpassing, waarna op 3 October de proef genomen werd. De gegevens zijn neergelegd in Tabel 30.

TABEL 30

datum en uur	temp. °C	relatieve lucht- vochtigheid %	0.001 mg HCN per g droge stof	in alc. opl. suikers als mg glucose per g droge stof	niet in alc. opl. suikers als mg glucose per g droge stof	totaal suikers als mg glucose per g droge stof
<b>1 October 1940:</b>						
9.00 licht op .	4					
10.00 . . . . .	14	91				
19.30 licht uit .	23	75				
<b>2 October 1940:</b>						
9.15 licht op .	4	85				
10.00 . . . . .	14	84				
11.00 . . . . .	21	80				
13.00 . . . . .	21,5					
17.00 . . . . .	23	73				
19.30 licht uit .						
<b>3 October 1940:</b>						
10.00 licht op .	12,5	83				
10.45 . . . . .	19	80	99	66		
11.45 . . . . .	19	80	107	56		
12.45 . . . . .	21	75	93	84	91	175
13.45 . . . . .	21	76	75	90	81	171
15.45 . . . . .	21,5	76	143	96	79	175
19.30 licht uit .	23	69				
<b>4 October 1940:</b>						
10.00 licht op .						
10.45 . . . . .	17,5	82	70	84	114	198

Temperatuur en relatieve luchtvochtigheid zijn gedurende de proef vrij behoorlijk constant. Vergelijken wij de temperatuur van 3 October met die

van 1 en 2 October dan zien wij wel verschil. Voor de aanpassing van de plant was dus wel het licht gelijk gedurende de op elkaar volgende dagen, maar de temperatuur was gedurende de voorgaande dagen lager dan den dag van proefneming.

Wij zien hier dus voor het HCN-gehalte 's ochtends een geringe stijging, welke niet geheel vast staat, waarop een scherpe daling volgt, om dan des middags haast met 100 % te stijgen.

Van 12.45 tot 15.45 daalt echter het gehalte aan niet in alcohol oplosbare suikers (dus zetmeel enz.) van 9,1 op 7,9 %. Gesommeerd met de wel in alcohol oplosbare suikers is het gehalte betrekkelijk constant: 17,5 – 17,1 – 17,5 %. Wij wijzen terloops op het hoge percentage in alcohol oplosbare suikers bij vergelijking met het percentage aan niet in alcohol oplosbare suikers.

Dit dalen van de niet in alcohol oplosbare suikers „midden overdag” bevestigt, dat het verloop der stofwisseling gedurende de proef niet normaal is.

Iets dergelijks kregen wij nog te zien aan Nieuw-Zeelandsche witteklaver-plant no 6-4-9, een in habitus zeer afwijkende plant, met groot donker blad, die zeer lange stengels had. Deze plant werd 4 October onder de bovengenoemde verlichting gebracht. Deze belichting was voor deze plant onvoldoende; althans bij het begin van de proef op 7 October, dus na eenige dagen van aanpassen, werd aangeteekend, dat de plant al iets geel begon te worden. De resultaten zijn in Tabel 31 weergegeven.

TABEL 31

datum en uur	temp. °C	relatieve luchtvochtigheid %	0.001 mg HCN per g droge stof	in alc. opl. suikers mg glucose per g droge stof	niet in alc. opl. suikers mg glucose per g droge stof	totaal suikers mg glucose per g droge stof
7 October 1940:						
9.30 licht aan .						
10.30 . . . . .	23	81	85	92	91	183
13.40 . . . . .	28	69	56	76	87	163
15.00 . . . . .	26	68	1190	19	83	102

In dit geval valt de zeer abnormale stijging van het HCN-gehalte in den namiddag op, maar tevens de sterke daling van alle suikercijfers.

Is hier de afvoer van de assimilaten in vollen gang (men denke hierbij aan het vergelen van de plant), terwijl in de vorige Tabel deze afvoer begon (nl. daling van de niet in alcohol oplosbare suikers, bij een vrij constante totaal waarde)?

Vermoedelijk heeft tot het verkrijgen van deze abnormale curven medegewerkt de natuurlijke innerlijke toestand van de planten. Deze waren toch gewoon gegroeid onder vrije-veld-omstandigheden en waren dus zeer waar-

schijnlijk begin October bezig zich voor te bereiden op den winter. In dat verband kan het brengen bij betrekkelijk hooge temperatuur, zooals wij gedaan hebben: 23–28–26 °C, dus de groote temperatuursprong, mede van invloed zijn geweest.

Tabel 30 en 31 kunnen dus als abnormale gevallen worden geanalyseerd. Bij beide zien wij als kenmerkende eigenschap des middags de HCN-curve sterk stijgen, na betrekkelijk sterke daling volgend vermoedelijk op een zwakken ochtendtop.

In de beide laatste gevallen werden de klaverblaadjes direct gedood in alcohol 96 % (kokend), daarna geëxtraheerd met 96 % alcohol ( $\frac{1}{2}$  h) en 70 % alcohol ( $\frac{1}{2}$  h). Alcohol verdampt, residu opgenomen in water, gehydrolyseerd en HCN overgedestilleerd. Blaadjes gedroogd en daarna gewogen, waarna geïnverteerd met 3 % HCl (3 uur op waterbad). Fehlingtitraties.

Resten ons de waarnemingen aan Nieuw-Zeelandische witte-klaver-plant no 6–5–1, welke gedaan werden op 24, 25 en 26 September 1940 en 2 en 3 Februari 1941.

Voor de eerste proefnemingen werd deze klaverklone op het vrije veld uitgegraven en in kistjes gezet. Na afloop van de proef werden deze planten gescheurd en uitgepoot in het tablet van een warme kas, waar de proef van 2 en 3 Februari werd genomen door over de planten een hut te bouwen. Gedurende den winter kregen deze planten een extra neonbelichting, welke echter — tengevolge van de noodzakelijke verduistering — geen dagverlenging gaf. Eerst in Januari 1941 kon na het aanbrengen van de hut de dag worden verlengd bij een volledig kunstmatige belichting. De planten groeiden zeer goed.

Op 24, 25 en 26 September bedroeg de belichting 8 gloeilampen van 100 W en 1 Neon-lamp bij een beschenen oppervlak van  $\pm 1$  m<sup>2</sup> en een hoogte van de lampen boven de planten van 60 cm; op 2 Februari 1941 bedroeg zij 8 lampen van 100 W en 2 neon-lampen, echter op een  $1\frac{1}{2}$  à 2 × zoo groot oppervlak, terwijl van deze verlichting op 3 Februari 4 gloeilampen van 100 W werden uitgeschakeld om na te gaan of deze vermindering van lichtintensiteit was terug te vinden in de analysecijfers.

Terwijl de relatieve luchtvochtigheid tot nu toe bij alle kunstmatige culturen op een betrekkelijk hoog peil te houden was — op enkele uitzonderingen na kwamen wij niet onder 70 %, echter ook niet boven de 90 % — was deze bij de proefneming van 2 en 3 Februari betrekkelijk laag, meest tusschen 55 en 60 %. Zooals reeds werd opgemerkt, groeiden de planten echter sinds drie maanden onder deze omstandigheden uitstekend.

Van constante temperatuur was bij deze laatste proef geen sprake; de schommelingen bedroegen 11 °C, terwijl zij gemiddeld ook lager lag dan bij de andere proefnemingen. Op 25 en 26 September 1940 was de temperatuur nog niet al te onvast, al kan men van een constante temperatuur niet meer spreken.

De plant werd in den middag van 23 September in het proefvertrek geplaatst. Op 24 September was de temperatuur hoog (in den namiddag 27 °C), zoodat wij een aanpassing mogen verwachten, zooals dat ook in Tabel 28 het geval was. Op 23 September 1940 bedroeg de maximum buitentemperatuur op 2 m 19,0 °C en op 10 cm 22,2 °C; er viel 0,1 mm neerslag. Op 25 en 26 September was de temperatuur lager nl. oplopende tot 21 °C vanaf 15° en 14,5° C, dus op beide dagen met een vrijwel gelijk verloop.

Op 24 September werd iedere bepaling verricht aan 150 bladen; in verband met het beschikbare materiaal werd dit op 25 en 26 September verminderd tot 75 bladen, hetgeen gezien de voorproeven volkomen toelaatbaar was.

Het totaal gehalte aan suikers — uitgedrukt als mg glucose — werd bepaald.

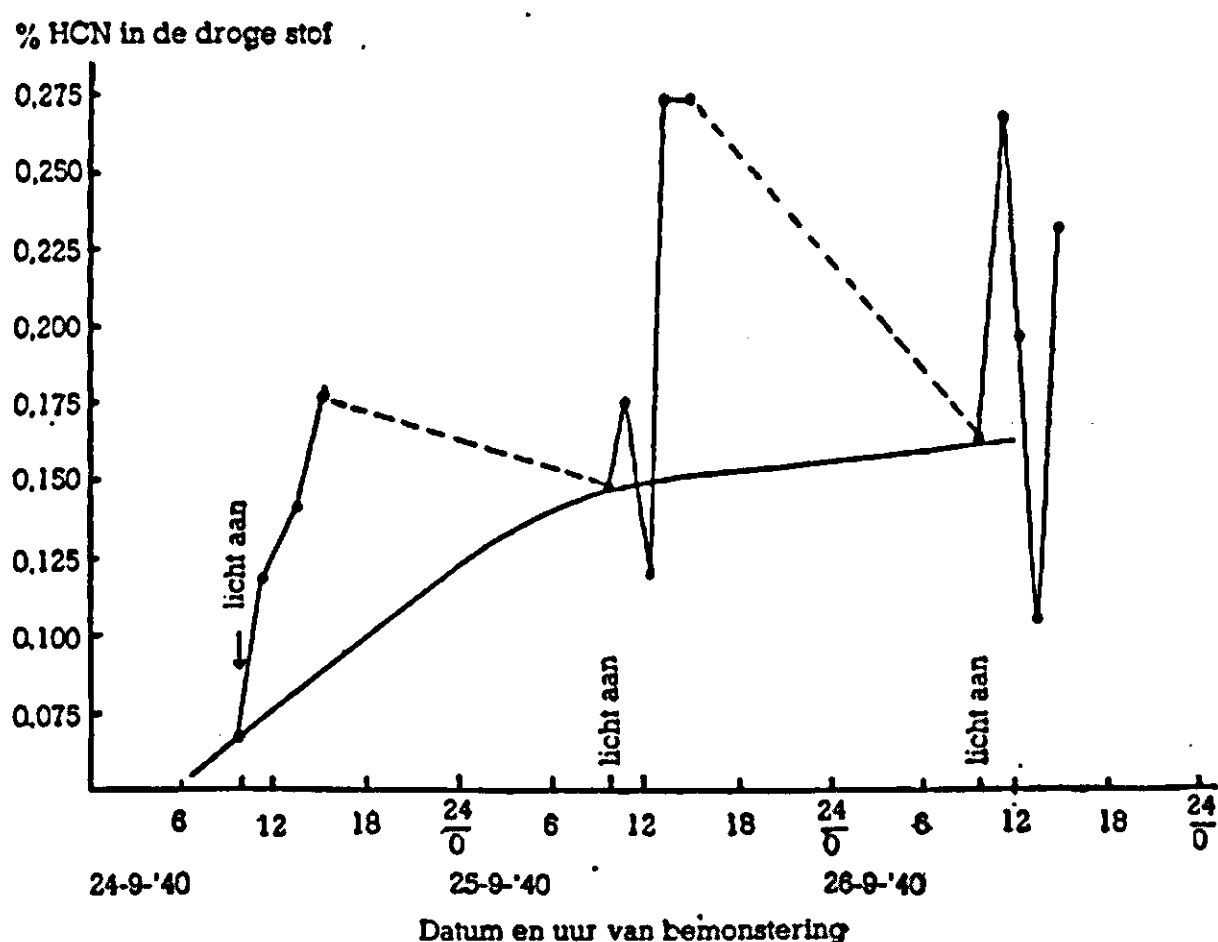
De resultaten zijn neergelegd in Tabel 32 en in Grafiek 14.

TABEL 32

datum en uur	temp. °C	relatieve lucht- vochtigheid %	0,001 mg HCN per g droge stof	mg glucose per g droge stof	mg glucose per g droge stof na aftrek van	
					1 mol glucose per mol HCN	2 mol glucose per mol HCN
24 Sept. 1940:						
licht aan 9.45	16	74	677	—	—	—
11.15	20	70	1189	99	93	87
13.30	27	68	1412	99	92	85
15.00	27	66	1769	112,5	101	89
licht uit 21.45	(neonlamp reeds om 16.00 uur)					
25 Sept. 1940:						
licht aan 9.45	15	75	1475	114	104	94
10.45	17	70	1750	108	96	85
12.30	20	72	1214	120	112	104
13.30	21	72	2727	119	101	83
15.00	21	70	2739	109	91	73
licht uit 21.45	(neonlamp reeds om 16.00 uur)					
26 Sept. 1940:						
licht aan 9.45	14,5	77	1634	104	93	82
11.30	19	72	2667	124	106	88
12.30	20	71	1968	114	101	88
13.30	21	71	1130	107	99,5	92
15.00	21	69	2327	124	109	94

Op 24 September zien wij een doorlopende stijging van het HCN-gehalte van het moment, dat het licht aangaat, tot 5 uur later. Deze aanpassing werd boven reeds door ons verwacht. Op 25 September krijgen wij het beeld van aanpassing, dat wij ook reeds in Tabel 28 te zien hebben gekregen, nl. een ochtendtop, die hier betrekkelijk klein is, een inzinking en een nieuwe stijging daarna. Op 26 September zien wij iets dergelijks; hier is

echter de ochtendtop forscher geworden, vooral in verhouding tot de opnieuw intredende stijging in den namiddag. Het is te betreuren, dat deze Tabel niet nog een vierden dag omvat, daar wij dan kans hadden de bevestiging te verkrijgen, dat gedurende deze drie dagen het verloop van het HCN-gehalte zich steeds meer begeeft in de richting van het door ons „normaal” geachte beeld. Dat hier belangrijke stijgingen van het HCN-niveau van dag tot dag hebben plaats gehad, zal men moeilijk kunnen ontkennen, wanneer men b.v. de waarden bij het aansteken der verlichting vergelijkt nl. 677, 1475 en 1634 0,001 mg HCN/g droge stof (in Grafiek 14 door een lijn met elkaar verbonden). Bezien wij het totaal gehalte



Grafiek 14, behorende bij tabel 32.

aan suikers, dan moeten wij bedenken, dat daarin ook zijn opgenomen de hoeveelheden suiker, welke in het glucoside gebonden zijn. Volgens de veronderstelde formule van dit glucoside moet dit 1 molecule glucose op 1 molecule HCN zijn; m.a.w. op 1 mg HCN komt 6,66 mg glucose voor.

De hoeveelheden glucose, die er overblijven wanneer men 1 en 2 mol glucose per mol HCN (zie ter verklaring van dit laatste hieronder) aftrekt, zijn opgenomen in de laatste kolom van de Tabel. Op 24 September zien wij het glucose-gehalte om 15 uur stijgen voor de kolom totaal suikers en bij aftrek van 1 mol glucose; bij aftrek van 2 mol glucose is de lijn echter betrekkelijk regelmatig en horizontaal. Gemiddeld is het gehalte aan totaal suikers op dezen dag lager dan op de beide volgende dagen. Ook hieruit blijkt, dat de plant zich eerst moest „bijvoeden”. Op 25 September vertoonen alle drie de lijnen eerst een daling, daarna een stijging om dan weer betrekkelijk scherp te dalen, dit laatste dus geheel in overeenstemming met het karakter van een niet normalen dag. En op 26 September geven de curve voor de totale suiker en die na aftrek van 1 mol glucose een stijging – daling – stijging te zien, terwijl hier evenals op 24 September

de lijn verkregen na aftrek van 2 mol glucose het meest gelijkmatig verloopt; deze vertoont een regelmatige — hoewel langzame — stijging. Terwijl wij dus voor 26 September aan de HCN-gehalte-curve meenden te mogen afleiden, dat wij het normale verloop begonnen te naderen maar nog niet hadden bereikt, vinden wij hier, dat de koolhydraten-curve reeds een normaal beeld vertoont in tegenstelling met de voorgaande dagen, toen ook dit nog niet het geval was.

Gezien het verloop van de drie glucose-curven naast elkaar — totale suiker, en na 1 en 2 mol glucose-aftrek — rijst bij ons de vraag of in het witte-klover-glucoside werkelijk slechts 1 mol glucose op 1 mol HCN voorkomt of dat dit 2 mol glucose moet zijn. In de Inleiding merkten wij reeds op, dat het witte-klover-glucoside nog niet afdoende geïsoleerd en geïdentificeerd is. Gezien Tabel 31 is het alternatief, dat er 3 mol glucose voorkomt op 1 mol HCN, uitgesloten. In dat geval zou nl. op 7 October 1940 om 15 uur niet voldoende in alcohol oplosbare suiker zijn gevonden (19 mg, terwijl er voor 3 mol glucose/mol HCN noodig is  $\pm$  24 mg glucose).

Het is begrijpelijk, dat wij voor ons zelf gezocht hebben naar een voorloopige verklaring voor de tot nu toe geconstateerde verschijnselen aan de HCN-gehalte-curve. Wij kunnen ons moeilijk losmaken van de gedachte, dat het glucoside een rol speelt bij het assimilatie-proces en wel in dezen zin, dat wanneer de concentratie aan enkelvoudige suikers in het plantensap niet voldoende is om zetmeel te vormen — waarbij wij aanstippen, dat, gezien de toe- en afnamen van de totale suiker-cijfers, de witte klover blijkbaar geen uitgesproken „zetmeel”plant is — het glucoside kan worden of wordt gevormd. Wanneer wij een stijging van het HCN-gehalte vinden betrekkelijk kort na zonsopgang, dan is deze te verklaren doordat de eerste assimilatie-producten in het glucoside worden vastgelegd of tijdelijk worden vastgelegd. Hierbij zal vermoedelijk een rol spelen, dat de opbouw van het glucoside een enzymatisch proces is, afhankelijk van de concentratie der componenten. Dus doordat de assimilatie begint neemt de concentratie van de suikers (plaatselijk) toe en daardoor kan het enzyme (eigenlijk: wordt het enzyme gedwongen) het glucoside opbouwen, waarbij wij voorloopig veronderstellen, dat de cyaan-component in constante concentratie aanwezig is (wat op zichzelf niet juist, maar ter vereenvoudiging noodzakelijk is). Wij willen echter niet zeggen, dat de vorming van het zetmeel via het glucoside verloopt. Veeleer lijkt het ons waarschijnlijk, dat de zetmeelvorming begint, wanneer de assimilatie krachtiger wordt, m.a.w. wanneer de concentratie der geproduceerde koolhydraten hoger wordt. Wij nemen dus daarbij aan, dat het enzyme, dat het glucoside opbouwt, bij een lagere koolhydraat-concentratie zijn synthetische werking kan beginnen dan het enzyme, dat voor de zetmeelvorming zorgt. Wanneer dan eenmaal de zetmeelvorming aan den gang is kan dit wederom de afbraak van het glucoside ten gevolge hebben, mede door de



werking van hetzelfde op het glucoside gespecialiseerde enzyme, daar thans de koolhydraat-concentratie in de oplossing te laag wordt door de regelmatig doorgaande onttrekking door de vorming van zetmeel. Wij zien dus na den ochtendtop, wanneer de zetmeelvorming begint, het glucosidegehalte dalen. Werkende met deze materie heeft zich langzamerhand deze gedachtengang bij ons gevormd, zonder dat wij hem afdoende kunnen bewijzen.

In Tabel 32 gaat de doorlopende HCN-gehalte stijging op 24 September gepaard met een praktisch gelijk blijven van het suikergehalte, er heeft geen zetmeelvorming plaats. Worden de assimilaten vastgelegd in het glucoside? Er behoeft echter niet alleen bij den opbouw van zetmeel een moment te komen waarbij de concentratie der koolhydraten zoodanig is, dat het glucoside gevormd kan worden, dit kan en moet ook geschieden wanneer het zetmeel voor transport wordt afgebroken in zijn meer eenvoudige componenten; ook dan zal de suiker-concentratie zoodanig kunnen zijn, dat het glucoside gevormd wordt. Een voorbeeld daarvan zou men kunnen zien op 25 September in Tabel 32: wanneer het glucose-gehalte in den namiddag begint te dalen, stijgt het HCN-gehalte abnormaal sterk; wij noemden beide curven abnormaal. Lang niet al onze gegevens laten zich thans opeens hiermede verklaren; dit was ook niet te verwachten. Zoo is reeds dadelijk 26 September uit Tabel 32 een veel moeilijker te interpreteren dag. Tevens houdt deze hypothese alleen rekening met het glucon. De stijging en daling van het HCN-niveau van dag tot dag, zooals b.v. in Tabel 32, valt er moeilijker mee te verklaren. Dit neemt niet weg, dat de hier geschetste gang van zaken wel mee een van de fundamenteele processen moet zijn bij de vorming van het glucoside. De meest doorslaggevende aanwijzing hiervoor was het volgende. Bij besprekingen werd terecht de opmerking gemaakt, dat indien onze gedachtengang juist is, er ook 's nachts een stijging van het HCN-niveau moet plaats vinden, daar dan afvoer van assimilaten zal plaats hebben en dus de omstandigheden gunstig moeten zijn voor de vorming van het glucoside. Daarmede zou dan de veronderstelde regelmatige daling van zonsondergang tot zonsopgang voor het glucoside komen te vervallen en daarmede de laatste parallelliteit van HCN-gehalte-curve en assimilatencurve. Tevens zou dan misschien de verklaring zijn gevonden voor het herhaaldelijk optredende verschijnsel, dat het HCN-gehalte bij zonsopgang hooger is dan den voorgaanden avond.

Het bleek ons nu bij enkele steekproeven, dat het HCN-gehalte werkelijk gedurende den nacht stijgt, om tegen het einde van den nacht weer te dalen. Dat het mogelijk was het gedrag van het HCN-gehalte, althans globaal, te voorspellen met behulp van de geponeerde hypothese, is voor ons het krachtigste argument voor haar juistheid in groote trekken.

Houdt met dit alles verband de door Narasimha Acharya (1933) beschreven werkwijze om vergiftige van niet-vergiftige Sorghum te onderscheiden, nl. door kleuring op zetmeel in den stengel? Houdt hiermede

verband, dat cyanophore planten, welke zich te weer stellen tegen droogte, meestal zeer vergiftig zijn?

Hoe dit alles ook zij, het ons ter beschikking staande instrumentarium was niet voldoende om nader op deze vragen in te gaan.

Alvorens echter onze „nachtcurven” te bespreken zullen wij eerst nog de reeds aangestipte bepalingen aan N.Z. witte klaver no 6-5-1 op 2 en 3 Februari 1941 beschouwen. Hierbij werd den tweeden dag een aanzienlijk zwakkere verlichting gegeven dan den eersten dag (slechts 4 van de 8 lampen van 100 W brandden tezamen met 2 neonlampen), met de bedoeling om na te gaan of een dergelijke doelbewuste verandering in belichting ons ook nieuwe gezichtspunten bood.

Wij verkregen de volgende resultaten (Tabel 33).

TABEL 33

datum en uur	temp. °C	relatieve lucht- vochtigheid %	0,001 mg HCN per g droge stof	mg glucose per g droge stof na extractie	mg glucose per g droge stof na aftrek van	
					1 mol glucose per mol HCN	2 mol glucose per mol HCN
1 Febr. 1941: 18.15 . .	licht uit					
2 Febr. 1941: 9.45 . .	licht aan					
10.15 . .	14	68	1704	182	171	160
11.45 . .	15,5	60	1559	185	175	164
12.45 . .	17	59	1444	187	177	168
13.45 . .	18	58	1877	199	186	174
15.00 . .	24	52	1795	208	196	184
15.45 . .	25	55	1870	202	189	177
18.15 . .	licht uit					
3 Febr. 1941: 9.45 . .	licht aan					
10.15 . .	9,5	78	1685	172	161	149
11.45 . .	15	62	1797	171	159	147
12.45 . .	16	60	1601	177	166	155
13.45 . .	17,5	58	2287	197	181	166
15.00 . .	22	58	2174	203	189	174
15.45 . .	22	55	1926	200	187	174

De bepalingen geschieden telkens aan 50 bladen. De duplo's klopten weer bevredigend. Als voorbeeld noemen wij nogmaals de afwijkingen in %; deze bedroegen resp. 18, 14, 1, 7, 8 en 18 % (gemiddeld 11 %) en 3, 8, 5, 6, 14 en 6 % (gemiddeld 7 %). De nauwkeurigheid is dus niet grooter dan bij de bepaling op 22 Augustus 1940 (Tabel 28; gemiddeld bedroeg toen de spreiding 8 %), ondanks het feit, dat thans 50 bladen werden gebruikt tegen toen 20. Vergeleken met dezelfde klaver (Tabel 32) levert het HCN-gehalte geen bijzonderheden op; dat het cijfer mg glucose per g droge stof (na extractie) veel hoger ligt (haast het dubbele) dan toen bij berekening op de droge stof (na destillatie), ligt aan het verschil van basis

waarop de berekening plaats had. In Tabel 33 werd het HCN-gehalte echter berekend op de droge stof na destillatie; men mag dus in deze tabel het HCN-gehalte en het glucose-gehalte in berekeningen niet op elkaar betrekken.

Het verloop van deze glucose-curven laat op 2 Februari een regelmatige stijging zien vanaf de eerste bepaling een half uur na het ontsteken van de verlichting, om bij de laatste bepaling te gaan dalen (6 uur na de ontsteking van de verlichting; de planten kregen een  $8\frac{1}{2}$ -uren-dag). Op 3 Februari zet deze stijging niet direct in, maar begint eerst 2 uur na het begin van de verlichting. De vraag rijst of dit te wijten is aan de minder sterke verlichting dan wel aan de veel lagere temperatuur gedurende dien tijd of een combinatie van beide. Terwijl op 3 Februari de glucose-curve om 15.45 uur begint te dalen, dus even laat als den vorigen dag, is dit bij aftrek van 2 mol glucose/mol HCN niet het geval. Beide dagen geven dus de glucose-curven een normaal beeld. Die op 3 Februari ligt gemiddeld iets lager dan op 2 Februari; dit wordt echter veroorzaakt door de waarden direct na het ontsteken der verlichting. Bij deze proefneming werd in alle gevallen nagegaan of er ook fructose voorkwam en wel door middel van de titratie volgens Kruisheer (1926). Het resultaat was negatief.

Ten aanzien van het verloop der HCN-gehalten is het moeilijk iets te zeggen. Het eenige, dat direct en overtuigend in het oog springt, is, dat de gehalten op 3 Februari — ondanks of dank zij de zwakkere verlichting? — hoger zijn dan op 2 Februari. Tevens valt het op, dat op beide dagen het HCN-gehalte zijn grooten sprong naar boven maakt tusschen 12.45 en 13.45 uur, dus tusschen 3 en 4 uur na het begin der verlichting, een tijdsduur, welke wij ook vroeger in normale gevallen op het vrije veld ongeveer vonden. Op 2 Februari mogen wij na deze stijging niet spreken van een daling; deze waarden liggen te dicht bij elkaar — het gehalte is, voor zoover bepaald, ongeveer gelijk gebleven. De daling, die van 10.15 — 12.45 uur plaats heeft, kunnen wij niet verklaren, ook al hebben wij iets dergelijks al wel eerder aangetroffen. Het is in dit verband te betreuren, dat wij geen temperatuur- en relatieve luchtvochtigheid-gegevens hebben van de voorgaande dagen; de planten waren voldoende aan de verlichting aangepast. Het verband tusschen HCN-curve en glucose-curve is hier niet duidelijk. Is er op 3 Februari na het ontsteken der verlichting eveneens een HCN-gehalte daling? Men krijgt den indruk, zonder dat de verschillen buitengewoon groot zijn. Na de stijging van 12.45–13.45 uur treedt dan wederom een daling in, volkomen in overeenstemming met wat wij als normaal vonden.

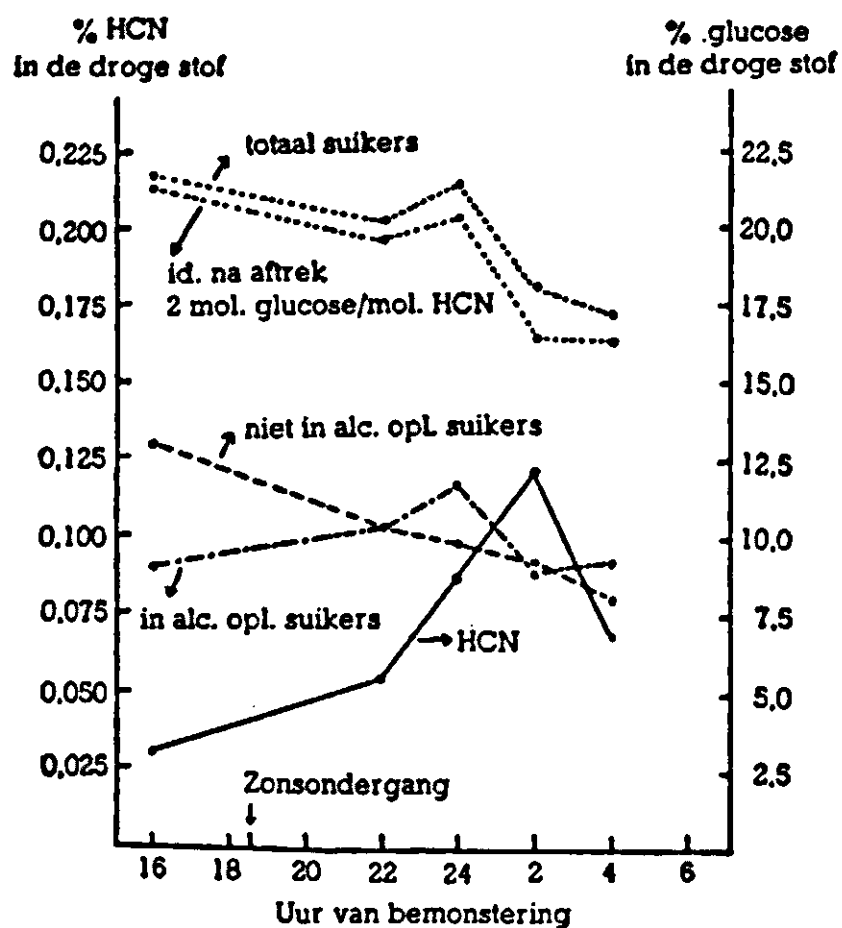
Veel nieuws leert deze proef ons niet. Wij kunnen alleen de conclusie trekken, dat de verzwakking der belichting geen in het oog springende wijzigingen in de HCN-gehalte-curve heeft gebracht — geen verlaten of vervroegen van den top b.v. — het zij dan, dat deze een verhooging van het gehalte heeft veroorzaakt. Het weinig constant zijn der temperatuur en

vooral ook de geringe relatieve luchtvochtigheid maken het moeilijk een conclusie te trekken.

Wij vonden in Hoofdstuk IV, dat in het algemeen een daling van de Iw niet zoo storend werkte op de HCN-gehalte-curve als een stijging van de Iw gedurende opeenvolgende dagen. Hier ligt misschien de reden, waarom op 3 Februari bij zwakkere belichting de HCN-gehalte-curve een normaal beeld gaat vertoonen.

Vatten wij samen hetgeen ons de proeven bij constante belichting hebben geleerd, dan moeten wij vooropstellen, dat de apparatuur niet toeliet om alle groeivoorwaarden constant te maken, zoodat, zooals uit het laatste voorbeeld duidelijk bleek, onze uitkomsten van zeer betrekkelijke waarde zijn.

Daarbij kwam, dat de planten zich onder de gegeven kunstmatige omstandigheden zeer vaak abnormaal gedroegen, hetgeen onder anderen viel af te leiden uit de koolhydraat-curven. Er kwam echter vast te staan, dat het maximum van de HCN-gehalte-curve, zooals wij dit, bij onze waarnemingen in het vrije veld, hadden geconstateerd enkele uren na zonsopgang, ook bij een constante belichting optreedt. Wij meenen daaruit te mogen afleiden, dat wanneer wij in Hoofdstuk IV de Iw of It bruikbaar hebben bevonden om bij regelmatig beloop van deze waarden ook een normale HCN-gehalte-curve te kunnen voorspellen, dit niet inhoudt, dat de HCN-gehalte-curve in direct verband staat tot de stralingsintensiteit; veeleer zullen wij de Iw moeten zien als een — betrekkelijk willekeurige — maatstaf om de gelijkmatigheid van de elkaar opvolgende dagen te kunnen beoordeelen. Veel sterker dan bij de veldwaarnemingen trad bij de proeven onder kunstmatige omstandigheden de stijging in den namiddag op den voorgrond. Er zijn geen directe aanwijzingen, dat de in Hoofdstuk IV



Grafiek 15, behoorende bij tabel 34.

uitgesproken veronderstelling — nl. dat een dergelijke tweede stijging een gevolg is van abnormale omstandigheden, zoo men liever wil: een gevolg van het verbreken van de regelmaat — onjuist is.

De eerste plant, welke gebruikt werd voor het bepalen van een nacht-curve, was N.Z. witte klaver no 6-5-6, die in een kist in de warme kas stond en daar reeds gedurende acht dagen een aanvullende belichting van één neonlamp had ontvangen, toen op 18 October 1940 de proef werd uitgevoerd.

Voor iedere bepaling werden 75 bladen gebruikt. In alcohol oplosbare en niet in alcohol oplosbare suikers werden bepaald. De uitkomsten zijn weergegeven in Tabel 34 en Grafiek 15.

TABEL 34

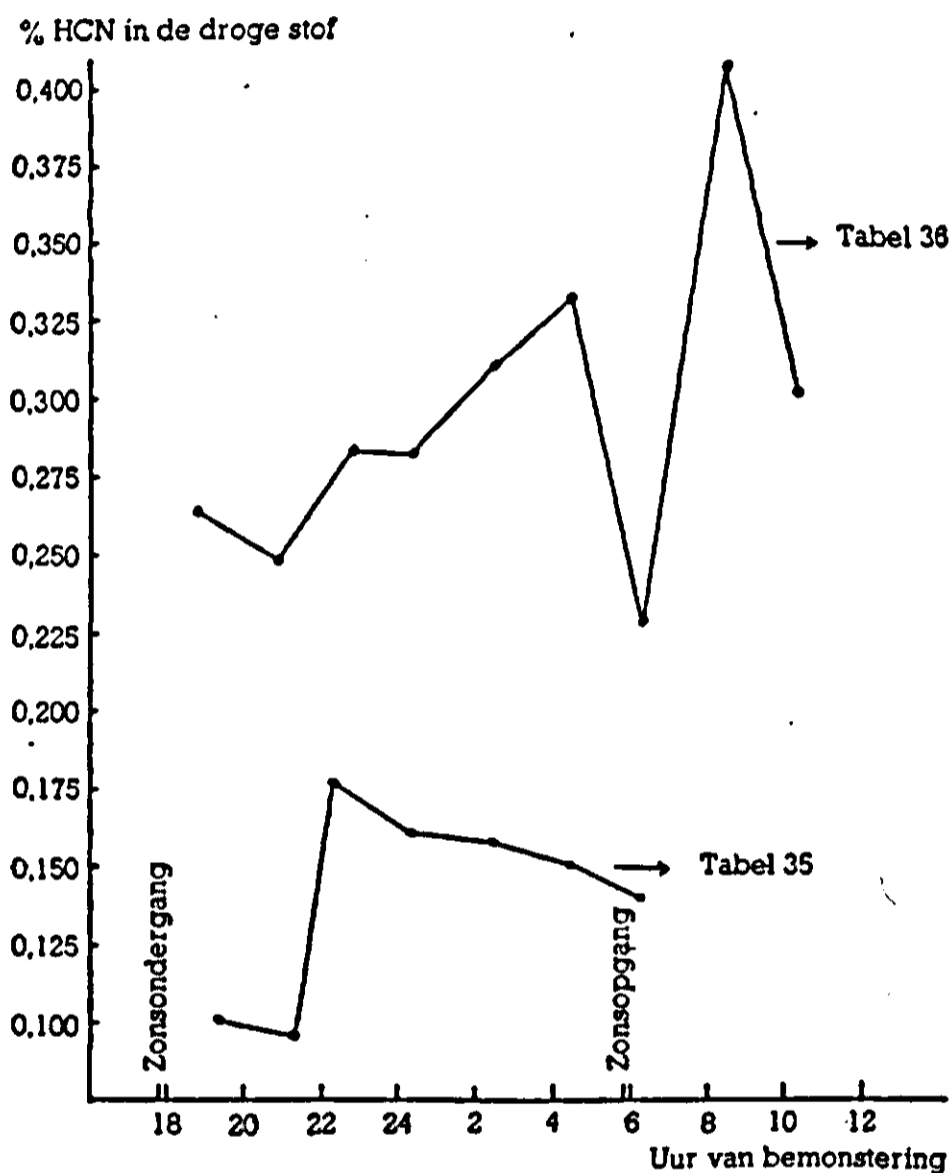
datum en uur	temp °C	relatieve luchtvochtigheid %	0,001 mg HCN/g droge stof	in alcohol opl. suikers in mg glucose/g droge stof	niet in alcohol opl. suikers in mg glucose/g droge stof
18 Oct. 1940:					
16.00 . . . . .	16	89	302	89	129
18.45 . . . . .	licht uit; zonsondergang				
22.00 . . . . .	18,5	95	532	101	102
24.00 . . . . .	18,5	90	864	116	98
19 Oct. 1940:					
2.00 . . . . .	18,5	90	1211	88	92
4.00 . . . . .	18	90	682	92	81

Gedurende de proef waren temperatuur en relatieve luchtvochtigheid constant. Zien wij naar de cijfers betreffende niet in alcohol oplosbare suikers dan heeft het den schijn of de sterkste daling plaats heeft tusschen 16 en 22 uur. Sommeeren wij echter in alcohol en niet in alcohol oplosbare suikers dan blijkt deze versnelde afvoer verdwenen (218, 203, 214, 180 en 172 mg glucose per g droge stof). Wij kunnen er ons dus toe bepalen te constateeren, dat de koolhydraten, zooals te verwachten was, afnamen. Het gehalte aan in alcohol oplosbare suikers stijgt gedurende den nacht om later weer te dalen. Het HCN-gehalte vertoont vanaf 16 uur eerst een langzame stijging (38 0,001 mg HCN/h), daarna een snelle stijging (166 en 173 0,001 mg HCN/h) om tenslotte zeer snel te dalen (264 0,001 mg HCN/h). Wij vinden hier dus een maximum om  $\pm$  2 uur. De groote vermindering aan koolhydraten valt samen met de sterke stijging van het HCN-gehalte. Bij aftrek van de aan het glucoside gebonden glucose komt dit nog sterker tot uitdrukking, nl. bij aftrek van 1 mol glucose/mol HCN vinden wij resp. 216, 200, 208, 172, 168 maar fraaiër nog bij aftrek van 2 mol glucose/mol HCN resp. 214, 196, 203, 164 en 163 mg glucose. Volgens deze cijfers valt dus de groote stijging in het HCN-gehalte volledig samen met den afvoer van de koolhydraten. De top der

in alcohol oplosbare suikers wordt dan één tijdstip eerder gevonden.

De bepaling werd als volgt uitgevoerd: de bladen werden gefixeerd in kokenden alcohol, waarna op de gebruikelijke wijze extractie, destillatie, inversie en titratie plaats hadden. Het bepaalde drooggewicht is datgene, wat na afloop van alle bewerkingen werd bepaald; dus koolhydraat-vrij. Desondanks blijven de HCN-gehalte-schommelingen bestaan, zoals wij reeds bij de bespreking van de bezwaren van Gouwentak (1929) opmerkten.

Wij beschouwen deze proef als voldoende om aan te toonen, dat het HCN-gehalte des nachts een top vertoont. Zij vond haar bevestiging en



Grafiek 16, behorende bij de tabellen 35 en 36.

gedeeltelijke nadere uitwerking in de twee volgende proeven, waarbij, in afwijking van de handelwijze gebruikelijk in dit Hoofdstuk, gebruik werd gemaakt van planten gegroeid in het vrije veld. Dit geschiedde om ook ten aanzien van de nachtcurve, voor zoover wij deze bepaalden, te beschikken over beide soorten gegevens, al is het dan op zeer beperkte schaal.

In den nacht van 27 op 28 September werden twee verschillende klaverklonen, afkomstig uit N.Z. klaver no 6 bemonsterd. Beide klonen lagen naast elkaar. Wij krijgen hier dus tevens de gelegenheid om het gedrag van twee klonen, die onder gelijke omstandigheden verkeerden, gedurende een zekeren tijdsduur met elkaar te vergelijken. Daartoe zijn de uitkomsten van deze beide waarnemingen te zamen opgenomen in Grafiek 16. Voor een bepaling werden steeds 30 g groene bladeren gebruikt. Op de

voor Hoofdstuk IV gebruikelijke wijze werden deze verder behandeld, om tenslotte te titreeren volgens Liebig-Denigès.

Van de eene klaver vinden wij de uitkomsten in Tabel 35.

TABEL 35

datum en uur	% HCN in de droge stof
27 September:	
17.50 zon onder	
18.50 schemering voorbij	
19.20 . . . . .	0,101
21.20 . . . . .	0,096
22.20 . . . . .	0,177
28 September:	
0.20 . . . . .	0,160
2.35 . . . . .	0,159
4.35 . . . . .	0,15
5.50 zon op	
6.20 . . . . .	0,139

Wij zien een betrekkelijk langen tijd na zonsondergang het HCN-gehalte practisch constant blijven om dan in één uur tijds sterk te stijgen, waarna het HCN-gehalte gedurende den verderen nacht tot een half uur na zonsopgang langzaam en regelmatig blijft dalen. Ook hier dus weer gedurende den nacht plotseling een sterke stijging ( $\pm 90\%$ ) van het HCN-gehalte. Deze stijging heeft plaats tusschen  $3\frac{1}{2}$  en  $4\frac{1}{2}$  uur na zonsondergang. In Tabel 34 gebeurde dat in de kas bij  $18^\circ\text{C}$ , tusschen 5 en 7 uur na zonsondergang en na dooving der extra-verlichting. Gedurende den nacht van 27 op 28 September bedroeg de minimum-temperatuur op 2 m  $9,9^\circ\text{C}$  en op 10 cm  $9,0^\circ\text{C}$ ; neerslag viel er niet.

Voor de andere witte klaver zijn de gegevens opgenomen in Tabel 36.

Wat wij te zien krijgen is een langzame stijging van af zonsondergang tot 4.35 uur, dit is gedurende  $\pm 10$  uur. Daarna volgt een snelle daling rond zonsopgang, waarna de gebruikelijke ochtendtop  $\pm 3$  uur na zonsopgang volgt. Ook hier dus gedurende den nacht een stijging en daling van het HCN-gehalte. Het verloop van deze curve lijkt meer op die in Tabel 34, al lag de laatste in totaal vroeger; de betrekkelijk langzame stijging in den voornacht en de plotselinge daling daarna hebben zij gemeen.

Verder zien wij, dat twee witte-klaver-individuen, staande onder gelijke omstandigheden, zich niet gelijk behoeven te gedragen, ook al blijft het principe — een maximum in de curve gedurende den nacht — gelijk; er hadden echter verschuivingen plaats.

Het verloop van de curve gedurende den nacht, zooals in het laatste ge-

val, past het beste in onze voorstelling van zaken. Gedurende den afvoer van de assimilaten is het enzyme doorlopend in staat glucoside te synthetiseeren; er komt echter een moment, dat dit transport gereed is, de suikerconcentraties dalen snel en het glucoside valt weer snel in elkaar. Heeft het einde van den afvoer plaats aan het einde van den nacht, dus vlak voor zonsopgang, dan zal men dus het geval krijgen van ons laatste voorbeeld: vlak voor zonsopgang een snelle daling van het HCN-gehalte, waarna na zonsopgang, bij de eerste assimilatie, wederom een snelle stijging volgt. Wordt de afvoer der assimilaten gestremd, dan krijgen wij ook wijzigingen in de HCN-gehalte-curve; zoo kan de afvoer der assimilaten doorgaan tot na zonsopgang, zooals wij een enkele keer hiervoor vonden.

TABEL 36

datum en uur	% HCN in de droge stof
27 September:	
17.50 zon onder	
18.50 schemering voorbij	0,264
20.50 . . . . .	0,249
22.50 . . . . .	0,284
28 September:	
0.20 . . . . .	0,283
2.35 . . . . .	0,312
4.35 . . . . .	0,333
5.50 zon op	
6.20 . . . . .	0,229
8.35 . . . . .	0,406
10.20 . . . . .	0,303

Onze gegevens zijn te gering om van het bovenstaande meer te kunnen zeggen dan dat het een veronderstelling is, welke nader zal dienen te worden onderzocht.

Samenvattend kunnen wij echter constateeren, dat het HCN-gehalte gedurende den nacht een stijging en een daling vertoont, hetgeen mede verklaart, dat men meerdere malen des morgens een hooger HCN-gehalte vindt dan den avond te voren (de sterke daling is dan vroegtijdig opgevangen door de nieuwe assimilatie na zonsopgang). Ook hier is weer van geen parallelliteit met de assimilaten-curven sprake.

Overzien wij nogmaals in het kort de resultaten van dit Hoofdstuk.

Met behulp van de in Hoofdstuk V uitgewerkte gewijzigde methode Schulek waren wij in staat van kleine hoeveelheden klaverblaadjes het HCN-gehalte te bepalen. Daardoor konden wij uitgaan van minder plantenmateriaal, dat gekweekt werd onder kunstmatige, te controleeren omstandigheden. De hiervoor beschikbare hulpmiddelen waren primitief.



Wij beperkten ons tot het constant maken der belichting. Daarbij bleek, dat ook dan een maximum in het HCN-gehalte wordt gevonden enkele uren na het ontsteken der verlichting.

Hieruit en uit een proef, waarbij den eenen dag de helft van de belichting van den anderen dag werd gegeven, meenden wij te mogen concludeeren, dat men niet mag meenen, dat er een eenvoudig direct verband bestaat tusschen het HCN-gehalte en de Iw, de stralingsintensiteit, die in Hoofdstuk IV een nuttige maat was gebleken voor de beoordeeling der dagen op hun geschiktheid om een normale HCN-curve te geven.

Naast het HCN-gehalte werden verschillende suikercijfers bepaald.

Het verloop van het HCN-gehalte gedurende den nacht bleek eveneens een maximum op te leveren, zoowel onder veldomstandigheden, als in de kas bij een practisch constante temperatuur en relatieve luchtvochtigheid.

Hiermede was tevens het eenige malen geconstateerde feit verklaard, dat des morgens een hooger HCN-gehalte werd gevonden dan den voorgaanden avond. Deze nachtcurve paste wonder wel in het schema van het ontstaan en verdwijnen van het glucoside, dat wij ons gevormd hadden.

Hierdoor wordt het aannemelijk, dat het glucoside een plaats heeft gedurende het stofwisselingsproces en daarmee is dan voorloopig antwoord gegeven op de vraag, welke wij reeds eerder opwierpen: welke redelijke beteekenis heeft de selectie van witte klaver volgens de methode Doak, wanneer het glucoside hetzij een afvalproduct of zoo maar een vergift is. Dit wat betreft hetgeen wij kunnen of meenen te mogen afleiden uit de schommelingen in het HCN-gehalte van uur tot uur. Ten aanzien van het gemiddelde HCN-niveau kunnen wij aan de hand van deze gegevens geen verklaring opstellen. Hetgeen in Hoofdstuk II over de rol van de stikstof-component is gezegd, zou daarbij nooit buiten beschouwing mogen blijven.

## SAMENVATTING EN SLOTBESCHOUWING

Witte klaver (*Trifolium repens* L.) is een belangrijke weideplant. Veel veredelingswerk is aan dit gewas nog niet verricht. De onderscheiding wilde en gecultiveerde witte klaver staat op betrekkelijk losse schroeven; de behandeling in de literatuur van de systematiek van witte klaver is onduidelijk.

Bij onderzoeken in Nieuw-Zeeland uitgevoerd, bleek het gehalte aan blauwzuur een goede maatstaf voor de hoedanigheid der witte-klaverplanten, met dien verstande, dat, naarmate het blauwzuurgehalte toeneemt, de witte klaver betere eigenschappen vertoont en vooral sterker wordt.

Het blauwzuur komt in de plant niet vrij maar gebonden voor, in den vorm van een nog niet geheel geïdentificeerd glucoside.

Planten uit een en het zelfde bestand afkomstig kunnen zeer uiteenlopende gehalten aan blauwzuur bezitten of acyanophoor zijn.

In verschillende gebieden van de wereld is de witte klaver, voor zoover onze kennis thans strekt, volledig acyanophoor; mogelijk dat er verband met het heerschende klimaat bestaat.

De oorspronkelijk bestaande opvatting, welke haar toepassing vond bij de contrôle van zaaizaad, dat wilde witte klaver cyanophoor is en gecultiveerde witte klaver acyanophoor, bleek niet houdbaar.

In Nieuw-Zeeland is men overgegaan tot het selecteeren en certificeeren van witte klaver volgens het gehalte aan blauwzuur.

Van schadelijkheid van cyanophore witte klaver voor het vee is niets gebleken. Tegen selectie tot het verkrijgen van planten met een hoog HCN-gehalte bestaat geen bezwaar; contrôle door goed opgezette voederproeven is echter noodig.

Rudorf ruimt aan de cyanophorie van witte klaver een plaats in bij de bespreking van dit gewas in de kort geleden verschenen op de klaverachtige voedergewassen betrekking hebbende afleveringen van het Handbuch der Pflanzenzüchtung van Roemer en Rudorf (1938). Na al wat wij in de Inleiding besproken hebben, behoeven wij op zijn opmerkingen niet meer in te gaan.

Selectie op HCN-gehalte wordt ook voor Nederland van belang, wanneer in Nederland cyanophore witte klaver kan groeien en wanneer inheemsche wilde witte klaver geheel of gedeeltelijk cyanophoor blijkt te zijn.

Klaverplanten, in Nederland gekweekt uit gecertificeerd Nieuw-Zeelandsch zaad van drie keuringsklassen, voldeden wat betreft het HCN-gehalte aan de eischen van de certificaat-klasse der gebruikte zaden,

behoudens schommelingen, welke ook in het land van herkomst bekend zijn.

,Klonen-materiaal van de Afdeling Landbouwplantenteelt der Landbouwhoogeschool, geteeld uit zaad, verkregen van planten, afkomstig uit onderscheiden streken van Nederland, bleek meer of minder cyanophoor te zijn. Van de 19 onderzochte klonen bevatten 6 voldoende blauwzuur voor het verwerven van een certificaat volgens Nieuw-Zeelandsche normen.

De habitus der genoemde in Nederland verbouwde Nieuw-Zeelandsche witte klavers gaf aanleiding tot beschouwingen over de stikstofvoeding dezer planten, mede in verband met het HCN-gehalte. Een microbiologisch arbeidsveld kon worden aangeduid, samenhangend met een mogelijke meerdere of mindere geschiktheid van de waardplant voor de symbiose met *Bacterium radicola*, waaruit meer of minder krachtige stikstofvoeding zou kunnen voortvloeien.

Doak heeft het onderzoek van het cyanophore karakter van witte klaver op een nieuwe basis gebracht, door het HCN-gehalte quantitatief te bepalen; tot op dat moment geschiedde het kwalitatief of semi-quantitatief, hoofdzakelijk met behulp van pikrinezuurpapier. Door deze laatste methode van werken kwam men tot het hoofdonderscheid cyanophoor en acyanophoor. De gradatie in de cyanophorie zal echter waarschijnlijk van meer belang blijken te zijn. Acyanophorie zou in dit verband veroorzaakt moeten worden door afwezigheid van het glucoside. Indien het glucoside een rol speelt in het stofwisselingsproces dan maakt dit voor cyanophore en acyanophore witte klaver twee verschillende stofwisselingen noodzakelijk. De vraag rijst of acyanophorie, veroorzaakt door de afwezigheid van het glucoside wel bestaat. Het genetische onderzoek van Williams verdient in dit verband de aandacht.

Het blauwzuur in de plant, gebonden in een of meer glucosiden, wordt uit de verbinding vrij gemaakt door hydrolyse, met behulp van het in de plant voorkomende enzyme. Het vrijgekomen blauwzuur wordt door destillatie in titreerbare oplossing verkregen en daarin, evenals bij de onderzoekingen in Nieuw-Zeeland, getitreerd volgens de methode Liebig-Denigès, dus in alcalisch milieu.

Bij de onderzoekingen in Nieuw-Zeeland kreeg men te kampen met verschillende onverwachte schommelingen in het HCN-gehalte. Men kwam hieraan tegemoet door het steeds mee bemonsteren van een standaardklaver.

Er werden eenige mogelijkheden, welke aan deze schommelingen ten grondslag kunnen liggen, besproken. Hiertoe behooren o.a. het berekenen van het gehalte op de groene massa in plaats van op de droge stof en de bepaling van het gehalte in bladen en stelen te zamen in plaats van in de blaadjes alleen. De fout die men maakt is echter niet zoo groot, dat men bij selectie-werk, althans bij de eerste grove selectie, niet gebruik kan

maken van de minder fijne wijze van werken, waarbij men aanzienlijk minder arbeid hoeft te verrichten, om zodoende aan den eisch bij selectie te kunnen voldoen, dat men veel bepalingen in een kort tijdsbestek kan verrichten. Voor plantenphysiologisch onderzoek is het echter niet toelaatbaar. Gezien van uit dezen laatsten hoek kan men ook bezwaren inbrengen tegen het werken met gehaltecijfers; deze bezwaren konden worden ontzenuwd.

Voortgaande met de vraag, welke factoren schommelingen in het HCN-gehalte teweeg kunnen brengen, stuiten wij in de literatuur — geneeskrachtige gewassen — op enkele gegevens, dat het glucoside-gehalte van verschillende plantenspecies zich gedurende den dag periodiek kan wijzigen. Daarbij zou, wanneer wij de algemeene lijnen er uit lichten, het glucoside of gedurende den dag regelmatig toenemen (waarbij dan meestal tegelijkertijd aan een volledige parallelliteit met of binding aan de assimilaten-curve wordt gedacht) of een maximum vertoonen rond het middaguur. De meest complete onderzoekingen hierover zijn afkomstig uit 's Lands Plantentuin te Buitenzorg (Treub). Onderzoekingen aan witte klaver, welke op het vrije veld stond, zoowel bij witte-klaver-stammen als -klonen, in verschillende jaren, zoowel bij Nederlandsche als Nieuw-Zeelandsche witte klaver, toonden aan, dat het HCN-gehalte bij witte klaver kort na zonsopgang betrekkelijk sterk begint te stijgen om binnen een betrekkelijk gering aantal uren (b.v. 4) een maximum te bereiken, waarna dus weer daling van het gehalte gedurende den verderen dag intreedt. Deze periodieke schommeling gedurende den dag vindt men alleen dan wanneer de dagen met groote gelijkmatigheid op elkaar volgen, wat betreft hun weersgesteldheid, daar anders deze periodieke gang gedurende den dag verstoord wordt door de zich voltrekkende wijzigingen in het HCN-niveau van dag tot dag (meteorologische schommeling).

Als zeer bruikbare maatstaf voor de gelijkmatigheid der dagen werd gevonden de zgn. Iw-waarde, zooals deze gemeten wordt op het Natuurkundige Laboratorium der Landbouwhoogeschool. Is de gelijkmatigheid der opeenvolgende dagen verstoord, dan kan men zeer groote variaties vinden op het boven aangegeven type voor de HCN-gehalte-curve van witte klaver. Een der meest voorkomende afwijkingen is een tweede stijging, na het middaguur, welke middagtop onder veldomstandigheden bij onze waarnemingen steeds betrekkelijk klein bleef. Van eenig verband met de assimilatencurve is geen sprake meer.

Gezien de groote verschillen, welke op één dag in het HCN-gehalte kunnen optreden — wij vonden wijzigingen van 100% en meer — moet men bij het selectiewerk hiervan de gevolgen ondervinden. Het steeds mede bepalen van een standaard-perceel is hier practisch geen oplossing meer, daar men dan steeds van dit standaard-perceel de volledige dagcurve zou moeten bepalen. Voorloopig zal men bij selectie over dit bezwaar heen kunnen stappen, daar de enkele goede exemplaren, die men hierdoor

verloren laat gaan, niet opwegen tegen de veel grootere hoeveelheid arbeid, die men zou moeten verrichten, wanneer men deze fout wenschte te voorkomen. Heel anders ligt de vraag, wanneer men b.v. van Overheidswege de witte klaver op HCN-gehalte gaat keuren en certificeeren; dan zal men de kans op een dergelijke fout niet mogen lopen.

Er school in deze periodieke schommelingen gedurende den dag een mogelijkheid om iets meer te weten te komen omtrent de beteekenis van het glucoside in de plant. Deze vraag is direct van belang, daar dan misschien een grond kan worden aangewezen voor de correlatie, welke in Nieuw-Zeeland is gevonden tusschen HCN-gehalte en kwaliteit van het witte-klaver-gewas.

Daartoe zal men eerst beter onderricht moeten zijn omtrent de bepalende factoren van het HCN-gehalte. Het is niet waarschijnlijk, gezien de ervaringen bij andere onderzoekingen, dat men hierbij met onderzoekingen aan in het vrije veld groeiende planten veel verder komt. De eenige oplossing is het brengen van de planten onder te controleeren omstandigheden. Dit heeft echter een consequentie n.l. dat men meestal over veel minder onderzoekingsmateriaal gaat beschikken dan bij de onderzoekingen op het vrije veld.

Wilden wij dezen weg inslaan dan bracht dit met zich mede, dat wij eerst moesten beschikken over een HCN-bepaling, welke gevoeliger is dan die van Liebig-Denigès. Voor selectie-doeleinden zou een dergelijke methode ook te prefereeren zijn.

De keuze viel op de methode Schulek — een bromometrische methode —, die echter in den in de literatuur beschreven vorm niet bruikbaar bleek.

In het destillaat van klaverbladen komt bij neutrale of zure reactie het blauwzuur (gedeeltelijk) alsnog gebonden voor (dus op soortgelijke wijze als b.v. bij Laurierkerswater, maar in veel geringer mate); uit deze verbinding komt het vrij bij alcalische reactie, wanneer het HCN oogenblikkelijk wordt weggenomen; het is dan dus titreerbaar.

De origineele methode Schulek wordt toegepast bij zure reactie. Het gelukte de voorwaarden te vinden voor de bruikbaarheid van deze methode bij een nauwkeurig bepaalde alcaliteit.

Met behulp van deze methode werd een begin gemaakt met de bepalingen aan planten onder gecontroleerde omstandigheden. Het daarvoor ter beschikking staande instrumentarium was gebrekkig. Wij beperkten ons tot het constant houden der verlichting, terwijl het meestal gelukte temperatuur en luchtvochtigheid binnen bepaalde perken te houden.

Bij deze constante belichting werd hetzelfde verloop van de HCN-gehalte-curve bij witte klaver gevonden. Bij deze proeven trad de tweede stijging veel meer op den voorgrond, echter meestal, zooals kon worden aangetoond, bij abnormale omstandigheden, als er van gelijkmatigheid van de opeenvolgende dagen geen sprake meer was.

Een proef, waarbij gedurende den eersten dag een sterkere belichting

werd gegeven dan den tweeden dag, leverde geen directe reactie op deze lichtvermindering op, tenzij tengevolge hiervan het HCN-niveau den tweeden dag iets hooger lag.

Het staat door deze bepalingen wel vast, dat de rol van de Iw-waarde uitsluitend gezien moet worden als maatstaf voor de gelijkmatigheid van de elkaar opvolgende dagen.

Andere factoren dan de verlichting zijn van grooten invloed op het verloop van de HCN-gehalte-curve.

Bij deze bepalingen aan kleine hoeveelheden materiaal werd aandacht besteed aan de methodiek van dit onderzoek. Berekening van het HCN-gehalte op het bladoppervlak bleek, gezien de verbetering verkregen in de overeenstemming van duplobepalingen, te omslachtig. Verdeeling van de blaadjes van een klaverblad over de verschillende herhalingen, bleek evenmin verbetering in het overeenstemmen der duplobepalingen te brengen. De blaadjes van één blad zijn geen vergelijkbare eenheden. Iets dergelijks werd reeds lang bij andere planten voor b.v. zetmeel vastgesteld. Voor het zetmeel in witte klaver gold hetzelfde.

Van geval tot geval dient te worden nagegaan, wat de kleinste hoeveelheid te onderzoeken materiaal is, waarbij nog voldoende overeenstemmende uitkomsten worden verkregen. Dit is natuurlijk o.a. sterk afhankelijk van het HCN-gehalte van de betreffende klaverplant. Ter gedachtenbepaling werd aangegeven, dat men minstens van vijftig bladen dient uit te gaan. Dit getal is ook uit statistisch oogpunt verantwoord.

Enkele bepalingen werden verricht om na te gaan hoe het HCN-gehalte verloopt gedurende den nacht. Ook hier moet een stijging en daling, dus een maximum, worden aangenomen. Hiermede valt dan te verklaren het eenige malen geconstateerde verschijnsel, dat het HCN-gehalte bij zonsopgang hooger is dan den voorgaanden avond. Van parallelliteit met de assimilaten-curve kan nu in totaal geen sprake meer zijn.

Schetsmatig werd getracht een voorloopige aanduiding te geven, hoe het verloop van de HCN-gehalte-curven gedurende dag en nacht verklaard kan worden. In het kort komt het hierop neer, dat aan vorming van het glucoside wordt gedacht, dan, wanneer er voldoende enkelvoudige suikers in oplossing zijn; dit is bij het begin van de assimilatie en bij de afbraak van de assimilaten voor transport. Om hierover nader inzicht te verkrijgen werden aan verschillende proeven suikerbepalingen gekoppeld. Dit onderzoek zal, nu men den weg weet, met andere methoden met meer succes kunnen worden aangepakt.

De belangrijkheid van den Nieuw-Zeelandschen selectie-factor komt hierdoor steeds meer naar voren.

De vraag rijst of de door ons gevonden HCN-gehalte-curve ook van toepassing is op andere cyanophore of glucoside-houdende planten, b.v. geneeskruiden.

Wij achten dit in groote trekken wel aannemelijk. Voor het oogsten van

geneeskrachtige gewassen zou het van groot belang kunnen blijken te zijn.

De hier gegeven theoretische onderzoeken zullen slechts met succes kunnen worden voortgezet, wanneer naast het glucon het aglucon van het glucoside in het onderzoek wordt betrokken. In Hoofdstuk II gaven wij over het aglucon beschouwingen.

Voor de veredelingspraktijk achten wij de conclusie gerechtvaardigd, dat thans voldoende vingerwijzingen bijeen zijn gebracht, om in Nederland de veredeling van witte klaver op de basis van het HCN-gehalte te beginnen.

## LITERATUUR

- Adams, F. M. J., *Ann. Appl. Biol.* 13, 1926, 339.
- Armstrong, H. E., Armstrong, E. F. en Horton, E., *Proc. Roy. Soc. London B* 86, 1913, 262.
- Ascherson, P. en Graebner, P., *Synopsis der Mitteleuropäischen Flora VI*, 2, 1906-1910.
- Askew, H. O., *N.Z.J. Sci. Techn.* 15, 1934, 227.
- Barnebey, O. L., *J. Amer. Chem. Soc.* 36, 1914, 1092.
- Bartholomew, E. T. en Raby, E. C., *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 7, 1935, 68.
- Becker-Dillingen, J., *Handbuch des Gesamten Pflanzenbaues III, Hülsenfruchterbau und Futterbau*, 1929.
- Boonstra, A. E. H. R., *Planta* 10, 1930, 108.
- , *Landbouwkundig Tijdschrift* 50, 1938, 893.
- Boyd, F. T., Aamodt, O. S., Bohstedt, G. en Truog, E., *J. Amer. Soc. Agron.* 30, 1938, 569.
- Braak, C., *Meded. Verh. Kon. Ned. Meteor. Inst.*, no 33, 34a en b, z.j. en 40, 1937.
- Bruinsma, J. R., *Med. Inst. Suikerbietenteelt* 8, 1938, 63.
- Bunyea, H., *J. Amer. Vet. Med. Ass.* 86, 1935, 656.
- Burton, J. C. en Wilson, P. W., *Soil Sci.* 47, 1939, 293.
- Claridge, J. H., *N.Z.J. Agric.* 55, 1937, 329.
- Coleman, O. H. en Gardner, R., *Soil Sci.* 47, 1939, 409.
- Commission internationale des Réactions et Réactifs analytiques nouveaux de l' „Union internationale de Chimie”, Premier Rapport de la. Tableaux des Réactifs pour l'Analyse minérale, 1938.
- Czapek, F., *Biochemie der Pflanzen*, 2de druk.
- Dafert, O., *Angew. Botanik* 3, 1921, 23.
- Davies, Wm. en Levy E. Bruce, *N.Z.J. Agric.* 42, 1931, 75 en 151.
- Doak, B. W., *N.Z.J. Sci. Techn.* 14, 1932/1933, 359.
- , *Herbage Publ. Series Bul.* 11, 1933, 43.
- , *N.Z.J. Agric.* 51, 1935, 159.
- , *N.Z.J. Sci. Techn.* 20, 1938, 163 A.
- Erith, A. G., *White Clover. A monograph*, 1924.
- Feigl, F., *Qualitative Analyse mit Hilfe von Tüpfelreaktionen*, 3de druk, 1938.
- Findlay, Wm. M. en Dower, G., *Scot. J. Agric.* 10, 1927, 219.
- Finnemore, H. en Cooper, J. M., *J. Soc. Chem. Ind.* 57, 1938, 162.
- Finnemore, H. en Large, D. K., *Proc. Roy. Soc. New South Wales* 70, 1936, 445.
- Foy, N. R. en Hyde, E. O. C., *N.Z.J. Agric.* 55, 1937, 219.
- Franck, W. J., *De Veldbode*, 1926.
- , *Waardebepalende eigenschappen van zaaizaad en haar beoordeeling*, 1940.
- Frankena, H. J., *Landbouwkundig Tijdschrift* 52, 1940, 174.
- Fred, E. B., Baldwin, I. L. en McCoy, E., *Root nodule bacteria and leguminous plants*, 1932.
- Gentner, G., *Mitt. Int. Ver. Samenkontrolle* 7, 1935, 154.
- Gortner, R. A., *Outlines of Biochemistry*, 2de druk, 1938.



- Gouwentak, C. A., Proefschrift 1929, Amsterdam. Rec. Trav. bot. néerl. 26, 1929, 19.
- Graaff, W. C. de, Schoorl, N. en Wielen, P. van der, Commentaar op de Nederlandsche Pharmacopee Ed. V, Deel II.
- Graaff, W.C. de, Staatscommissie onder voorzitterschap van, Meded. Tuinbouwvoorlichtingsdienst 4, 1938.
- Greene, R. A. en Breazeale, E. L., J. Ass. Off. Agric. Chem. 20, 1937, 444.
- Hecht, W., Heil- u. Gewürzpfl. 14, 1931-1932, 15.
- Hegi, G. Illustrierte Flora von Mittel Europa IV, 3, 1906-1931.
- Heinicke, A. J. en Childers, N. F., Cornell Univ. Agric. Exp. Sta. Memoir 201, 1937.
- Karsten, P., Proefschrift 1934, Groningen.
- Karstens, W. K. H., Proefschrift 1938, Leiden.
- Kerstan, G., Planta 21, 1934, 677.
- Kidson, E., Climatology of New Zealand, 1932. In Köppen, Handbuch der Klimatologie.
- , Climate. N.Z. Off. Yearbook, 1939.
- Klaassen, J. A., Proefschrift 1931, Leiden.
- Klein, G., Handbuch der Pflanzenanalyse, 1932.
- Kobel, F., Lehrbuch des Obstbaus, 1931.
- Köppen, W., Handbuch der Klimatologie.
- Kolthoff, I. M., Pharm. Weekblad 54, 1917, 1157.
- , Die Massanalyse II, 1928.
- Kostytschew, S., Bazyrina en Tschesnokov, W., Planta 5, 1928, 696.
- Kostytschew, S. en Berg, V., Planta 11, 1930, 144.
- Kruisheer, C. I., Chem. Weekblad 1926, 430.
- Leemann, A. C., Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind. 5, 1935, 97.
- Levy, E. Bruce, Foreword (tot Doak, 1932/1933).
- Levy, E. Bruce en Gorman, L.W., N.Z.J. Agric. 46, 1933, 78.
- Mach, F. en Herrmann, R., Landw. Versuchsstationen 119, 1934, 70.
- Marais, J. S. C. en Rimington, C., Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind. 3, 1934, 111.
- Mirande, M., Compt. rend. 155, 1912, 651.
- Mostovoj, K., Sbor. Č. Akad. Zemědělské 12, 1937, 619. Ref. Mitt. Int. Ver. Samenkontrolle, 10, 1938, 649.
- Muszyński, J., Heil- u. Gewürzpfl. 17, 1936/1937, 28.
- Narasimha Acharya, C., Indian J. Agric. Sci. 3, 1933, 851.
- Pethybridge, G. H., Econ. Proc. Roy. Dublin Soc. II, 1910/1935, 248 (1918).
- Ravenna, C., en Peli, A., Gazz. Chim. Ital. 37, 1907, 586.
- Rigg, T., Askew, H. O. en Kidson, F. B., N.Z.J. Sci. Techn. 15, 1934, 222.
- Rijn, J. J. L. van, Die Glykoside, 2de druk, 1931.
- Robinson, D. H., Leguminous Forage plants, 1937.
- Robinson, M. E., Biol. Reviews, 5, 1930, 126.
- Rodengate Marissen, J. Z. ten, Bijzondere Plantenteelt II, 2de druk, 1920.
- Roemer, Th. en Rudolf, W., Handbuch der Pflanzenzüchtung, 1938-.
- Rogers, C. F. en Frykolm, O. C., J. Agric. Res. 55, 1937, 533.
- Rosenthaler, L., Blausäureglucoside, 1932. In Klein, Handbuch der Pflanzenanalyse.
- Sampson Kathleen, Welsh Plant Breeding Sta. Bull. Serie H, no 1, 1919/1920.
- Schoorl, N., Organische analyse III, 1941, 3de druk.
- Schubel, E. C. W., J. Amer. Vet. Med. Ass. 95, 1939, 371.
- Schulek, E., Zeitschr. f. anal. Chemie 62, 1923, 337.
- Seiler, K., Proefschrift, 1922, Bern.

- Smith, G., J. Ass. Off. Agric. Chem. 17, 1934, 182.  
Stapledon, R. G., J. Minist. Agric. 34, 1927/1928, 239.  
Stekelenburg, N. J., Proefschrift, 1931, Amsterdam; Rec. Trav. Bot. néerl. 28, 1931, 297.  
Sullivan, J. T., J. Ass. Off. Agric. Chem. 22, 1939, 781.  
Treib, M., Annal. Jard. Bot. Buitenzorg 19, 1904, 86.  
———, Annal. Jard. Bot. Buitenzorg 21, 1907, 79.  
———, Annal. Jard. Bot. Buitenzorg 23, 1910, 85.  
Uven, M. J. van, Mathematical treatment of the results of agricultural and other experiments, 1935.  
Ware, W. M., J. Agric. Sci. 15, 1925, 47.  
Weevers, Th., Proefschrift, 1902*a*, Amsterdam.  
———, Pharm. Weekblad, 39, 1902*b*, 957.  
Wehmer, C., Die Pflanzenstoffe, 1929–1931.  
Willaman, J. J. en West, R. M., J. Agric. Res. 6, 1916, 261.  
Williams, R. D., J. Genet. 38, 1939, 357.  
Wilson, P. W., Burton, J. C. en Bond, V. S., J. Agric. Res. 55, 1937, 619.  
Wirth, P. H., Proefschrift, 1911, Utrecht.  
Wolff, H., Landw. Versuchsstationen 124, 1936, 153.  
Yap, G. G., Philipp. Agric. 8, 1920, 269.  
Zade, A., Pflanzenbaulehre für Landwirte, 1933.  
Zuidhof, G. en Vries, D. A. de, Meded. Landb. Hoogeschool 44, 1940.

## INHOUD

Inleiding . . . . .	1
---------------------	---

### HOOFDSTUK I

Gevolgdde werkwijze ter bepaling van het blauwzuur in het planten- materiaal . . . . .	16
---	----

### HOOFDSTUK II

Beschrijving van enkele in Nederland uitgezaaide Nieuw-Zeelandsche witte klavers en daaruit volgende beschouwingen . . . . .	22
---	----

### HOOFDSTUK III

Het blauwzuurgehalte van Nieuw-Zeelandsche en Nederlandsche witte klavers. Voorzorgen bij de bepaling daarvan in acht te nemen	41
---	----

### HOOFDSTUK IV

Periodieke schommelingen gedurende den dag van het blauwzuur- gehalte van onder natuurlijke omstandigheden gegroeide witte klavers . . . . .	55
--	----

### HOOFDSTUK V

Bepaling van kleine hoeveelheden blauwzuur in plantendestillaten .	79
--	----

### HOOFDSTUK VI

Periodieke schommelingen gedurende den dag en den nacht van het blauwzuurgehalte van onder kunstmatige of natuurlijke omstan- digheden gegroeide witte klavers . . . . .	102
--	-----

Samenvatting en slotbeschouwing . . . . .	126
---	-----

Literatuur . . . . .	132
----------------------	-----

## STELLINGEN

### I

Het aanwenden van de HCN-proef ter onderscheiding van wilde witte klaver en gecultiveerde witte klaver is niet toelaatbaar.

### II

De grondtemperatuur oefent sterken invloed uit op de vorming van den halmheffer bij tarwe.

### III

De gewoonte van het Instituut voor Suikerbietenteelt om bij het nemen van rassenproeven met suikerbieten den naam en de herkomst van de beproefde rassen niet te publiceeren, is niet in het belang van den landbouw.

### IV

De diepteligging van de uitstoelingszône bij tarwe is een van de specifieke factoren, welke de winterhardheid van dit gewas bepalen.

### V

*Phaseolus vulgaris* is bij uitstek geschikt voor een onderzoek naar het hardingsproces en daarmee voor een onderzoek naar de grondslagen van de kouderesistentie.

Wartenberg, *Planta* 7, 1929, 347.

### VI

De zetmeelbepaling volgens Paloheimo, hoewel aandacht verdienend om haar specificiteit, is te zeer onderhevig aan storende omstandigheden om voor algemeene toepassing, met name als routine-bepaling, in aanmerking te komen.

Paloheimo, *Biochemische Zeitschrift* 222, 1930 en 238, 1931, 391 en 401.

### VII

De door Finnemore en Cooper aangenomen identiteit van het in witte klaver aanwezige cyaan-glucoside en het door hen ontdekte lotaustraline, kan, zonder nader bewijs, niet worden aanvaard, gezien sommige eigenschappen van het eerst bedoelde glucoside.

Finnemore en Cooper, *J. Soc. Chem. Ind.* 57, 1938, 162.

## VIII

Het onderzoek van Schachtschabel kan voor het uitbrengen van bemestingsadviezen nieuwe perspectieven openen.

Schachtschabel, Kol. Chem. Beihefte 51, 1940, 199.

## IX

Het geven van bemestingsadviezen aan de hand van grondanalysen, vervaardigd door het Bedrijfslaboratorium voor Grondonderzoek te Groningen, moet voor het eiland Noord-Beveland, tengevolge van de aldaar voorkomende sterk uiteenlopende en van het normale afwijkende (vooral grofzandige) gronden, onder het grootste voorbehoud geschieden.

## X

Het onderwijs in de bodemkunde bij het Middelbare Landbouwonderwijs dient met den huidige stand dier wetenschap in overeenstemming te worden gebracht.

## XI

Het voorkomen van enkele nagenoeg ontkalkte gronden in de twee oudste polders van Noord-Beveland, kan het beste worden verklaard door aan te nemen, dat deze plaatsen bij de overstrooming van het geheele eiland in de zestiende eeuw, vrijwel onveranderd zijn gebleven.

## XII

Ter bestrijding van de virusziekten bij stamboonen dient het Reglement op de veldkeuringen van de keuringsdiensten te worden verscherpt.

## XIII

Plantenziektenkunde behoort onder de verplichte vakken voor het candidaatsexamen Nederlandsche Landbouw, richting Plantenteelt, te worden opgenomen.

## XIV

Qualiteitsveredeling is veelal een analytisch-chemisch probleem.