

Il numero delle molecole di bleu di metilene ridotte dopo la somministrazione delle dosi furono le seguenti:

Tabella I

Dose in r	Molecole ridotte/cm ³	Quoziente ionico M/N per paio di ioni
1 200	2,44 · 10 ¹⁴	0,126
3 600	1,38 · 10 ¹⁵	0,238
6 000	2,105 · 10 ¹⁵	0,219
8 300	2,44 · 10 ¹⁵	0,182
10 000	3,09 · 10 ¹⁵	0,192

Poiché si accetta generalmente che 1000 r producono $1,61 \cdot 10^{15}$ paia di ioni per cm³ d'acqua abbiamo dunque potuto calcolare il quoziente ionico (ionic yield). L'irradiazione di una soluzione questa volta alcoolica di bleu di metilene con 10 000 r nelle condizioni sopra descritte non ha esercitato alcuna azione riducente. Abbiamo poi studiato se alcune sostanze aggiunte alle soluzioni acquose potessero determinare un'azione protettiva, come dalle esperienze di FORSSBERG¹ sulla catalasi, concludenti che tale azione è esercitata da sostanze non sature (p. es. acido fumarico e maleico) che reagiscono con i prodotti dell'acqua attivata. Tutte le soluzioni furono irradiate con 10 000 r: non abbiamo potuto studiare l'influenza dell'aggiunta di cisteina perché questa sostanza di per sé è altamente riduttrice del bleu di metilene: i risultati per le sostanze da noi studiate furono i seguenti:

Tabella II

Sostanza	Concentrazione (mM)	Molecole ridotte · 10 ¹⁸	Quoziente ionico M/N per paio di ioni
NaCl isotonico . .	1,45	2,44	0,1515
Acido malonico . .	0,1	1,54	0,0960
Cistina	0,1	0,975	0,0605
Acido succinico . .	0,1	0,81	0,0505
NaCl ipertonico . .	14,5	0,65	0,0404
NaCl ipotonico . .	0,145	0,568	0,0353
Gelatina 1% . . .	—	0,1625	0,011
Acido fumarico . .	0,1	0,0	0,0

Si può osservare che se l'acido fumarico svolge una azione perfettamente protettiva sulla riduzione del bleu di metilene, tale azione, se pure in grado minore effettuano altresì sostanze sature come l'acido malonico e succinico: perciò il meccanismo di protezione dall'acqua attivata prospettato dal FORSSBERG² non può essere trasferito alla reazione radio-chimica da noi studiata.

E. GALlico e B. CAMERINO

Istituto nazionale per lo studio e la cura dei tumori e Laboratori ricerche Farmitalia, Milano, il 23 dicembre 1947.

Zusammenfassung

Die Verfasser beweisen, daß Röntgenstrahlen eine wässrige, nicht aber eine alkoholische Methylenblaulösung reduzieren. Das spricht für die Theorie der indirekten Wirkung der ionisierenden Strahlung. Als ioni-

¹ A. FORSSBERG, Acta Radiol. 27, 281 (1946); Nature 159, 308 (1947).
² A. FORSSBERG, Acta Radiol. 27, 281 (1946); Nature 159, 308 (1947).

sche Ausbeute dieser Versuche wurde etwa 0,2 gefunden. Verschiedene Substanzen (und zwar gesättigte und ungesättigte Verbindungen) schützen in verschiedenem Ausmaß das Methylenblau vor der Wirkung des aktivierten Wassers.

Zur Biogenese des Lignins

(Über das Lignin etiolierter Kartoffelkeimlinge)

Während die Verholzung keimender Pflanzen von botanischer Seite schon mehrfach bearbeitet wurde, liegen darüber noch kaum irgendwelche chemische Befunde vor. Wir haben nun untersucht, ob in der etiolierten, d. h. der im Dunklen unter Ausschluß der Photosynthese keimenden Kartoffelpflanze eine Verholzung sowohl chemisch als auch botanisch nachzuweisen ist.

P. KLASON¹ berichtet, daß sich etiolierte Kartoffelkeimlinge botanisch nicht anfärben lassen, aber einen nach Behandlung mit Schwefelsäure unlöslichen, ligninartigen Körper ergeben. Dieser enthält im Gegensatz zum normalen Lignin entweder gar kein oder nur sehr wenig Methoxyl. Daraus schließt er, daß für die Bildung von Methoxylgruppen der bei der Photosynthese entstehende Formaldehyd verantwortlich sei. Eine Nachprüfung dieser Angaben erschien wünschenswert, da man auf diese Art einen guten Einblick in die synthetischen Fähigkeiten der Pflanzenzelle unter Ausschluß des laufenden photosynthetischen Assimilationsvorganges gewinnen kann. Über die Bildung verschiedener anderer Pflanzenstoffe in Etiolements liegen schon einige Untersuchungen vor².

Die wasserleitenden Elemente konnten wir, wie in den nachfolgenden Schnitten gezeigt wird, durch die gebräuchlichen Ligninreagenzien (Phloroglucin-Salzsäure, Anilinsulfat, Reaktion von MÄULE) eindeutig anfärben. Abb. 1 stellt einen Querschnitt und Abb. 2 einen Längsschnitt bei etwa 80facher Vergrößerung dar.

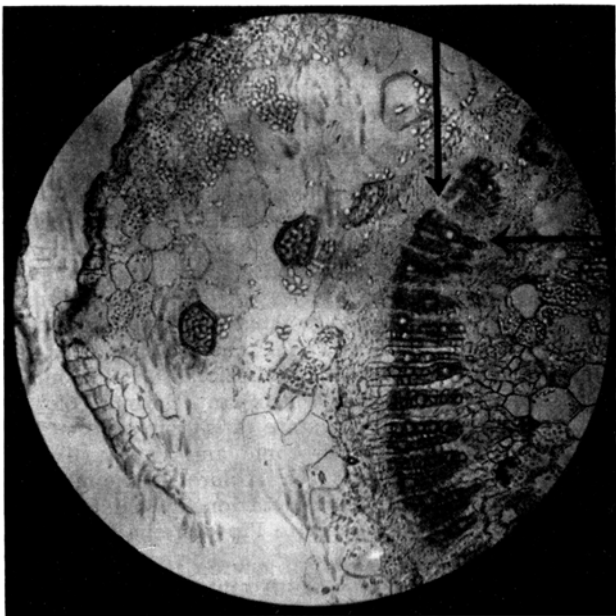


Abb. I.

¹ P. KLASON, Cellulosechemie 10, 113 (1932).
² H. K. BARRENSCHEEN, J. PANY und E. SRB, Biochem. Z. 310, 285 (1942).

Der chemische Nachweis, daß es sich hier tatsächlich um Lignin handle, war schwerer zu führen. Die chemische Definition des Lignins ist heute zwar noch umstritten. A. v. WACEK¹ postuliert folgende Bedingungen, die eine Substanz erfüllen muß, um als Lignin angesprochen zu werden:

1. Das Lignin ist ein N-freier, hochmolekularer Stoff, der Methoxylgruppen enthält und an dessen Aufbau Derivate des Phenylpropane maßgeblich beteiligt sind.

2. Durch Säurebehandlung wird eventuell lösliches Lignin in mehr oder minder unlösliche Körper umgewandelt.

3. Beim oxydativen Abbau des Lignins, sei es löslich oder unlöslich, muß das aromatische System in Form der entsprechenden Abbauprodukte (Vanillin, Syringaldehyd) nachweisbar sein.

Wir wollen uns im folgenden an diese Definition halten.

Es war somit festzustellen, ob aus etiolierten Kartoffelkeimlingen ein Körper isoliert werden kann, der Methoxyl enthält, mit Säuren unlöslich wird und sich zu den genannten aromatischen Körpern abbauen läßt.

Die übliche Ligninbestimmung mit konzentrierten Säuren erwies sich bei den Keimlingen, die ja als lebende Zellen mit großen Mengen Protoplasma erfüllt sind, als nur mit Vorsicht anwendbar. Tatsächlich enthielten die auf diese Art erhältlichen Reaktionsprodukte über 6% Stickstoff, waren also mit anderen N-reichen Substanzen verunreinigt, womit Angaben von R. S. HILPERT² bestätigt werden. Nach einer Methode von T. PLÖTZ³ läßt sich der Säureligningehalt durch Reihenversuche mit Säuren verschiedener Konzentration ziemlich genau ermitteln. Der wahre Gehalt an Säurelignin liegt bei einem Minimum an Unlöslichem («Lignin») und einem Maximum an Methoxylgehalt.

Wir bestimmten nach dieser Methode den Ligningehalt der Keimlinge. Aus der Kurve (Abb. 3) ist ersichtlich, daß bei einer Konzentration von 50–57% Schwe-

felsäure ein Maximum an Methoxyl bei einem Minimum von Unlöslichem («Lignin») erhalten wird.

Der Säureligningehalt der Keimlinge beträgt etwa 14% mit einem Methoxylgehalt von 4,2–4,4%. Er ist also vergleichsweise recht hoch und entspricht etwa einem Drittel des Methoxylgehalts der ausgereiften Staude. Die unterbrochen gezeichnete Kurve zeigt eine entsprechende Bestimmung an der gereiften Kartoffelstaude (ohne Blätter). Der Säureligningehalt beträgt etwa 15% mit 13,4% Methoxyl und 2% N, also entsprechend dem geringeren Protoplasmagehalt der Zellen nur ein Drittel des N-Gehaltes der Keimlinge.

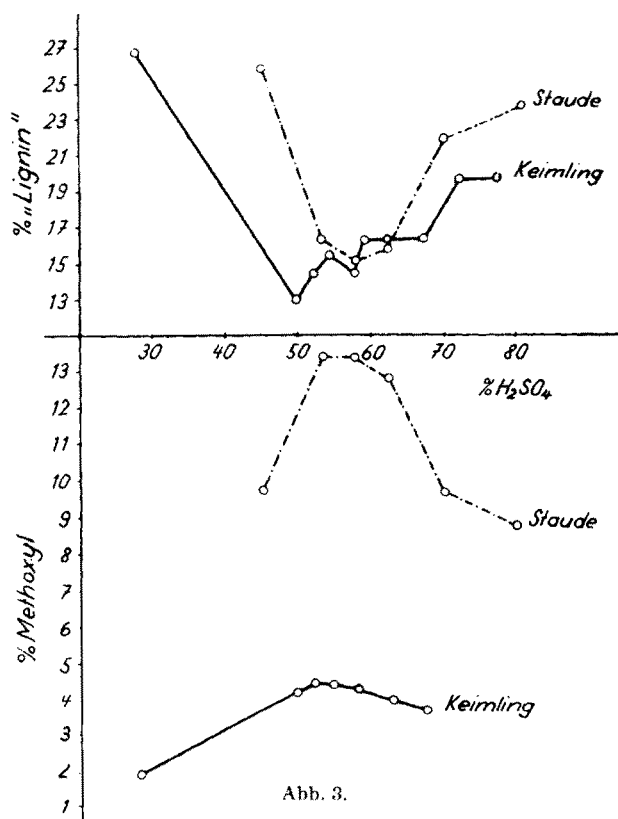


Abb. 3.

Im Gegensatz zu den Angaben P. KLASONS¹ war es also gelungen, die Färbung mit Ligninreagenzien zu erhalten und auch einen nicht unbeträchtlichen Methoxylgehalt festzustellen.

Die Überprüfung der dritten Bedingung, der Nachweis aromatischer Abbauprodukte, erwies sich deshalb als besonders schwierig, weil das als Endkörper zu erwartende Vanillin auch als solches oder als Glukosid in keimenden Pflanzen vielfach verbreitet ist². Vor Durchführung der Abbaureaktionen mußte dieses daher durch mehrmalige Extraktion und Hydrolyse entfernt werden, ohne daß dabei wesentliche Mengen des Lignins in Lösung gingen.

Die derart vorbehandelten Keimlinge ergaben beim oxydativen Druckabbau mit Alkali und Nitrobenzol Vanillin, das als gut kristallisiertes *m*-Nitrobenzhydrazon gefaßt werden konnte. Die Ausbeute an aromatischem Abbauprodukt war allerdings sehr gering und quantitative Bestimmungen werden durch den hohen

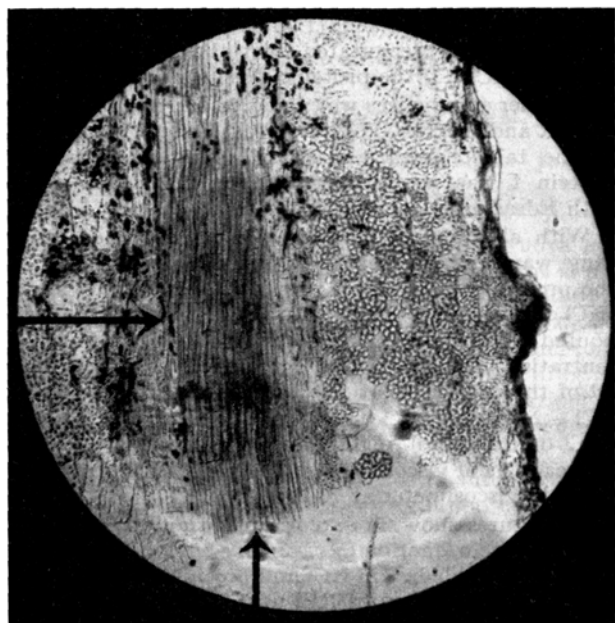


Abb. 2.

¹ A. v. WACEK, Exper. 2, 171 (1946).

² R. S. HILPERT, Ber. dtsh. chem. Ges. 69, 1509 (1936).

³ K. FREUDENBERG und T. PLÖTZ, Cellulosechemie 18, 49 (1940).

¹ P. KLASON, Cellulosechemie 10, 113 (1932).

² E. v. LIPPMANN, Ber. dtsh. chem. Ges. 45, 3432 (1912); 52, 905 (1919). – W. BRÄUTIGAM, Arch. Pharm. 238, 555 (1900); Chem. Zbl. 1900, II, 983.

N-Gehalt der verarbeiteten Substanzen erschwert. Wir konnten auch neben dem Vanillin Syringaaldehyd, den wir eigentlich nach den Ergebnissen von H. HIBBERT¹ erwarteten, nicht nachweisen, was wir allerdings der Aufarbeitungsmethode zuschreiben, da wir unter den gleichen Bedingungen aus der Stauden ebenfalls nur Vanillin isolieren konnten.

Aus dem Verhältnis des Gesamtmethoxyls zum Methoxylgehalt der Abbauprodukte sowie daraus, daß wir nachweisen konnten, daß bei der Bestimmung der Säurelignine 50% des Methoxyls wasserlöslich wird und bei Heißwasserextraktion 30% des Methoxyls ebenfalls in wasserlöslicher Form entferntbar ist, leiten wir die Vermutung ab, daß in den Keimlingen wasserlösliche, methoxylhaltige Körper vorkommen, die eventuell als biologische Vorstufen des Lignins angesehen werden können.

Nach diesen Versuchen kann offenbar die Verholzung der Pflanze von der Photosynthese unabhängig verlaufen und das Lignin des Etiolements scheint im chemischen wie im botanischen Sinne in den wesentlichsten Punkten dem der ausgereiften Pflanze zu entsprechen.

K. KRATZL

I. chemisches Laboratorium der Universität Wien, Organische Abt. und Abt. für Chemie des Holzes, Oktober 1947.

Summary

Potato germs grown in absence of light contain a substance which doubtless can be classified as lignin. This statement, though contradictory to the findings of P. KLASON, may be proved by microscopic staining methods as well as by chemical analysis. It is concluded that photo-energy is not necessary for the formation of lignin.

¹ R. H. J. CREIGHTON, R. P. GIBBS und H. HIBBERT, J. Am. chem. Soc. 66, 32 (1944).

Effects of Lithium Cation and of Thiocyanate Anion on the Viscosity of Solutions of Proteins from Eggs and Embryos

In previous publications¹ it was shown that lithium chloride induces an increase, and thiocyanate anion a decrease, in the viscosity of solutions containing euglobulin b extracted from amphibian embryos with NEEDHAM's methods². When we consider the fact that LiCl and NaSCN modify the embryo's development in a different way³, these researches bring us to the conclusion that euglobulin b is a very important substance for embryo development. A similar effect of Li⁺ and SCN⁻ has been found³ on the viscosity of solutions containing fibrillar particles (Weber and Edsall's myosin, sodium thymonucleinate); while Li⁺ and SCN⁻ both induce an increase in the viscosity of solutions containing round (globulin X of the muscles) or short-rod particles (gelatin). REBUFFAT and BRACHET⁵ observed the same

reaction (increase in viscosity induced by Li⁺, decrease induced by SCN⁻) in the extracts of nuclei of birds' red cells. When REBUFFAT and BRACHET made this observation, they raised a doubt whether a material of nuclear origin (nucleohistone), and not euglobulin b, played a part in the variations of viscosity of embryo extracts.

We made our observations on euglobulin b¹ taking the precipitate formed after diluting up to 0.3 M KCl the original extract in 1 M KCl, and dissolving this precipitate in 1 M KCl. This precipitate does not contain an appreciable amount of thymonucleic acid, because DISCHE's reaction is negative. We could therefore, according to the figures already published, conclude that euglobulin b is the substance which, in embryo extracts, shows opposite viscosity variations due to the effects of Li⁺ and SCN⁻.

For the sake of security and to remove any possible doubt we have repeated our experiments with unfertilized eggs of axolotl (*Amblystoma tigrinum* Green) and of Rhode Island red hens. The hen's eggs particularly do not contain any appreciable amount of nucleic acid, as in the birds' eggs we verify the total synthesis of nucleic acid during the embryo development, and the amount of the ribonucleoprotein in the yolk is negligible². We have also used unfertilized sea urchin's eggs (*Arbacia lixula* (L.) = *A. punctulosa* [Leske]).

Unfertilized eggs of axolotl and of sea urchin's were frozen, dried, and delipidated with alcohol and ether successively. The resulting powder was extracted with M KCl (this extract is called in the table: extract in 1 M KCl). One volume of cold bidistilled water was poured in this liquid and centrifuged. The resulting liquid was diluted to 0.3 M KCl; NEEDHAM's euglobulin b precipitated (after centrifugation this solution is called in the table: extract in 0.3 M KCl). The euglobulin b, always at 0°C, was dissolved again in M KCl (this solution is called in the table: euglobulin b). DISCHE's reaction on the euglobulin b of axolotl's eggs is absolutely negative.

We proceeded in the same way with the hen's egg (the yolk only), studying: (1) the total extract in M KCl; (2) the proteins precipitated when the extract is diluted to 0.3 M KCl; (3) the proteins dissolved in 0.3 M KCl.

In other experiences we extracted hen's egg yolk with BANGA and SZENT-GYÖRGYI's Edsall-urea⁴ (we call this in the table: extract in Edsall-urea). The structure protein I was precipitated and then dissolved either with Edsall-urea or with M KCl.

With all the solutions we always proceeded in the same way, and we prepared three samples: (a) 10 ml of the protein solution were poured into 10 ml of 1 M KCl (KCl of the table); (b) 10 ml of the protein solution were poured into 9 ml 1 M KCl + 1 ml 1 M KSCN (final concentration of KSCN 0.05 M) (KSCN of the table); (c) 10 ml of the protein solution were poured into 7.2 ml 1 M KCl + 2.8 ml 1 M LiCl (final concentration of LiCl 0.14 M) (LiCl of the table). After 4 hours incubation (13.25°C) the readings of viscosity were done by CITTERIO with an Ostwald viscosimeter at 13.25 ± 0.01°C.

The figures show, in axolotl and in unfertilized hen's eggs, a protein fraction (NEEDHAM's euglobulin b of Amphibians) soluble in 1 M KCl and precipitated by adjusting the concentration of KCl up to 0.3 M. This fraction is quite distinct from nucleic acid, as is demonstrated

¹ S. RANZI, R. AROSIO, P. CITTERIO, P. MENOTTI, and F. SEMENZA, Exper. 2, 315 (1946).

² S. RANZI and E. TAMINI, Naturwiss. 27, 566 (1939). – S. RANZI, Nature 165, 578 (1945). – S. RANZI, E. TAMINI, and E. STORARI OFFER, Ist. Lombardo (Rend. Sci.) 79, 161 (1946).

³ A. S. C. LAWRENCE, M. MIAL, J. NEEDHAM, and S.-C. SHEN, J. gen. Physiol. 27, 233 (1944).

⁴ P. CITTERIO and S. RANZI, Rend. Accad. Lincei (Sci. fis.) (8) 3, 150 (1947).

⁵ P. REBUFFAT and J. BRACHET, Exper. 3, 454 (1947).

¹ R. AROSIO, P. CITTERIO, P. MENOTTI, S. RANZI, and F. SEMENZA, Riv. Biol. 33, 153 (1946).

² J. BRACHET, Embryologie chimique (Liège, Paris 1945).

³ I. BANGA and A. SZENT-GYÖRGYI, Enzymologia 9, 97 (1940).