

Les Figures 1 et 2 reproduisent des décalques de taches obtenues au cours de deux chromatoelectrophorèses des dérivés étudiés, réalisées chacune avec un solvant chromatographique différent dans leur premier temps. Nous avons joint à l'un d'eux (Figure 1, A), aux fins de comparaison, un document rendant compte de la migration électrophorétique des mêmes corps non soumis à une chromatographie préalable.

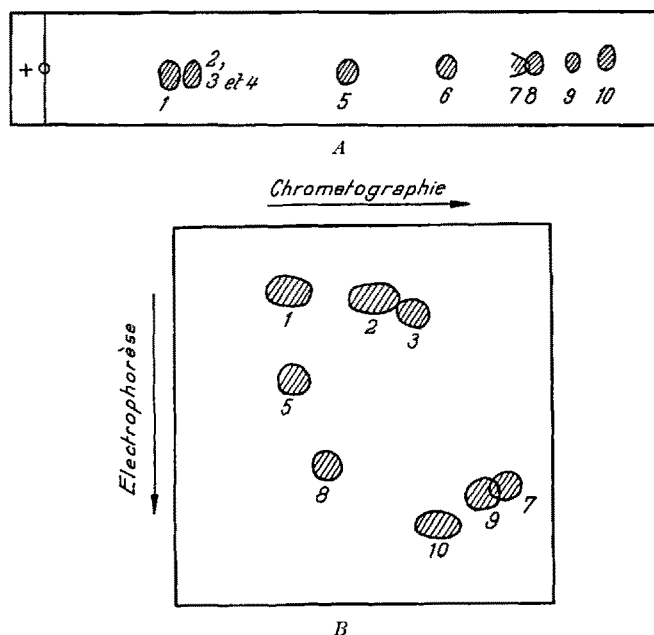


Fig. 1. A. – Migration électrophorétique sur papier de divers dérivés guanidiques et de la citrulline (tampon au véronal de pH = 8,6 et de force ionique 0,1; 300 V, 0,4 mA/cm, 2 h, +10°C). – B. – Chromatoelectrophorèse sur papier des mêmes corps par chromatographie en une dimension (solvant: pyridine, 80; isopentanol, 40; acide acétique, 10; eau, 40), suivie d'une électrophorèse (mêmes conditions que A) dans l'autre dimension. 1 citrulline, 2 glycocyamine, 3 créatine, 4 acide γ -guanidobutyrique, 5 arginine, 6 arcaïne, 7 diméthylguanidine, 8 agmatine, 9 méthylguanidine, 10 guanidine (dépôt de la goutte du mélange dans l'angle supérieur gauche).

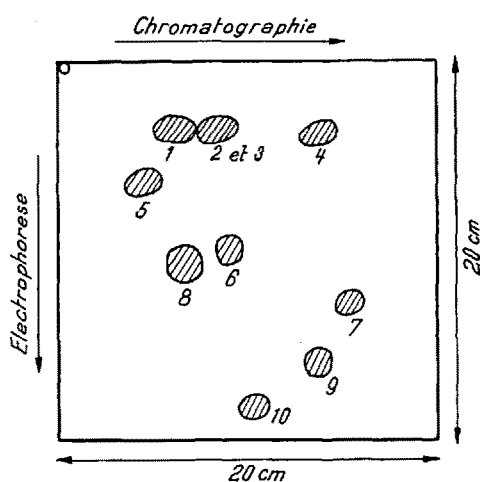


Fig. 2. Chromatoelectrophorèse sur papier de divers dérivés guanidiques et de la citrulline, réalisée par chromatographie monodimensionnelle (solvant: *n*-butanol, 63; acide formique, 20; eau, 17) suivie d'électrophorèse (tampon au véronal de pH = 8,6 et de force ionique = 0,1, 300 V, 0,4 mA/cm, +10°C). 1 citrulline, 2 glycocyamine, 3 créatine, 5 arginine, 7 diméthylguanidine, 8 agmatine, 9 méthylguanidine, 10 guanidine (lieu de dépôt de la goutte du mélange indiqué par un rond).

Dans les conditions correspondant au document B de la Figure 1, la séparation obtenue est satisfaisante, sauf pour la glycocyamine et la créatine. Les taches de celles-ci sont presque superposées, mais elles peuvent être différenciées au moyen des réactions colorées spécifiques de chacune d'elles (Tableau I). L'emploi d'un mélange de *n*-butanol, d'acide formique et d'eau (63:20:17), comme solvant dans la chromatographie préalable à l'électrophorèse, permet de localiser la glycocyamine et la créatine dans deux taches, la mono- et la diméthylguanidine étant alors, en revanche, confondues en une seule, comme le montre l'examen de la Figure 2.

L'association des deux méthodes d'analyse bénéficie d'avantages propres à chacune. Elle présente en outre, sur la chromatographie bidimensionnelle, celui d'être beaucoup plus rapide (8 h); sa sélectivité est par ailleurs différente, car elle met en œuvre la charge électrique des corps en même temps que leur comportement chromatographique. L'étude dont les résultats ont été présentés ici n'est qu'une application de la chromatoelectrophorèse à un groupe particulier de dérivés, dont l'identification dans des extraits de tissus animaux a été ainsi réalisée¹. L'emploi de cette méthode est susceptible d'une large extension mettant en œuvre la migration électrophorétique à plusieurs pH et la chromatographie dans divers milieux. Deux d'entre nous poursuivent des recherches à ce sujet².

S. LISSITZKY, ISABELLE GARCIA et J. ROCHE

Laboratoire de Biochimie générale et comparée, Collège de France, Paris, et Laboratoires de Chimie biologique et de Chimie générale et pharmaceutique, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Alger, le 9 avril 1954.

Summary

Paper chromatography has been used in conjunction with electrophoresis in a perpendicular direction (chromatoelectrophoresis), in order to characterize various guanidoderivatives of biological interest and also citrulline. The isolation of definite spots can be obtained with a satisfactory selectivity by this procedure, at a higher speed than by bidimensional chromatography; and the use of a few coloured reactions (ninhydrine, SAKAGUCHI, diacetyl- α -naphthol and *p*-dimethylaminobenzaldehyde) on the same electrochromatogram has been successfully practised in this field.

¹ S. LISSITZKY, I. GARCIA et J. ROCHE, C. r. Soc. Biol. 148, 436 (1954).

² Un intéressant travail de J. BLASS, O. LECOMTE et J. POLONOVSKI sur la chromatoelectrophorèse des acides aminés a paru C. Bull. Soc. Chim. biol. 36, 627 (1954) après le dépôt de la présente note (addendum de ² à la correction des épreuves).

Sul significato dell'affinità dei granuli neutrofili dei leucociti per i coloranti tipo Sudan

Da un esteso esame critico e sperimentale della sudanofilia leucocitaria LILLIE e BURTNER¹ hanno recentemente tratto la conclusione che l'affinità dei leucociti neutrofili per i coloranti tipo Sudan non dipende dalla liposolubilità dei coloranti stessi, ma da una vera combinazione chimica fra il radicale β -naftolico della loro molecola e i granuli «sudanofili».

¹ R. D. LILLIE e H. J. BURTNER, J. Nat. Canc. Inst. 13, 220 (1952); J. Histochem. Cytochem. 1, 8 (1953).

Queste conclusioni si fondano, essenzialmente, sulla constatazione che tali granuli: a) possiedono sudanofilia modesta, la cui evidenziazione richiede coloranti molto energici (Sudan nero B, Oil Red O) o particolari accorgimenti tecnici (trattamenti prolungati, o a caldo, o con sostanze di tipo fenolico); b) sono scarsamente solubili nei solventi organici; c) resistono alla decolorazione con solventi organici in eccesso e, una volta decolorati, perdono del tutto o in parte l'affinità per il Sudan; d) a differenza di altre strutture citologiche di natura lipidica, presentano affinità assai ridotta o nulla per campioni di Sudan nei quali il radicale β -naftolico sia stato preventivamente bloccato mediante esterificazione.

Discutendo le surriferite vedute di LILLIE e BURTNER, GOMORI¹ le ha implicitamente condivise, esprimendo l'opinione che la sudanofilia dei granuli neutrofili si identifichi con la loro affinità per i naftoli (*naftolofilia*²).

È chiaro che ove si accettassero queste conclusioni risulterebbe demolito ogni argomento probante la natura lipidica delle granulazioni neutrofile e infirmato lo stesso significato istochimico, fin'ora indiscusso, della sudanofilia in generale. Val quanto dire che si profila la necessità di riesaminare una parte considerevole della letteratura istochimica di questi ultimi anni.

Tuttavia alcune notizie della letteratura e i risultati di ricerche citochimiche cui stavo dedicandomi al momento della pubblicazione dei lavori sopracitati, mi indussero ad accogliere con riserva le suddette conclusioni, e ad estendere le indagini onde chiarire alcuni aspetti oscuri del problema.

In collaborazione con BOTTINO³ ho potuto stabilire: 1. che le granulazioni dei leucociti neutrofili oltre ad essere sudanofile, reagiscono positivamente anche alle reazioni per i lipidi fondate sulla fluorescenza indotta da 3-4-benzopirene (BERG⁴) e da Fosfina 3R (PEARSE⁵); 2. che il trattamento preventivo con β -naftolo potenzia in tali granulazioni non solo la sudanofilia (DE BRUJIN⁶) ma anche la positività al solfato di Bleu Nilo secondo Cain e la solubilità nei solventi organici; 3. che la decolorazione dei granuli colorati con Sudan nero B, mediante solventi organici in eccesso, è ottenibile in tempi molto inferiori a quelli indicati da LILLIE e BURTNER.

Se ora si considera che la fluorescenza indotta dal 3-4-benzopirene e dalla Fosfina 3R è ritenuta espressione della liposolubilità di queste sostanze⁷ è evidente che per negare la liposolubilità del Sudan nelle granulazioni neutrofile si dovrebbe poter negare anche quella del benzopirene e della fosfina, e trovare anche per queste due sostanze la possibilità di un legame chimico. Ma ciò risulta inverosimile per il fatto che fra le molecole del benzopirene, della fosfina e dei Sudan non v'è nessuna analogia di struttura chimica, ed in particolare la molecola del benzopirene, notoriamente lipofila e idrofoba, non possiede nessun radicale passibile di legami chimici.

Quanto poi alla difficoltà di estrarre i Sudan dai granuli neutrofili, pur prescindendo dalle divergenze esistenti a questo riguardo fra i nostri reperti e quelli di

LILLIE e BURTNER, si può osservare innanzitutto che secondo BERG¹ la velocità di colorazione di una data localizzazione lipidica è funzione, fra l'altro, della viscosità dei lipidi presenti: tanto minore, cioè, la prima quanto maggiore è la seconda. È evidente che lo stesso principio deve valere anche per il processo di decolorazione. Ma oltre a ciò va notato che si può anche ammettere, teoricamente, che nell'interno del granulo esista qualche altra sostanza, distinta dalla componente lipidica, alla quale il Sudan potrebbe legarsi chimicamente, dopo essersi disciolto in quest'ultima.

A questo proposito ho però potuto dimostrare, in collaborazione con M. SOLDATI: 1. che le granulazioni neutrofile possiedono una componente proteica contenente arginina²; 2. che il trattamento con β -naftolo facilita la dimostrazione istochimica dell'arginina³; 3. che la naftolofilia osservata da GOMORI nelle granulazioni neutrofile è dimostrabile anche in altre strutture citologiche sudanofobe (nuclei, eritrociti, piastrine), che essa va intesa come affinità specifica per l' α -naftolo, con esclusione del β -naftolo e del fenolo e che essa dipende presumibilmente dalla presenza, nelle strutture naftolofile di arginina².

Non sono quindi verosimili le vedute di GOMORI⁴ secondo cui l'affinità dei granuli neutrofili per i Sudan dipenderebbe da un fenomeno di naftolofilia sostenuto dal radicale β -naftolico della loro molecola.

D'altro canto, la mancata colorabilità dei granuli neutrofili da parte dei Sudan esterificati non sembra possedere quel significato determinante accordato da LILLIE e BURTNER a sostegno delle loro conclusioni. Se si accetta infatti il concetto (MICHAELIS⁵, LISON⁶) che la sudanofilia di una determinata localizzazione lipidica è funzione del rapporto fra i coefficienti di solubilità del Sudan nella localizzazione e nel solvente, si deve anche ammettere a priori che l'esterificazione del colorante determini una modificazione di tale rapporto, le cui repercussions possono essere trascurabili nei riguardi di alcune strutture lipidiche, ma rilevanti e significative nei riguardi di altre.

Ciò sembra tanto più verosimile ove si consideri la coesistenza nel granulo neutrofilo di una componente proteica (documentata dalla presenza di arginina (PERUGINI e SOLDATI⁷) e di gruppi tiolici (MAURI e coll.⁸), che può interferire negativamente sulla dimostrabilità della componente lipidica. In tal senso sono assai significative le citate osservazioni relative all'influsso esercitato dal β -naftolo sull'esito delle diverse reazioni citochimiche: tali osservazioni avvalorano infatti l'ipotesi di DE BRUJIN⁹ che i naftoli, come il fenolo, esplicano sui granuli azione lipofanerotica, anche se non è possibile per ora precisare se detta azione si attui mediante una vera rottura di legami lipoproteici o attraverso una modificazione della struttura chimico-fisica o submicroscopica dei granuli o del citoplasma.

A mio avviso questa complessità di costituzione chimica dei granuli neutrofili rappresenta un dato di

¹ N. O. BERG, Acta Path. Scand. Suppl. 90 (1951).

² S. PERUGINI e M. SOLDATI, Riv. d'Istochim. norm. patol. (in stampa).

³ S. PERUGINI e M. SOLDATI, Biol. Latina (in stampa).

⁴ G. GOMORI, J. Nat. Canc. Inst. 13, 221 (1952).

⁵ L. MICHAELIS, Encyklopädie der Mikroskopischen Technik (Urban e Schwarzenberg, Berlin 1903), p. 361.

⁶ L. LISON, Histochimie Animale (Gauthier-Villars, Paris 1936).

⁷ S. PERUGINI e M. SOLDATI, Riv. d'Istoch. norm. pat. (in stampa).

⁸ C. MAURI, F. VACCARI e B. SABOTTO, Medicina (in stampa).

⁹ A. G. E. PEARSE, Histochemistry (J. e A. Churchill, London 1953).

¹ G. GOMORI, J. Nat. Canc. Inst. 13, 221 (1952).

² G. GOMORI, Microscopic Histochemistry (Univ. of Chicago Press 1952).

³ S. PERUGINI e D. BOTTINO (in stampa).

⁴ N. O. BERG, Acta Path. Scand. Suppl. 90, (1951).

⁵ A. G. E. PEARSE, Histochemistry (J. e A. Churchill, London 1953).

⁶ P. P. H. DE BRUJIN, Acta Neerl. Morph. 2, 322 (1939).

⁷ N. O. BERG, Acta Path. Scand. Suppl. 90, (1951). – A. G. E. PEARSE, Histochemistry (J. e A. Churchill, London 1953).

fatto che deve sempre essere tenuto presente nella valutazione dei singoli reperti citochimici che ad essi si riferiscono e che può facilitare la spiegazione di taluni loro comportamenti apparentemente anormali. I molti elementi già raccolti in proposito, saranno discussi in altra sede¹.

Per ora mi preme sottolineare il fatto che l'esistenza nei granuli neutrofili di una componente lipidica risulta inequivocabilmente confermata, e che le divergenze esistenti fra il comportamento di tali granuli e quello delle più comuni localizzazioni lipidiche di altri tessuti, non infirmano il significato tradizionale fin'ora attribuito alla sudanofilia dei granuli neutrofili.

S. PERUGINI²

Istituto di Patologia medica dell'Università di Modena e Istituto di Anatomia comparata dell'Università di Pavia, il 11 maggio 1954.

Summary

On the grounds of cytochemical findings and of critical arguments, the author reaffirms that the sudanophilia of neutrophile leucocytes depends on their lipidic content and not on some chemical combination of the dyes with cytoplasmic constituents, as yet unexplained, as suggested by LILLIE and BURTNER, and by GOMORI.

¹ S. PERUGINI e D. BOTTINO (in stampa). – S. PERUGINI e M. SOLDATI, Biol. Latina (in stampa); Riv. Istoch. norm. pat. (in stampa).

² Borsista del Consiglio Nazionale delle Ricerche presso l'Istituto di Anatomia Comparata dell'Università di Pavia.

Feeding Habits and Physiology of Digestion of Certain Leafhoppers Homoptera: Jassidae

Investigations on the feeding habits of certain leafhoppers have revealed that they show a certain degree of specificity to a particular plant tissue for drawing their food-sap. On this basis they can be grouped into two categories. One of these includes forms which feed mainly upon the mesophyll tissue. The species recorded under this category are: *Empoasca bifurcata* DeL., *E. erigeron* DeL., *E. filamenta* DeL., *E. abrupta* DeL., and *E. maligna* (Walsh) (SMITH and POOS¹), and *Typhlocyba pomaria* McATEE (PUTMAN²). The other category includes forms which suck the sap primarily from the vascular bundles, particularly from the phloem tissue. The species recorded under this group are: *Empoasca fabae* (HARRIS) (SMITH and POOS¹), *Homalodisca triquetra* (Fab.) (KING and COOK³), *Graphocephala versuta* (Say) (KING and COOK³), *Eutettix tenellus* Bak. (BENNET⁴), *Cicadulina mobila* (Naude) (STOREY⁵), *Macropsis trimaculata* (Fitch) (PUTMAN²), and *M. insignis* (Van Duzee) (PUTMAN²).

The significance of this specificity to a particular plant tissue shown by jassids is not clear. In the case of *Eutettix tenellus*, which feeds upon the phloem tissue of sugar-beet petioles, FIFE and FRAMPTON⁶ have shown that the stylets of this insect are guided to their ob-

jective by a pH gradient which exists between the epidermis and the phloem. Their experiments, however, do not throw light on the physiological value of this tissue-specificity. Experiments of BENNET¹ on the same leafhopper reveal that the individuals fed on the parenchyma of sugar-beet petioles show a much higher rate of mortality than do those fed on the phloem tissue. This indicates that the parenchyma does not serve as a favorable source of food for these insects.

Further elucidation of the physiological relationship between the leafhoppers and the plant tissue attacked requires a knowledge of their physiology of digestion. At present our knowledge of this aspect is confined to HERFORD's² record of the occurrence of two enzymes, diastase and invertase, in the salivary secretion of *Empoasca solana* DeL. The study of this aspect was, therefore, taken up in four species of jassids, namely, *Empoasca kerri* Pruthi, *E. devastans* Dist., *Tettigella spectra* (Sign.) and *Parabolocratrus porrectus* Walk.

The methods employed for the study of stylets' track through the plant tissue were those adopted by SMITH³ and PUTMAN⁴. For the determination of digestive enzymes the usual practice of preparing the extracts of digestive organs by grinding was avoided in order to exclude the endoenzymes. The latter are not liberated in the lumen of the gut and, hence, cannot take part in the digestion of food prior to its absorption. Only the contents of the lumen were drawn out and tested for the presence of various enzymes. The technique for their detection is described elsewhere.

Of the four species included in the present study, *Tettigella spectra* and *Parabolocratrus porrectus* confine their feeding to plants of the family Graminae. They show a great preference for doobgrass (*Cynodon dactylon*), maize (*Zea mays*), and, sometimes also for paddy (*Oryza sativa*). On the other hand, *Empoasca kerri* and *E. devastans* do not feed on gramineous plants. *E. kerri* feeds mostly on plants of pigeon pea (*Cajanus indicus*), potato (*Solanum tuberosum*) and castor (*Ricinus communis*) while *E. devastans* feeds on malvaceous plants like cotton (*Gossypium* spp.), *Hibiscus* spp., and also on potato, and brinjal (*Solanum melongena*). The first two species suck the sap from the phloem tissue while the latter two feed mostly on the mesophyll tissue.

The distribution of enzymes in different parts of the digestive tract is shown in the accompanying table. It is apparent from this table that the enzymes present in the mesophyll-feeding *E. kerri* and *E. devastans* are: amylase, maltase, invertase, alkaline proteinase, polypeptidases, chlorophyllase and, in *E. kerri* only, lipase. These enzymes act upon starch, maltose, sucrose, proteins, polypeptides, chlorophyll and fat globules respectively to yield diffusible substances. On the other hand, in the phloem-feeding jassids, *T. spectra* and *P. porrectus*, the enzymes amylase, proteinase, lipase and chlorophyllase are absent. Hence, these insects cannot utilise nondiffusible substances like starch, native proteins and lipids, which are abundant in the mesophyll cells. The sap in the phloem is, however, rich in soluble substances which are either already in a diffusible state or can be rendered diffusible by the enzymes present in these insects. When they are artificially fed on solutions of starch, casein, gluten or oil emulsion they die much more quickly than do the individuals fed on solutions of maltose, cane sugar, glucose and tryptophane. In the former case the

¹ F. F. SMITH and F. W. POOS, J. Agri. Res. 43, 267 (1931).

² W. L. PUTMAN, Canad. Ent. 73, 39 (1941).

³ W. V. KING and W. S. COOK, U. S. Dep. Agri. Tech. Bull. No. 296 (1932).

⁴ C. W. BENNET, J. Agri. Res. 48, 665 (1932).

⁵ H. H. STOREY, Proc. Roy. Soc. (London) [B] 125, 455 (1938).

⁶ J. M. FIFE and V. L. FRAMPTON, J. Agri. Res. 53, 581 (1936).

¹ C. W. BENNET, J. Agri. Res. 48, 665 (1932).

² G. V. B. HERFORD, Ann. Appl. Biol. 22, 301, 306 (1935).

³ K. M. SMITH, Ann. Appl. Biol. 13, 109 (1926).

⁴ W. L. PUTMAN, Canad. Ent. 73, 39 (1941).