

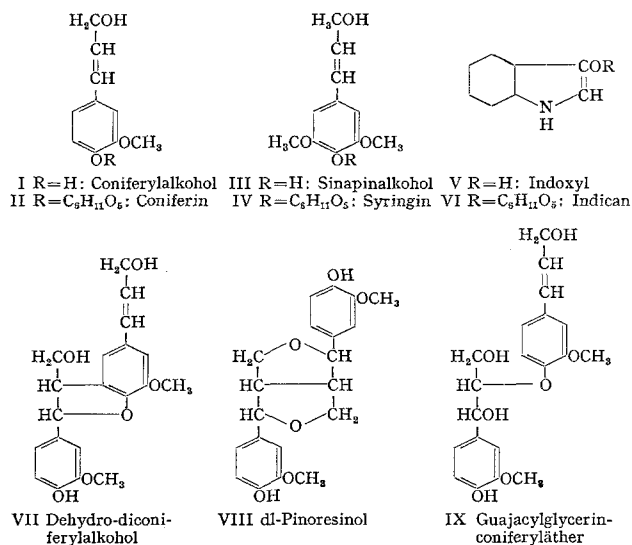
## Untersuchung über die Entstehung des Lignins und des Holzes.

VON KARL FREUDENBERG, HANS REZNIK, WERNER FUCHS UND MARTIN REICHERT, Heidelberg\*).

1. Einige Grundbegriffe der Ligninchemie.
  2. Enzymatische Vorgänge bei der Bildung des Lignins.
  3. Glucoside mit radioaktivem Kohlenstoff.
  4. Verabreichung der radioaktiven Glucoside.
  5. Technik der Versuchsauswertung.
  6. Ergebnisse der Versuche mit den radioaktiven Glucosiden.
    - A. Versuche mit radioaktivem D- bzw. L-Coniferin.
    - B. Versuche mit radioaktivem D- bzw. L-Glucovanillin.
- Zusammenfassung.

### 1. Einige Grundbegriffe der Ligninchemie.

Die Versuche über die enzymatische Dehydrierung des Coniferylalkohols I haben ergeben, daß die Bildung des Lignins in vitro wie in der Pflanze über mehrere dimere Zwischenstufen erfolgt, von denen bis jetzt zwei, der Dehydro-diconiferylalkohol VII und das dl-Pinoresinol VIII, in kristallisiertem Zustand gefaßt worden sind. Eine dritte ist der Äther des phenolischen Hydroxyls des Coniferylalkohols mit dem mittleren Hydroxyl des Guajacylglycerins IX<sup>1)</sup>. Wenn man den Coniferylalkohol als den primären Baustein des Lignins ansieht, so kann man diese dimeren Dehydrierungsprodukte als sekundäre Bausteine bezeichnen. Sie werden ihrerseits, und zwar im Gemisch miteinander, durch weitere Dehydrierung kondensiert und bilden so das Lignin der Coniferen.



Andere p-Oxyzimtalkohole, wie der Sinapinalkohol (3,5-Dimethoxy-4-oxyzimtalkohol) III oder der p-Cumaralkohol (4-Oxyzimtalkohol) geben, wenn sie zusammen mit Coniferylalkohol dehydriert werden, Mischpolymerisate, die den Ligninen der Laubhölzer und der Gramineen außerordentlich nahestehen. Für

\* Die chemisch präparativen Unterlagen sind in den letzten Jahren in den Chemischen Berichten mitgeteilt worden. Eine Zusammenfassung von K. FREUDENBERG über neuere Ergebnisse auf dem Gebiete des Lignins und der Verholzung findet sich in den Fortschritten der Chemie organischer Naturstoffe, herausgeg. von ZECHMEISTER, 11, 43 (1954), Springer Verlag, Wien. Vgl. ferner K. FREUDENBERG, Lignin, in Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Springer-Verlag Heidelberg, im Druck.

<sup>1)</sup> FREUDENBERG, K., u. H. SCHLÜTER: Unveröffentlicht.

Naturwiss. 1955.

sich allein liefert Sinapinalkohol in vitro kein Dehydrierungspolymerisat.

### 2. Enzymatische Vorgänge bei der Bildung des Lignins<sup>2)</sup>.

Die Bildung von Lignin in verholztem Pflanzengewebe wird durch zwei Fermentsysteme veranlaßt, nämlich durch  $\beta$ -Glucosidase, die sich mit Wasser nicht extrahieren läßt, und durch ein Redoxasengemisch, das aus Phenoldehydrasen und Peroxydase besteht. Die Redoxasen liegen in reichlicher Menge im lebenden Gewebe des Cambiums und der benachbarten Zellbezirke sowohl in wasserlöslicher als auch in zellgebundener Form vor.

Im gleichen Gewebe befindet sich während der Vegetationsperiode das Glucosid Coniferin II, das durch die Redoxasen nicht angegriffen wird. Wenn es jedoch mit der zellgebundenen  $\beta$ -Glucosidase in Berührung kommt, wird aus ihm Coniferylalkohol freigelegt, der alsdann von den Redoxasen in Lignin verwandelt wird. Sowohl der Coniferylalkohol als auch die oben genannten sekundären Ligninbausteine lassen sich papierchromatographisch in winzigen Mengen im Gewebesafte nachweisen. Der Verholzungsvorgang bei den Coniferen ist damit in großen Zügen erklärt. Beim Laubholz tritt als weitere Komponente der Ligninbildung der erwähnte Sinapinalkohol III hinzu, dessen Glucosid, das Syringin IV, in den Rinden vieler Laubhölzer vorkommt.

Die Lokalisierung der Glucosidase läßt sich durch Behandeln von Sproßschnitten mit Indicanlösung nachweisen. Indican VI ist ein farbloses Glucosid, das durch  $\beta$ -Glucosidasen in Glucose und das wasserlösliche, kaum gefärbte Indoxyl V gespalten wird. Indoxyl verwandelt sich an der Luft binnen kurzem in tiefblau gefärbten Indigo. Der mit Indicanlösung behandelte Schnitt färbt sich daher am Ort der Glucosidase blau an.

Das Mittelstück der schematischen Zeichnung (Fig. 1) gibt einen Querschnitt durch das Cambium und das anstoßende Gewebe eines Coniferentriebs wieder. Das Cambium ist an den dunkel gezeichneten Zellkernen zu erkennen, links davon ist die Rinde und rechts davon das Holz. Zwischen Cambium und Holz liegen die neuen, noch unverholzten und in Verholzung begriffenen Zellen.

Im unteren Teil der Fig. 1 sind die verholzten Zellen durch Schwärzung kenntlich gemacht. Sie entspricht der Rotfärbung des Lignins, die eintritt, wenn ein Schnitt mit Phloroglucin-Salzsäure besprüht wird. Etwa in der 4. bis 7. Zellreihe, vom Cambium aus gesehen, ist die Ligninbildung nur in den Mittelamellen nachzuweisen. Von der 8. Zellreihe an sind die gesamten Zellmembranen (einschließlich der sekundären Membranen) in Verholzung begriffen bzw. vollständig verholzt. — Der obere Teil der Fig. 1

<sup>2)</sup> FREUDENBERG, K., H. REZNIK, H. BOESENBERG u. D. RA-SENACK: Chem. Ber. 85, 641 (1952).

stellt einen mit Indicanlösung behandelten Schnitt dar. Die die Gegenwart von Glucosidase anzeigende Blaufärbung ist im Bild schwarz eingetragen.

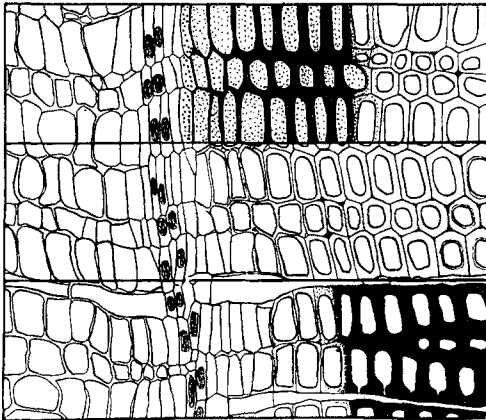
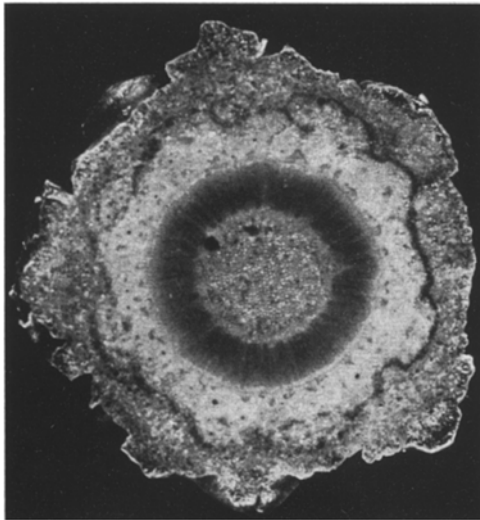
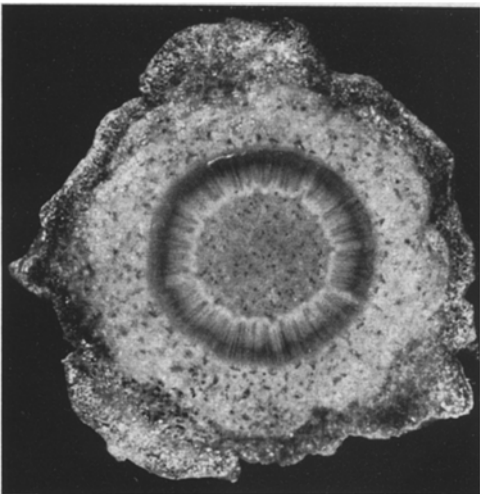


Fig. 1. Querschnitt durch das Cambium und das anstoßende Gewebe eines Coniferentriebs (schematisch). Oben: Mit Indican behandelt. Mitte: Unbehandelt. Unten: Mit Phloroglucin-Salzsäure behandelt.



a



b

Fig. 2a u. b. Querschnitt durch den Gipfeltrieb einer *Araucaria excelsa*. a Mit Phloroglucin-Salzsäure behandelt; b mit Indican behandelt.

Die Glucosidase tritt bereits in der zweiten oder dritten vom Cambium nach innen abgegebenen Zellreihe auf. Etwa in der 10. oder 11. Zellreihe wird der

Effekt schwächer und verschwindet am Ort abgeschlossener Holzbildung vollständig. In der 9., 10. und 11. Zellreihe sind Glucosidase und fertig gebildetes Lignin gleichzeitig nachweisbar.

Um das Gesagte anschaulicher zu machen, sind in Fig. 2 zwei Schnitte durch den (einjährigen) Gipfeltrieb der Conifere *Araucaria excelsa* abgebildet. Der Schnitt a ist mit Phloroglucin-Salzsäure behandelt. Die durch das Reagens hervorgerufene tiefdunkelrote Färbung läßt den bereits vor dem Cambium mit unscharfer Begrenzung aufgehenden Holzkörper sowie einzelne im Mark zerstreute verholzte Zellen erkennen. Außen in der primären Rinde ist ein ebenfalls gefärbter Ring von verholztem Gewebe (Sclerenchym-scheide) wahrzunehmen.

Der Schnitt b zeigt den Indigoeffekt. Durch die Blaufärbung ist die Anwesenheit von Glucosidase in zerstreuten Zellen des Marks zu erkennen. Das fertige dichte Holz ist frei von Glucosidase, jedoch ragen glucosidasehaltige Markstrahlen mehr oder weniger tief von außen hinein. Die Hauptmenge der Glucosidase wird zwischen dem fertig gebildeten Holz und dem Cambium gefunden. In der Rinde ist an den Orten der Verholzung ebenfalls Blaufärbung zu erkennen.

In verholzten Monocotyledonen, z. B. der Liliacee *Cordyline congesta*, ist an den verholzten Strängen gleichfalls Glucosidase nachweisbar. Bei vielen Dicotyledonen ist der Indigoeffekt ebenfalls wahrnehmbar. In manchen Fällen, z. B. bei Obstbäumen, tritt an seiner Stelle eine tiefe Braunfärbung auf, die den Indigoeffekt möglicherweise überdeckt. Hieran können andere Phenole, Catechine oder Gerbstoffe schuld sein oder auch ein Überschuß von aus Syringin entstandenem Sinapinalkohol. Wie schon erwähnt, ist das Laubholzlignin im wesentlichen aus zwei Komponenten zusammengesetzt: dehydriertem Coniferylalkohol und dehydriertem Sinapinalkohol. In vitro liefert Sinapinalkohol, für sich allein der Wirkung der Redoxasen ausgesetzt, kein Lignin, sondern eine tief-schwarzbraune Lösung. Ein äquimolares Gemisch der beiden Alkohole ergibt jedoch ohne jede Braunfärbung ein sehr schönes Mischpolymerisat, das vom Laubholzlignin nicht zu unterscheiden ist. Wenn daher ein Überschuß an Syringin vorhanden ist, so kann der hieraus freigesetzte überschüssige Sinapinalkohol eine die Indigofarbe überdeckende Braunfärbung verursachen.

### 3. Glucoside mit radioaktivem Kohlenstoff.

Um in den Mechanismus der Holzbildung in der lebenden Pflanze tiefer einzudringen, wurden folgende Glucoside synthetisiert:

D-Coniferin-carbinol- $^{14}\text{C}$  aus D-Glucose und Coniferylalkohol, in dem das endständige Kohlenstoffatom der Carbinolgruppe radioaktiv markiert ist.

L-Coniferin-carbinol- $^{14}\text{C}$  aus L-Glucose.

D-Glucovanillin-carbonyl- $^{14}\text{C}$  aus D-Glucose und Vanillin, in dem das Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe radioaktiv markiert ist.

L-Glucovanillin-carbonyl- $^{14}\text{C}$  aus L-Glucose.

Im folgenden sind die Glucoside radioaktives D- bzw. L-Coniferin und radioaktives D- bzw. L-Glucovanillin genannt<sup>1)</sup>.

In das in Verholzung begriffene Gewebe lebender Bäume eingebracht, sollte nach dem oben Gesagten

<sup>1)</sup> Die Synthese dieser Glucoside wird in den Chem. Ber. beschrieben (im Druck).

das radioaktive D-Coniferin durch die in der Verholungszone lokalisierte  $\beta$ -Glucosidase in Glucose und radioaktiven Coniferylalkohol zerlegt werden, der dann durch die Redoxasen zusammen mit dem aus der Pflanze stammenden inaktiven Coniferylalkohol zu Lignin verarbeitet werden sollte. Um eine durch Adsorption oder andere Effekte mögliche Vortäuschung eines echten Einbaues des D-Coniferins auszuschließen, wurde als physikalisch sich völlig gleich verhaltende Substanz das radioaktive L-Coniferin herangezogen. Es war zu erwarten, daß die Glucosidasen dieses Glucosid nicht zu spalten vermögen und es ungespalten gegen den Angriff der Redoxasen beständig sein würde. Die Radioaktivität sollte daher nach Zufuhr von L-Coniferin nicht im Holz fixiert werden, sondern wasserlöslich bleiben. Über das Verhalten von radioaktivem D-Glucovanillin in lebenden Pflanzen konnte nichts vorhergesagt werden, während für L-Glucovanillin ein dem L-Coniferin ähnliches Verhalten zu erwarten war.

#### 4. Verabreichung der radioaktiven Glucoside.

Um die genannten vier radioaktiven Glucoside jungen Fichtenbäumchen (*Picea excelsa*) zuzuführen, standen dreierlei Verfahren zur Verfügung:

a) *Implantierung.* Im zweiten oder dritten Jahrestrieb der bei allen Versuchen im Schatten stehenden vierjährigen Fichtenbäumchen wurde Mitte Mai ein etwa 2 cm langer senkrechter Schnitt durch die Rinde geführt. Einige Milligramm der radioaktiven Glucoside wurden unter die Rinde geschoben, worauf die Wunde sofort mit Baumwachs verklebt wurde. Die Bäumchen überstanden die Operation, abgesehen von der Wundkallusbildung, ohne äußeren Schaden; sie wurden Ende August bis September untersucht.

b) *Zufuhr durch die Nadeln.* Der Nachteil eines das Cambium verletzenden operativen Eingriffs in die Pflanze konnte auf folgende Weise vermieden werden: Es ist möglich, wäßrige Lösungen durch den Stumpf einer einzigen Nadel einzuführen, wenn eine genau passende Kapillare auf den Stumpf aufgesetzt und durch diese die gelöste Substanz zugeführt wird. Dieses Verfahren ist jedoch schwierig zu reproduzieren. Zweckmäßiger ist es, an der Spitze eines jungen Kurztriebs des Hauptsprosses oder eines Zweiges auf einer Länge von etwa 2 cm unter Wasser die Nadeln abzuschneiden, möglichst unter Schonung der Sproßknospe. Über dieses Stück des Kurztriebes stülpt man ein retortenförmiges kleines Glasgefäß und läßt den Trieb in die in dem Gefäß befindliche einzubringende Lösung (in Fig. 3 durch Dunkelfärbung sichtbar gemacht) eintauchen. Der Retortentubus wird an seiner Öffnung mitsamt dem darin liegenden Trieb mit Siliconfett abdichtet. Das Gefäß ist durch eine abgewinkelte, unten erweiterte Kapillare mit der Außenluft verbunden. Auf diese Weise wird die Verdunstung der Lösung und ihre Verdünnung durch Regenwasser verhindert. Die Geschwindigkeit, mit der dieser „Tauchtrieb“ eine Lösung aufnimmt, ist vom Wetter abhängig. Sie beträgt etwa 1 cm<sup>3</sup> in 1 bis 2 Tagen, später weniger. Die verwendete Sproßspitze stirbt im allgemeinen nicht ab. Da sie aber histologische Veränderungen zeigt, wurde der Tauchtrieb für keine der folgenden Untersuchungen verwendet. Der Weg der aufgenommenen Substanzen wurde durch Verwendung von Lösungen verschiedener, auch fluoreszierender

Farbstoffe verfolgt. Die Farbstoffe wanderten im angrenzenden Stamm oder Zweig in der Hauptsache zur Triebspitze hin und nur wenig in Richtung zur Wurzel. Nach etwa 2 Tagen waren die Farbstoffe über die oberhalb des Tauchtriebs liegenden Triebe und Zweige verteilt. Je nach der Art der verwendeten Farbstoffe überlebten die Bäumchen den Versuch oder starben nach 2 Wochen ab. Nach diesem Verfahren wurden den Fichtenbäumchen halbgesättigte wäßrige Lösungen der radioaktiven Glucoside zugeführt.

c) *Zufuhr durch die Wurzeln.* Zweijährige Fichten wurden einige Tage in Nährlösungen gehalten, die die radioaktiven Glucoside enthielten, und dann wieder in die Erde verpflanzt.

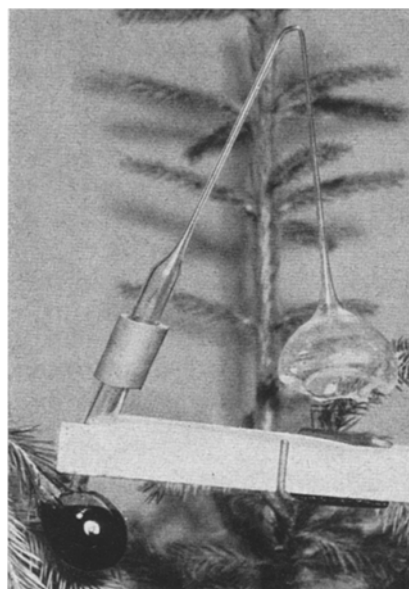


Fig. 3. Anordnung zur Einbringung von gelösten Substanzen durch einen Tauchtrieb. (Die Lösung im Glaskölbchen ist durch Dunkelfärbung sichtbar gemacht.)

#### 5. Technik der Versuchsauswertung.

Zur Lokalisierung der von den Bäumchen aufgenommenen radioaktiven Substanzen wurden Querschnitte der behandelten Zweige und Stämmchen angefertigt und Autoradiographien nach dem stripping-Verfahren (Abziehfilmverfahren) mit Kodac autoradiographic plates hergestellt. Die histologischen Schnitte lagen vor der Herstellung der Aufnahmen einen Tag in Alkohol und einen Tag in Wasser, so daß lösliche Bestandteile (nämlich die unveränderten Glucoside) entfernt sein mußten. Die auf Objektträger geklebten Schnitte wurden mit einer photographischen Schicht belegt und je nach der Intensität der von ihnen ausgesandten Strahlung einige Tage bis Wochen im Dunkeln in einer trockenen Atmosphäre aufbewahrt. Nach dieser Zeit wurden sie entwickelt. Die photographische Emulsion blieb dauernd auf dem Schnitt liegen, so daß durch mikroskopische Betrachtung und Photographie sowohl die durch die <sup>14</sup>C-Strahlung geschwärzte Schicht als auch der darunter liegende Holzschnitt zu sehen war. Damit war eine eindeutige Lokalisierung der radioaktiven Substanz möglich.

Nur von den mit den D-Glucosiden behandelten Bäumchen wurden Autoradiographien angefertigt, da, wie weiter unten beschrieben wird, bei Verwendung der L-Glucoside die radioaktiven Substanzen wasser-

löslich blieben und daher während der Präparation aus den histologischen Schnitten herausgelöst wurden.

Der Weg der aufgenommenen radioaktiven Substanzen konnte bei Verwendung genügend hoch aktiver Präparate (etwa 1 mC/mMol) unmittelbar mit einem Endfensterzählrohr verfolgt werden. Ein genaueres Bild von der Verteilung der Radioaktivität erhält man, wenn man die Pflanzenteile nicht mit dem Endfensterzählrohr abstastet, sondern den in Nadeln und Holz enthaltenen Kohlenstoff nach einem Naßverbrennungsverfahren in Bariumcarbonat überführt und dieses in das Innere eines fensterlosen Zählrohres bringt. Genaue quantitative Angaben über den relativen Gehalt der einzelnen Pflanzenteile an radioaktivem Kohlenstoff sind allerdings auch auf diesem Wege nicht möglich, da infolge der unterschiedlichen Masse von Nadeln und Holz das durch die Verbrennung erzeugte radioaktive Kohlendioxyd in wechselndem, unbekanntem Verhältnis durch das mit entstehende nicht-radioaktive Kohlendioxyd verdünnt wird.

#### 6. Ergebnisse der Versuche mit den radioaktiven Glucosiden<sup>1)</sup>.

##### A. Versuche mit radioaktivem D- bzw. L-Coniferin.

Ein Depot von einigen Milligramm radioaktivem D-Coniferin wurde Mitte Mai auf die beschriebene Weise unter der Rinde von Stämmchen vierjähriger Fichtenbäumchen angelegt. Im August und September wurden die behandelten Bäumchen untersucht. Dabei ergab sich, daß sich die radioaktive Substanz einige Zentimeter aufwärts und abwärts des Depots verteilt hatte. Die Radioaktivität war auf der Seite des Einschnitts stärker als auf der abgewandten Seite, und das wasserlösliche Glucosid war nicht mehr vorhanden. Etwa ein Drittel des radioaktiven Materials befand sich in der Rinde (in der sich gleichfalls verholzte Zellen vorfinden), während im Holz etwa zwei Drittel in Form einer wenige Zellen breiten radioaktiven Zone vorhanden waren. Aus der Breite dieser Zone ergibt sich, daß das radioaktive Material innerhalb von 14 Tagen in die Wände der in Verholzung begriffenen Zellen eingelagert worden ist. Über der radioaktiven Zone waren wieder gewöhnliche Zellen angelegt worden. Über 90% der radioaktiven Substanz des Holzes hatten die gleichen Löslichkeitseigenschaften wie Lignin und blieben bei der Aufarbeitung des Holzes in der Ligninfraktion. Der aus diesem Lignin in der gewöhnlichen Weise abgespaltene Formaldehyd war erwartungsgemäß radioaktiv. Aus dem eingebrachten radioaktiven D-Coniferin waren also höhermolekulare Umwandlungsprodukte des radioaktiven Coniferylalkohols entstanden.

An der Operationsstelle war das mikroskopische Bild der Querschnitte durch nekrotische Erscheinungen gestört, die jedoch nicht durch die Radioaktivität verursacht waren, denn ein Versuch mit gewöhnlichem D-Coniferin ergab dasselbe Bild.

Die in den ersten Tagen nach dem operativen Eingriff gebildeten Zellen besaßen besonders dicke Mem-

branen. Bei Verabreichung von (radioaktivem oder inaktivem) D-Coniferin waren Membrandicken vom etwa dreifachen Wert der Normaldicke zu beobachten, während nach der Implantierung von L-Coniferin, D- und L-Glucovanillin sowie von Glaswolle (als chemisch und biologisch indifferenter Vergleichssubstanz) die Membranen etwa doppelt so dick waren wie im ungestört gewachsenen Holz. Im Falle des D-Coniferins entsprach die Zone maximaler Radioaktivität der Zone maximaler Membrandicke. Die anschließend gewachsenen und nicht mehr radioaktiven Zellen besaßen wieder Membranen von normaler Dicke. Die Bildung von Membranen mit abnormer Dicke wurde nur beobachtet, wenn die radioaktiven Glucoside nach der Implantierungstechnik eingeführt worden waren.

An dünnen Schnitten, die in genügender Entfernung von der Wundstelle quer zum Stamm entnommen wurden, konnte durch Autoradiographie die Lage der zerfallenden <sup>14</sup>C-Atome in der Zelle angenähert ermittelt werden. In der dem histologischen Schnitt unmittelbar anliegenden Ebene der photographischen Emulsion lagen die gebildeten Silberkörner über den Zellmembranen. Ein Teil der Schwärzungspunkte gehörte Elektronenspuren an. Verfolgte man diese bis an ihren Ausgangspunkt in der der Zelle unmittelbar aufliegenden Ebene der Emulsion, so konnte festgestellt werden, daß sie meist über der Mittellamelle begannen. Da die Mittellamelle überhaupt ein Gebiet besonders intensiver Strahlung darstellte, ist damit gezeigt, daß das D-Coniferin bevorzugt hier eingebaut wird.

L-Coniferin bleibt unter den gleichen Versuchsbedingungen wasserlöslich. Es wird demnach nicht in das Holz eingebaut, breitet sich aber auch nur wenige Zentimeter oberhalb und unterhalb der Operationstelle aus.

Führt man 2- bis 3jährigen Fichten halbgesättigte wäßrige Lösungen von D- bzw. L-Coniferin durch einen „Tauchtrieb“ zu, so verteilt sich die Radioaktivität von der Abzweigungsstelle dieses Kurztriebes aus aufwärts in der Pflanze, nicht aber gegen die Wurzel zu. Gehört der Tauchtrieb einem Zweig an, so gelangt das radioaktive Coniferin in die oberhalb des Tauchtriebes befindlichen Zweige und verbreitet sich auch hier nicht nach unten. Es hat den Anschein, daß das D-Coniferin nicht so weit wandert wie das L-Coniferin. Die Ausbreitung der radioaktiven Verbindungen erfolgt rasch; so kann bei zweijährigen Fichten die Radioaktivität bereits nach wenigen Stunden in der 20 cm entfernten Spitze nachgewiesen werden.

Nach Applikation von D-Coniferin findet man den größten Teil der Radioaktivität im Holz, einen kleineren Teil in der Rinde (zusammen etwa 60%), während 40% in den Nadeln enthalten sind. Bei Anwendung von L-Coniferin ist das Bild völlig anders: Im Holz findet sich keine Radioaktivität, in der Rinde etwa 10% und in den Nadeln etwa 90%. Das L-Coniferin bleibt wasserlöslich, während D-Coniferin wasserunlöslich wird und im Querschnitt des Stämmchens in sehr charakteristischer Weise lokalisiert ist.

Fig. 4 zeigt die Autoradiographie eines Querschnitts durch einen einjährigen Sproß dicht oberhalb der Einmündung des Tauchtriebs nach der Zufuhr von radioaktivem D-Coniferin. Auf die normalen Frühjahrszellen des Holzes, die kreisförmig um das

<sup>1)</sup> Vorläufiger Bericht: FREUDENBERG, K., u. F. BITTNER: Chem. Ber. 86, 155 (1953). — FREUDENBERG, K., M. REICHERT u. L. KNOF: Naturwiss. 41, 231 (1954). — FREUDENBERG, K., H. REZNIK, W. FUCHS u. M. REICHERT: Angew. Chem. 66, 109 (1954); in der 16. Zeile von unten befindet sich ein sinnstörender Druckfehler. Es soll heißen: „Darüber wuchs im Laufe des Sommers nicht-radioaktives Holz.“ Die Angabe, daß Coniferylalkohol und Vanillin bei der gemeinsamen Dehydrierung ein Mischpolymerisat liefern, trifft nicht zu.

(teilweise zerrissene) Mark liegen, folgt eine durch Schwärzung kenntliche Zone von 6 bis 10 Zellen, die radioaktives Material enthalten. Darüber liegen etwa 10 Reihen später gebildeter nicht-radioaktiver Holz-zellen. Außerhalb des Cambiums folgen teilweise zerrissene Stellen der Rinde, in deren äußerem Teil wieder radioaktive Zellen durch ihre Schwärzung sichtbar sind. Es handelt sich hierbei um verholzte Sclerenchymzellen (Hartbastfasern). Die Radioaktivität wird dort gefunden, wo sich zur Zeit des Versuchs die Glucosidase befand. Dieser mit radioaktivem D-Coniferin ausgeführte Versuch zeigt, daß die radioaktive Substanz innerhalb weniger Tage nach der Zufuhr in das Holzgewebe eingebaut worden ist. Das radioaktive Material bleibt bei der Aufarbeitung nach seiner Löslichkeit und seinen chemischen Eigenschaften bei der Ligninfraktion.

Wäßrige Lösungen von D- und L-Coniferin wurden auch durch die Wurzeln in Fichtenbäumchen eingebracht. Als Vergleichssubstanz diente Natriumacetat- $^{14}\text{C}$ . Die Versuche konnten nur je mit einem, höchstens mit zwei Bäumchen ausgeführt werden. In allen Fällen war die Radioaktivität wenige Stunden nach Versuchsbeginn in den Nadeln der Sproßspitze nachzuweisen. Der mit Natriumacetat behandelte Baum starb am nächsten Tage ab, die mit Coniferin behandelten Bäumchen überlebten den Versuch um 2 bis 3 Monate. Im Holz des Sprosses und der Wurzel war in keinem Fall ein dem radioaktiven Lignin ähnliches Material nachzuweisen. Offenbar läßt die Wurzel das Coniferin nicht unzerstört passieren.

*B. Versuche mit radioaktivem D- bzw. L-Glucovanillin.* Nach der Implantierungstechnik eingebrachtes radioaktives D-Glucovanillin wird vom Gewebe in derselben Weise wie das D-Coniferin resorbiert und in Produkte verwandelt, die in Wasser, Benzol und Alkohol unlöslich sind. Ob sie mit Lignin identisch sind, muß durch chemische Untersuchung entschieden werden. Der Einbau erfolgt ebenso wie beim D-Coniferin zum Teil in bereits differenzierte Tracheiden, die nicht älter als 12 Tage sind und deren Verholzung noch nicht abgeschlossen ist. Ein weiterer Anteil wird in jenen Tracheiden festgelegt, die in den ersten 2 Wochen nach der Applikation gebildet werden.

Die autoradiographische Untersuchung der mit D-Glucovanillin behandelten Bäumchen liefert dieselben Bilder wie die D-Coniferinautoradiographien. Die Strahlung ist jedoch auf eine noch enger begrenzte, höchstens 2 bis 4 Zellen breite Zone beschränkt. Die nach der Verwundung gebildeten Tracheiden schließen außen an die Aktivitätszone an und sind nicht mehr radioaktiv. Offensichtlich wird also das Depot von D-Glucovanillin rascher aufgebraucht, als dies beim D-Coniferin geschieht. Möglicherweise läßt sich diese Erscheinung durch die unterschiedliche Löslichkeit der beiden Verbindungen erklären [Glucovanillin löst sich zu etwa 7%, Coniferin nur zu 0,7% in Wasser (20°)], so daß es einleuchtend ist, wenn es rascher an den Ort weiterer Umwandlung gelangt.

Wenn man einem Fichtenzweig radioaktives D- bzw. L-Glucovanillin durch einen Tauchtrieb zuführt, läßt sich ein charakteristischer Unterschied in der Ausbreitung der beiden Glucoside über den Zweig feststellen: Im Falle des D-Glucosids ist die Strahlungsintensität und damit der Gehalt an Glucovanillin kurz nach der Einmündung des Tauchtriebs sowohl

im Holz als auch in den Nadeln am höchsten, um dann gegen die Triebspitze hin abzufallen. Mindestens 50%, sehr wahrscheinlich aber mehr, der radioaktiven Substanz befinden sich im Holz, und zwar in unlöslicher Form, der Rest in den Nadeln und der Rinde. Aus Nadeln und Rinde kann der weitaus größte Teil der in ihnen enthaltenen radioaktiven Substanz mit kaltem Wasser extrahiert und papierchromatographisch als Glucovanillin identifiziert werden. Freies radioaktives Vanillin tritt nicht auf, das Holz enthält keine löslichen radioaktiven Bestandteile.

Nach der Verabreichung von radioaktivem L-Glucovanillin nimmt die Strahlungsintensität von Holz

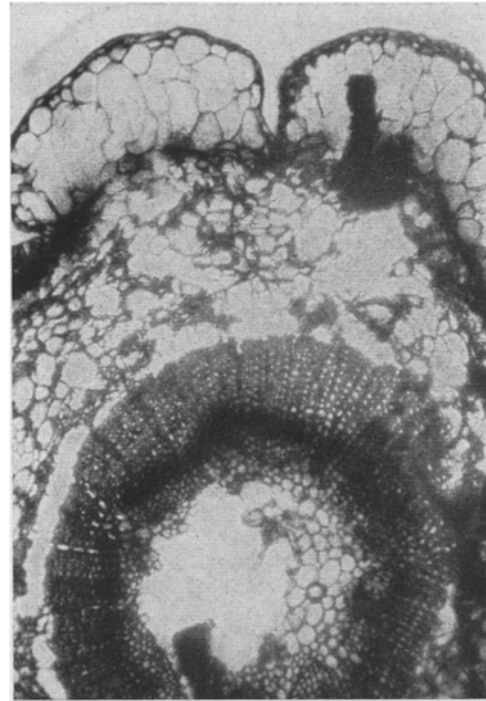


Fig. 4. Autoradiographie eines Querschnitts durch einen einjährigen Fichtensproß nach Gabe von radioaktivem D-Coniferin.

und Nadeln von der Mündung des Tauchtriebs zur Zweigspitze hin durchweg zu. Der weitaus überwiegende Teil der radioaktiven Substanz befindet sich in den Nadeln, viel weniger im Holz. Sowohl aus dem Holz als auch aus den Nadeln kann das unveränderte L-Glucovanillin durch kaltes Wasser vollständig extrahiert werden.

Die Fig. 5 zeigt die Autoradiographie eines Querschnitts durch einen zweijährigen Sproß in der Höhe der Einmündung des Tauchtriebes nach Verabreichung von radioaktivem D-Glucovanillin. Die radioaktive Lösung wurde am 4. und 5. Juni zugeführt. I ist die Jahresgrenze 1952/53. Über dieser liegen etwa acht Zellreihen Frühjahrsholz, die bis zu dem genannten Datum gebildet waren. Dann folgen von II bis III radioaktive Zellen, die sich wie im vorigen Bild weder durch ihre Größe noch durch die Dicke ihrer Zellwände von den nicht-radioaktiven Zellen unterscheiden. Daran anschließend folgt bis IV der Zuwachs gewöhnlichen Holzes in der Zeit bis Ende Juli 1953. Die Vergrößerung ist 100fach. Auch hier ist die radioaktive Substanz so fest eingebaut wie beim Versuch mit radioaktivem D-Coniferin. Die radioaktive Substanz wird bei Verwendung von D-Glucovanillin jedoch noch schneller und auf enger begrenztem Raume

eingebaut als im Falle des D-Coniferins. Eine mutmaßliche Begründung ist hierfür bereits oben angeführt worden.

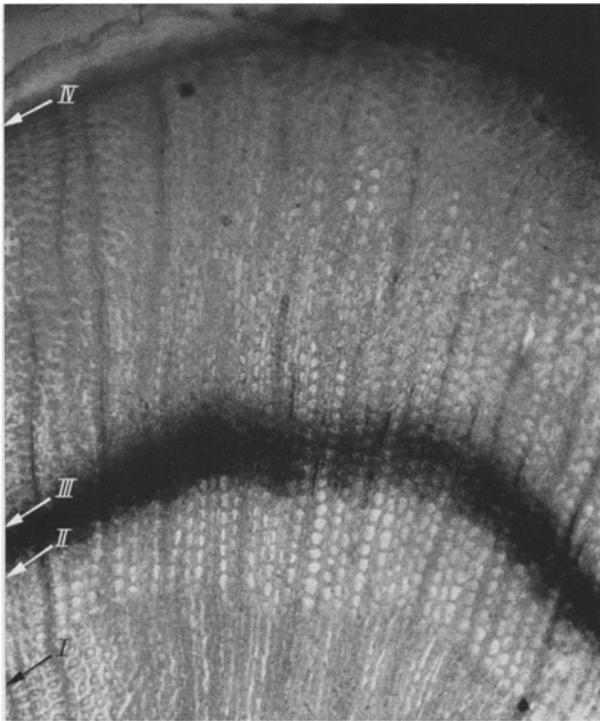


Fig. 5. Autoradiographie eines Sproßquerschnitts nach der Zufuhr von radioaktivem D-Glucovanillin, in Höhe der Mündung des Tauchtriebs geschnitten.

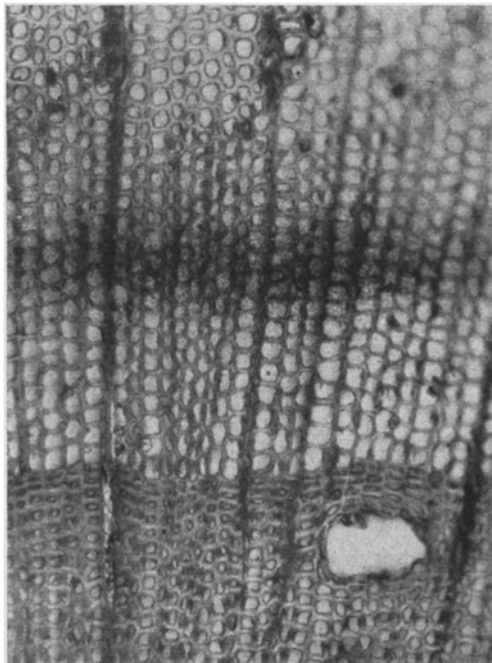


Fig. 6. Autoradiographie eines Querschnitts durch denselben Sproß wie Fig. 5, 20 mm oberhalb der Einmündung des Tauchtriebs. 180fach.

Auf der Autoradiographie eines Querschnitts vom selben Baum, 2 cm oberhalb der Tauchtrieb­mündung (Fig. 6), findet man die fünf radioaktiven Zellreihen an derselben Stelle, aber die Radioaktivität ist wesentlich schwächer. Aus der Verteilung der Radioaktivität in den Fig. 5 und 6 ist ersichtlich, daß das radio-

aktive D-Glucovanillin innerhalb von 8 bis 10 Tagen eingebaut worden ist.

In Fig. 7 ist die Autoradiographie eines Querschnitts durch einen einjährigen Sproß 10 mm von der Einmündung des Tauchtriebs entfernt wiedergegeben:

Dem Bäumchen war D-Glucovanillin zugeführt worden. Vergrößerung 180fach. Über die radioaktive Zone sind inaktive Zellreihen gewachsen (16 bis 18 Tracheiden je Radialreihe). Die Radioaktivität erscheint in den durch primäre Markstrahlen noch voneinander getrennten Xylemprimanen (Erstbildung der

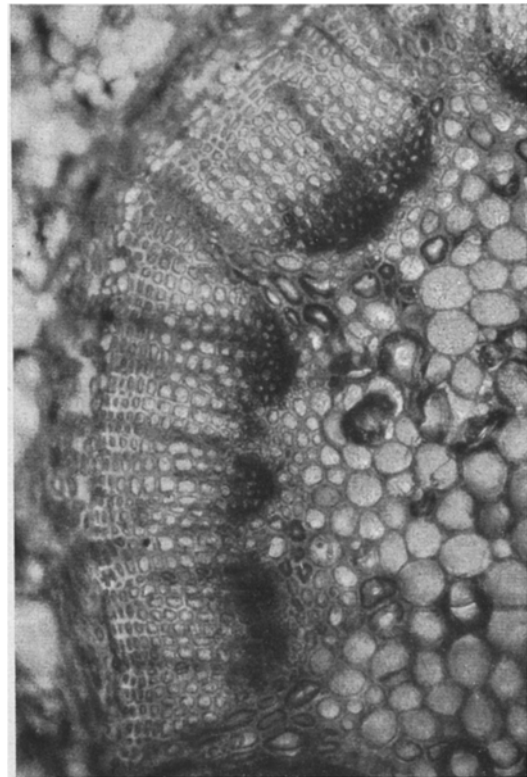


Fig. 7. Autoradiographie eines Querschnitts durch einen einjährigen Sproß nach der Zufuhr von radioaktivem D-Glucovanillin, 10 mm von der Einmündung des Tauchtriebs entfernt.

Holz­zellen), so daß sich das Bild eines oft unterbrochenen Schwärzungsrings an der dem Mark benachbarten Seite des Holzmantels ergibt. In radialer Richtung gerechnet ist die Radioaktivität auf 4 bis 5 Tracheiden beschränkt. Daraus ergibt sich wiederum, daß das radioaktive D-Glucovanillin innerhalb von 8 bis 10 Tagen eingebaut worden ist. Geringere, noch gut wahrnehmbare Schwärzungen sind in den inselartig verteilten Stein­zellen des Marks anzutreffen, wo ebenfalls Verholzung erfolgt. Auch die subepidermalen, auf dem Bilde nicht sichtbaren Sclerenchym­schichten der primären Rinde sind deutlich radioaktiv.

Um einen ersten Einblick in das Geschehen bei der Resorption von D-Glucovanillin zu erhalten, wurde ein Gemisch von Coniferylalkohol und radioaktivem Vanillin in der üblichen Weise (20°, pH 6, sehr verdünnte wäßrige Lösung) in vitro der Einwirkung von Dehydrasen ausgesetzt. Das ausfallende Kunstlignin (DHP) war nur aus dem Coniferylalkohol entstanden, der radioaktive Anteil blieb wasserlöslich und konnte papierchromatographisch als Vanillin identifiziert werden.

Damit ist gezeigt, daß der Einbau des D-Glucovanillins nicht einfach dadurch erklärt werden kann, daß das nach der Spaltung durch zellgebundene Glucosidase entstandene radioaktive Vanillin zusammen mit dem in der Pflanze gebildete Coniferylalkohol unter der Wirkung der Dehydrasen ein Mischpolymerisat bildet. Es muß vielmehr ein anderer, bis jetzt noch unbekannter Mechanismus ablaufen, über den erst weitere Untersuchungen Aufschluß bringen können. Eine naheliegende Deutung ist, daß das Glucovanillin zunächst zu Coniferin aufgebaut wird. Aber das ist nur eine Vermutung.

#### Zusammenfassung.

In dem in Verholzung begriffenen Gewebe befindet sich eine zellgebundene  $\beta$ -Glucosidase. Sie spaltet das dort vorkommende Glucosid D-Coniferin in Glucose

und Coniferylalkohol, der dann durch die gleichfalls anwesenden Redoxasen in Lignin verwandelt wird.

Radioaktives D-Coniferin und D-Glucovanillin wurde jungen Fichten verabreicht. In beiden Fällen wurde die radioaktive Substanz innerhalb weniger Tage in die zur Zeit des Versuchs in Verholzung begriffenen Zellen eingebaut. Im Gegensatz zu den D-Glucosiden wurden die L-Glucoside durch die Pflanze nicht verändert. Die Versuche mit radioaktivem Coniferin bestätigen die auf chemischem und mikroskopischem Wege gewonnenen Vorstellungen vom Verholzungsvorgang.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Treuhandstelle der Zellstoff- und Papierindustrie danken wir für die Unterstützung der Arbeit.

Aus dem Chemischen und dem Botanischen Institut der Universität und dem Institut für die Chemie des Holzes und der Polysaccharide in Heidelberg.

Eingegangen am 19. Juli 1954.

## Ionisierungsenergien von Atomen und Atomionen.

Von W. FINKELNBURG und W. HUMBACH, Erlangen.

Als Ionisierungsenergie (IE) eines Atoms oder Atomions bezeichnet man die Energie, welche zur Abtrennung des am schwächsten gebundenen Elektrons aus dem Grundzustand aufgewendet werden muß. Genaue Werte der IE auch höherer Ionisierungsstufen werden in der Physik, Astrophysik und Chemie in zunehmendem Maße benötigt. Die IE-Werte sind zwar für die überwiegende Mehrzahl der Atome und der einfach positiven Ionen (mit Ausnahme der Lanthaniden und Aktiniden) gut bekannt, für die höheren Ionisierungsstufen treten aber sehr bald erhebliche Lücken auf<sup>1)</sup>.

Die übliche Methode zur Bestimmung der IE geht davon aus, daß der Abstand einer Seriegrenze vom Grundzustand des Atoms, in Energieeinheiten [z. B. Elektronenvolt (eV)] ausgedrückt, unmittelbar gleich der IE ist. Zur Bestimmung dieses Abstandes benötigt man eine ausreichende Anzahl von Linien der Hauptserie — oder einer in ihrer Lage relativ zum Grundterm genau bekannten anderen Termserie —, aus denen durch Extrapolation die Seriegrenze bestimmt wird. Die Ermittlung einer solchen „spektroskopischen“ IE setzt also die Analyse des Spektrums des betreffenden Atoms oder Ions voraus. Wie Tabelle 1 zeigt, sind diese Voraussetzungen für die meisten Atome besonders in den höheren Ionisierungsstufen nur mangelhaft erfüllt, und sogar unter den als spektroskopisch bezeichneten IE gibt es viele Werte, welche als recht unsicher bezeichnet werden müssen. Zur Auffüllung dieser Lücken im System der spektroskopischen IE werden schon seit langem IE-Werte höherer Ionen aus empirischen Gesetzmäßigkeiten extrapoliert, die innerhalb der isoelektronischen Folgen existieren, also innerhalb der Folgen solcher Ionen, die mit einem bestimmten Atom die Elektronenzahl und -anordnung gemeinsam haben (z. B. die Folge Na, Mg<sup>+</sup>, Al<sup>++</sup>, Si<sup>+++</sup>, P<sup>++++</sup>, ...). So haben SLATER<sup>2)</sup>, EDLÉN<sup>3)</sup> u. a. in den Jahren nach 1930 die zwischen den Gliedern einer isoelektronischen Folge bestehenden Gesetze durch Formeln dargestellt und daraus die IE solcher Glieder bestimmt, deren Spektren noch nicht analysiert waren. Auf diese Weise hat besonders E. LISITZIN<sup>4)</sup> ein fast geschlossenes System von IE der Atome und ihrer Ionen aufgestellt, das heute allgemein verwendet wird, z. B. im „Taschenbuch für Chemiker und Physiker“ von J. D'ANS und E. LAX<sup>5)</sup>.

Wegen der inzwischen erfolgten Vermehrung und Verbesserung der als Fixpunkte verwendeten spektroskopischen IE hatten wir zunächst neben der Anwendung weiter unten noch zu besprechender eigener Methoden eine Revision der LISITZINschen Daten versucht, dabei aber gefunden, daß ihre Methode den heute zu stellenden Forderungen doch wohl nicht mehr ganz genügt. LISITZIN stellt die IE in einer isoelektronischen Folge durch eine Parabel zweiter Ordnung, also durch drei Parameter dar. Bei unserer Nachprüfung mit den neuen Werten ergab sich zunächst, daß die Parameter abweichend von LISITZIN innerhalb einer isoelektronischen Folge einen nicht vernachlässigbaren Gang mit der Ionisierungsstufe zeigen, wenn sie aus jeweils drei benachbarten IE einer Folge

berechnet werden. Darüber hinaus wurde gefunden, daß die Parameter außer bei den leichtesten Elementen mit einer recht erheblichen Unsicherheit belastet sind. Die von LISITZIN angewendete Inter- und Extrapolationssystematik scheint uns daher nicht ohne willkürliche Zusatzannahmen durchführbar.

Demgegenüber glauben wir, mit einer etwas abweichenden Methode bessere und sicherere Werte angeben zu können. Die Methode, nach der eine von uns<sup>6)</sup> schon früher eine Anzahl nachträglich spektroskopisch gut bestätigter IE bestimmen konnte, wird im folgenden kurz beschrieben, und die Ergebnisse von Rechnungen werden in einer Tabelle zusammengestellt.

Für das Wasserstoffatom und die mit ihm isoelektronischen Ionen (He<sup>+</sup>, Li<sup>++</sup> ...) ist die Abtrennarbeit eines im Zustand mit der Hauptquantenzahl  $n$  befindlichen Elektrons

$$E_i(n) = Z^2 R/n^2, \quad (1)$$

worin  $Z$  die aus dem Periodischen System bekannte Kernladungszahl und  $R$  die IE des H-Atoms von 13,595 eV bedeutet. Die IE in der mit dem Wasserstoff isoelektronischen Folge erhält man für die entsprechenden  $Z$  mit  $n = 1$ . Für ein beliebiges Atom oder Atomion im Grundzustand gilt die gleiche Formel, wenn man  $Z$  durch die auf das äußerste abzutrennende Elektron wirkende effektive Kernladung  $Z_{\text{eff}}$  ersetzt und für  $n$  die Hauptquantenzahl (Schalennummer) des abzutrennenden Elektrons (z. B.  $n = 3$  für Na) verwendet. Für alle Atome und Atomionen mit gut bekannten spektroskopischen IE kann man dann nach der entsprechenden Formel

$$Z_{\text{eff}} = n \sqrt{E_i/R} \quad (2)$$

ihre effektiven Kernladungszahlen ausrechnen und hieraus die Abschirmungszahlen

$$s = Z - Z_{\text{eff}} \quad (3)$$

und deren Zuwachs  $\Delta s$  beim Fortschreiten von einem Element zu dem ihm im Periodischen System folgenden bestimmen. Man findet, daß diese  $\Delta s$ -Werte in den Gruppen des Periodischen Systems und in den isoelektronischen Folgen jeweils einen regelmäßigen Gang aufweisen, der die Extrapolation unbekannter  $\Delta s$ -Werte und daraus die Bestimmung unbekannter IE erlaubt.

So kann man beispielsweise aus den  $\Delta s$ -Werten für die Alkaliatome Li, Na, K, Rb und Cs den  $\Delta s$ -Wert für das letzte Alkaliatom Francium extrapolieren und daraus nach Gl. (3) und (2) die unbekanntete IE des Fr berechnen. Eine Sicherung des Wertes für Fr ergibt sich daraus, daß mit der spektroskopischen IE für das vorhergehende Element Ra auch die Summe der  $\Delta s$ -Werte von Fr und Ra bekannt ist. Da aber der  $\Delta s$ -Wert des Ra durch Extrapolation längs der entsprechenden zweiten Gruppe des Periodischen Systems bestimmbar ist, erhält man für das Fr durch Berücksichtigung seiner Nachbarn einen unabhängigen Wert für  $s$  und damit für die extrapolierte IE.