

au glucose, soit au pyruvate, on n'observe aucune catalyse. De plus, en comparant les  $\text{QO}_2$  d' $\alpha$ -cétoglutarate, succinate et pyruvate à celui du citrate, il est difficile d'admettre ce cycle, même pour la dégradation du citrate. Cette hypothèse est encore appuyée par le fait que le malonate, qui inhibe l'oxydation du succinate par *Escherichia coli*, est sans action sur celle du citrate. Mais la preuve définitive de la non-existence d'un cycle tricarboxylique dans *Escherichia coli* utilisant le citrate ne pourra être apportée que lorsqu'on connaîtra tous les produits intermédiaires formés au cours de la dégradation de ce substrat.

Nous remercions Monsieur le Professeur E. AUBEL pour l'intérêt qu'il a bien voulu prendre à notre travail.

J. SZULMAJSTER, MARIANNE GRUNBERG-MANAGO  
et COLETTE DELAVIER

Institut de biologie physico-chimique, Paris, le 10 octobre 1951.

#### Summary

The utilisation of citrate by *Escherichia coli* depends on adaptation. Even adapted bacteria do not seem to split glucose by way of the tricarboxylic cycle.

### Ersatz von $\beta$ -Indol-Essigsäure im $\beta$ -Karotin-Test durch Vitamin E (DL- $\alpha$ -Tocopherol) und Vitamin K (Roche 1-6722)

*Der  $\beta$ -Karotin-Test als qualitatives Nachweisverfahren für Wuchsstoffe*

Eine Reihe bekannter Prüfverfahren, wie zum Beispiel der Avenatest, erlauben es,  $\beta$ -Indol-Essigsäure (Heterauxin) auf biologischem Wege nachzuweisen. Eine neue Methode zur qualitativen Bestimmung von Wuchsstoffen stellt der  $\beta$ -Karotin-Test dar, der bei Untersuchungen über die Wirkung von Karotinoïden auf die Pollenkeimung von *Cyclamen persicum* Mill. aufgefunden wurde<sup>1</sup>.

$\beta$ -Karotin hemmt bis zu Verdünnungen von  $10^{-6}$  Gewichtsteilen die Keimung von Zylamenblütenstaub. Der hemmende Einfluß des  $\beta$ -Karotins kann durch die Zugabe von Heterauxin aufgehoben und in eine Förderwirkung umgewandelt werden. Dieser Effekt der  $\beta$ -Indol-Essigsäure ist um so auffälliger, als diese Substanz für sich allein im geprüften Konzentrationsbereich von 0,001 mg/l bis 1000 mg/l keine Wirkung auf die Keimung von Zylamenpollen ausübt, was im Widerspruch zu Feststellungen früherer Autoren steht, die bei Untersuchungen an Pollen anderer Pflanzenarten einen stimulierenden Einfluß des Heterauxins nachweisen konnten<sup>2</sup>.

Die Versuchstechnik soll in einer späteren Arbeit beschrieben werden; es sei nur darauf hingewiesen, daß zur Prüfung von fett- und wasserlöslichen Stoffen verschiedene Verfahren entwickelt wurden.

#### Die Prüfung von Vitamin E und Vitamin K im $\beta$ -Karotin-Test

Vitamin E wurde viermal, Vitamin K zweimal im  $\beta$ -Karotin-Test untersucht. Im folgenden sind die Re-

sultate je eines Versuches wiedergegeben; außerdem wird zum Vergleich ein Versuch mit Heterauxin angeführt.

Der  $\beta$ -Karotin-Test umfaßt drei Kontroll- und eine Versuchsserie. In der ersten Kontrollserie (als Kontrolle I bezeichnet) wird die Keimfähigkeit des verwendeten Pollens unter den gewählten Versuchsbedingungen bestimmt; in Kontrolle II untersucht man die Testsubstanz für sich allein auf ihre Wirkung in der Pollenkeimung; Kontrolle III prüft die angewendete Lösung von  $\beta$ -Karotin auf ihre hemmende Wirkung. In der Versuchsserie werden die Lösungen der Testsubstanz und des  $\beta$ -Karotins im gewünschten Mischungsverhältnis kombiniert.

Die Versuchsergebnisse wurden nach dem *t*-Test von R. A. FISHER statistisch bearbeitet<sup>1</sup>.

Bei dem Versuch mit  $\beta$ -Indol-Essigsäure handelt es sich um die Modellreaktion für den  $\beta$ -Karotin-Test; unter dem Einfluß von Heterauxin wird die Hemmwirkung des  $\beta$ -Karotins aufgehoben und in einen fördernden Einfluß umgewandelt, wobei  $\beta$ -Indol-Essigsäure allein die Keimung von Zylamenpollen nicht beeinflußt.

DL- $\alpha$ -Tocopherol wirkt als Hemmstoff auf die Keimung von Zylamenpollen. Aus Vorversuchen ergab sich, daß bei Verdünnung von 1:10<sup>6</sup> die Wirkungsschwelle noch nicht erreicht war. Bringt man Vitamin E mit  $\beta$ -Karotin zusammen, so liegt die Keimrate beträchtlich über den Werten der entsprechenden Kontrollen; die partielle Aufhebung der Hemmung des  $\beta$ -Karotins durch Vitamin E ist mit einer Wahrscheinlichkeit von  $P \ll 0,001$  gesichert.

Vitamin K wirkt in der untersuchten Konzentration von 1:200 für sich allein indifferent auf die Keimung von Zylamenpollen, vermag jedoch wie das Heterauxin den hemmenden Einfluß des  $\beta$ -Karotins in eine Förderwirkung umzuwandeln. Um eine Zerstörung des Vitamins K durch Licht zu verhindern, wurden die Versuche in verdunkelten Thermostaten durchgeführt.

$\beta$ -Karotin wurde mir vom Chemischen Institut der Universität Zürich, Vitamin E und Vitamin K von der Firma F. Hoffmann-La Roche, Basel, zur Verfügung gestellt. Beiden Stellen spreche ich meinen verbindlichen Dank aus.

F. H. SCHWARZENBACH

Institut für Allgemeine Botanik der Universität Zürich, den 28. Oktober 1951.

#### Résumé

Le carotène  $\beta$  empêche la germination des grains de pollen de *Cyclamen persicum* Mill. Il est possible de transformer cet effet en une stimulation en ajoutant  $\beta$ -indole-acétique-acide (concentration 50 mg/l). La substance elle-même n'a aucune influence sur la germination du pollen.

Cet effet nous permet de déterminer des auxines qualitativement (test du carotène  $\beta$ ). Par cette méthode on a prouvé que la vitamine E (DL- $\alpha$ -tocophérol) et la vitamine K (Roche 1-6722) peuvent remplacer IAA. La substance DL- $\alpha$ -tocophérol empêche la germination du pollen de *Cyclamen persicum*, la vitamine K n'a aucune influence.

<sup>1</sup> F. H. SCHWARZENBACH, Helv. chim. acta 34, 1064 (1951).

<sup>2</sup> TSUNG-LE LOO und TSUNG-CHEN HWANG, Amer. J. Botany 31, 356 (1944).

<sup>1</sup> Vgl. A. LINDER, *Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure* (Verlag Birkhäuser, Basel 1948 und 1951).

## Erklärung der in den Tabellen verwendeten Symbole:

*n* Anzahl der parallelen Einzelversuche pro Serie. In jedem Einzelversuch wurden  $6 \times 50$  Pollenkörner ausgezählt.

Prozent Keimrate, als arithmetisches Mittel aus den *n* Einzelversuchen bestimmt.

I, H, F, Symbole zur Bezeichnung der Wirkung: I = Indifferenz, H = Hemmung, F = Förderung.

(F,H)\*\* Abweichung statistisch stark gesichert,  $0,01 \geq P > 0,001$ .

(F,H)\*\*\* Abweichung statistisch sehr stark gesichert,  $P \leq 0,001$ . *β-Indolyl-Essigsäure*.

	<i>n</i>	Prozent	Vergleich mit Kontrolle		
			I	II	III
Kontrolle I: Keimfähigkeit . . . . .	9	21,59			
Kontrolle II: Heterauxin 50 mg/l . . . . .	8	23,42	I	H***	
Kontrolle III: $\beta$ -Karotin 1:1000 . . . . .	8	13,34		H***	
Versuch: Heterauxin + $\beta$ -Karotin, Lösungen gemischt im Verhältnis 1:1 . . . . .	9	26,70	F**	F**	F***

DL- $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E)

	<i>n</i>	Prozent	Vergleich mit Kontrolle		
			I	II	III
Kontrolle I: Keimfähigkeit . . . . .	6	18,39			
Kontrolle II: Vitamin E 1:2000 . . . . .	8	5,42	H***		
Kontrolle III: $\beta$ -Karotin 1:2000 . . . . .	8	5,54	H***		
Versuch: Vitamin E + $\beta$ -Karotin, Lösungen gemischt im Verhältnis 1:1 . . . . .	8	12,83	H***	F***	F***

## Vitamin K (Präparat Roche 1-6722)

	<i>n</i>	Prozent	Vergleich mit Kontrolle		
			I	II	III
Kontrolle I: Keimfähigkeit . . . . .	8	14,00			
Kontrolle II: Vitamin K 1:200 . . . . .	8	14,00	I		
Kontrolle III: $\beta$ -Karotin 1:2000 . . . . .	7	7,19	H***	H***	
Versuch: Vitamin K + $\beta$ -Karotin, Lösungen gemischt im Verhältnis 1:1 . . . . .	8	19,04	F**	F**	F***

The Pigment Granules of the Egg and Embryo of the Sea-Urchin *Paracentrotus lividus*

Previous observations have provided evidence that the carotenoid pigments of the egg of the sea-urchin *Paracentrotus lividus* are subject to changes during early development, thus suggesting that they may be involved in some morphogenetic process<sup>1</sup>. Since in the egg and in the cells of the embryo the pigments are located in small granules, it seemed worth while to try and get an insight into their chemical composition.

It has already been observed<sup>2</sup> that the carotenoids of the egg of *Paracentrotus* cannot be extracted with petroleum ether unless the eggs are first treated with alcohol. This observation has led to the suggestion that the carotenoids in the granules must be conjugated. The results of the analyses described in this paper show that the granules consist of a chromoprotein of a rather complex composition.

The pigment granules of eggs and embryos were isolated from homogenates in 1.5 M sucrose in 0.02 M Na-citrate. When the homogenates were centrifuged at

high speed (using the high-speed attachment of the Int. Refrigerated Centrifuge) the pigment granules, together with fat, yolk granules and mitochondria, formed a thick red pellet on top of the homogenate. The pellet was easily collected with a spatula, resuspended in 1.5 M sucrose and re-centrifuged. After a second washing, the pellet was taken up in 0.25 M sucrose in which the granules dissolved. A further centrifugation at high speed resulted in the separation of a clear supernatant (in order to get rid of the free fats in suspension some distilled water was layered on top of the solution before centrifugation) and a small sediment consisting of mitochondria, some unidentified granules and some pigment granules. Indeed it has constantly been noted that there is a fraction of pigment granules which does not dissolve under such conditions. All attempts to bring them into solution have so far failed. This seems to suggest that there are at least two different categories of granules in the egg. This point will be the subject of further consideration. The solution of the pigment granules in sucrose was dialysed against distilled water or buffer and submitted to analysis. All the operations so far described were carried out in a cold room at +3°C.

The solution of the pigment granules was frozen-dried before being submitted to chemical analysis. This showed that about 30% of the dry weight consists of material extractable with 3:1 hot alcohol-ether at 70°C.

<sup>1</sup> A. MONROY, A. MONROY ODDO, and M. DE NICOLA, Exper. Cell. Res. (in press).

<sup>2</sup> M. DE NICOLA and A. MONROY ODDO (in preparation).