

Figure 3 shows a thin section through an OsO_4 -fixed chloroplast of tulip prepared by standard methods (Minot rotary microtome, glass knife; *n*-butyl-methacrylate embedding). Many lens-shaped, regularly laminated areas corresponding to the grana can be observed. The structure of the section agrees well with a scheme proposed by FREY-WYSSLING¹. However it is not yet possible to decide whether or not the so-called "carrier lamellae" are present by which the grana are supposed to be attached². Further improvements in sectioning technique are necessary to settle this question.

By treating OsO_4 -fixed granular chloroplasts with sonic oscillation (10 kc.), a suspension of circular lamellae of the diameter of a granum is obtained (Fig. 4 and 5). The thickness of these lamellae, about 70 Å, is in good agreement with the thickness of layers of similarly prepared algal chloroplasts.

We consider the circular lamellae as the structural units of a granum. A stack of such layers forming a cylinder composes the granum.

I wish to express my deep gratitude for the opportunity to carry out this work under the guidance and in the laboratory of Professor FRANCIS O. SCHMITT.

E. STEINMANN³

Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge 39, Mass., February 10, 1952.

Zusammenfassung

Es wird darauf hingewiesen, dass die an Chloroplasten zu beobachtenden Quellungserscheinungen auf keine wohldefinierte Chloroplastenmembran schliessen lassen. Durch Herstellung dünner Schnitte und durch Ultraschallbehandlung OsO_4 -fixierter Chloroplasten kann gezeigt werden, dass die Granen aus Schichten aufgebaut sind.

¹ A. FREY-WYSSLING, *Protoplasma* 29, 279 (1937).

² S. STRUGGER, *Ber. dtsch. bot. Ges.* 64, 69 (1951).

³ Present address: Pflanzenbiologisches Institut der ETH., Zürich, Switzerland.

The Occurrence of Melanin and Phenolases in *Holothuria forskali* Delle Chiaje

Recent investigations by the author¹ have shown that the echinoderms *Diadema antillarum* Philippi, and *Thyone briareus* Le Sueur, contain an amorphous granular pigment characterized by insolubility in a wide range of solvents, bleaching when subjected to oxidizing agents, and by the capacity to reduce ammoniacal silver nitrate under certain conditions (see LISON²).

The abundant, readily obtained black pigment in the body wall of *Holothuria forskali* also shows these properties, being but slightly soluble in water, pyridine, 1.0 *N* hydrochloric acid and 0.5 *N* sodium hydroxide, and insoluble in ethanol, acetone, benzene, ether, petrol ether, chloroform and carbon disulphide at room temperatures. It is bleached by chlorine, bromine, hydrogen peroxide, chromic acid, potassium permanganate and oxalic acid, and will reduce directly ammoniacal silver nitrate. Such properties are characteristic of melanin³, and these find-

ings strengthen earlier indications of its occurrence in this and other echinoderms¹.

As in *Diadema* and *Thyone*², coelomic fluid exposed to air *in vitro* forms a clot which darkens due to the formation within it of a black or brown pigment. In both *Holothuria* and *Diadema*, under microscopic examination, this can be seen to be due to the development of a yellow to dark brown colour in spheroidal cytoplasmic inclusions of the coelomic amoebocytes. Black or brown pigment granules also frequently appear at the periphery of the spheroids, and *in vitro* the pigment is eventually liberated by disintegration of the amoebocytes, with the formation (in *Holothuria*) of a dense reticulum of chocolate-brown pigment. This at once recalls the appearance and apparent mode of origin, of the skin pigment³.

Since it has been shown in *Diadema*⁴, that the colouring of the clot involves the action of phenolases which are present in the coelomic amoebocytes, it is highly significant that the existence of such enzymes can be clearly shown in *Holothuria*. Coelomic fluid, exposed to air and incubated at 24°C with buffered substrates (pH 6.5–7.3) such as "dopa", cresol (mixed isomers) and glycine, pyrocatechol and pyrogallol, readily yielded coloured oxidation products, provided that a detergent such as saponin or "cetavlon" was added to the mixture. L-tyrosine is blackened within 3 h, but oxidation of this and pyrocatechol, is inhibited completely by boiling, and strongly by 0.0002 *M* potassium cyanide at pH 7.3. The oxidation appeared unaffected by acetone, and 0.002 *M* sodium azide at pH 7.3. Thus the oxidations involve both mono- and poly-phenolases and are not attributable to cytochrome-oxidase⁵. It must be noted, however, that they appear unaffected by 0.001 *M* thiourea at pH 6.5 and but little by ultra-violet irradiation.

The enzyme system is associated with the coelomic amoebocytes and is not present in the fluid *per se*, a fact which is most suggestive when it is borne in mind that it is in the amoebocytes that granular brown or black pigment appears in relation with the spheroids. It is also noteworthy that, whereas in *Diadema* a heat-labile factor inhibiting pigment production exists in the coelomic fluid⁴, I have found no evidence of such a factor in *Holothuria*.

The precise relation between the phenolases and colouring of the spheroidal inclusions of the amoebocytes awaits further investigation, but it may be noted that in *Diadema*⁴, pigment produced in the clot has been shown to possess the characteristics of melanin, and its production is influenced by the same factors as those which affect phenolases.

A full account of the work will be published elsewhere. My thanks are due to the Director and staff of the Plymouth Station of the Marine Biological Association of the United Kingdom where the work was carried out.

N. MILLOTT

Department of Zoology, University College of the West Indies, Jamaica B.W. 1, March 26, 1952.

¹ M. A. BRIOT, *C. r. Soc. Biol.* 60, 1156 (1906). – L. CORNIL, M. MOSINGER, and M. CALEN, *C. r. Soc. Biol.* 119, 106 (1935).

² N. MILLOTT, *Biol. Bull.* 99, 343 (1950). – N. MILLOTT and F. W. JACOBSON, *Nature* 168, 878 (1951).

³ L. CORNIL, M. MOSINGER, and M. CALEN, *C. r. Soc. Biol.* 119, 106 (1935).

⁴ N. MILLOTT and F. W. JACOBSON, *Nature* 168, 878 (1951).

⁵ D. KEILIN, *Proc. roy. Soc. [B]* 121, 165 (1936). – D. KEILIN and E. F. HARTREE, *Proc. roy. Soc. [B]* 125, 171 (1938).

¹ N. MILLOTT, *Biol. Bull.* 99, 329, 343 (1950). – N. MILLOTT and F. W. JACOBSON, *J. Invest. Dermat.* 18, 91 (1952).

² L. LISON, *Histochimie animale* (Gauthier-Villars, Paris 1936), p. 249.

³ L. LISON, *Histochimie animale* (Gauthier-Villars, Paris 1936), p. 249. – J. VERNE, *Les pigments dans l'organisme animal* (Gaston Doin, Paris 1926).

Zusammenfassung

Das Hautpigment von *Holothuria forskali* zeigt die Eigenschaften des Melanins. Das Pigment scheint auf dem Zerfall von Amöbozyten zu beruhen, die dieselben sind wie die Amöbozyten der Zömlflüssigkeit.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Amöbozyten ein Phenolasesystem besitzen. Das Koagulum, das durch Zusammenballung dieser Amöbozyten geformt wird, bräunt sich durch Luftzutritt infolge der Pigmentproduktion, die an die zytoplasmatischen Einschlusskörperchen gebunden ist.

Caroténoïdes et différenciation sexuelle chez *Allomyces*

Selon EMERSON et FOX¹, la différenciation des gamétanges mâles chez *Allomyces* s'accompagne d'une active et sélective synthèse de γ -carotène. Une telle spécificité d'association a suggéré à ces auteurs la possibilité d'une participation des caroténoïdes aux phénomènes sexuels chez *Allomyces*.

Dès nos premières recherches sur le pouvoir inhibiteur de la diphenylamine à l'égard de la caroténogenèse chez *Mycobacterium phlei*², nous avons pensé que l'emploi de cet inhibiteur pourrait fournir d'intéressantes informations sur la relation carotène-sexualité chez *Allomyces*. Des essais préliminaires nous avaient en effet montré que la production des caroténoïdes chez un autre Phycomycète, *Mucor hiemalis* (souche +) pouvait être fortement réduite avec 1/40 000 de diphenylamine³. GOODWIN⁴ a dès lors entrepris une série de recherches sur l'action différentielle de cet inhibiteur sur la genèse des divers polyènes de *Phycomyces blakesleeanus*.

Nous avons cultivé la phase sexuelle d'*Allomyces javanicus* (souche de KNIPE) sur milieu solide à base d'amidon et d'extrait de levure (EMERSON et FOX⁵), additionné de différentes concentrations de diphenylamine. Nous avons trouvé que 1/100 000 de cet inhibiteur suffit à empêcher toute apparition du pigment orange dans les gamétanges mâles. À l'examen microscopique, ces derniers ne se distinguent plus des gamétanges femelles que par leur taille plus réduite et leur position épigyne.

Il était dès lors intéressant de suivre l'évolution des processus sexuels chez cet *Allomyces* incolore. Nous avons pu constater microscopiquement que la libération des gamètes, tant mâles que femelles, a lieu de manière apparemment normale et avons pu observer plusieurs planozygotes biciliés incolores; ceux-ci n'ont pas tardé à germer avec la bipolarité normale rhizoïdes-hyphe principal. Un seul fait nous a frappé à chaque nouvelle observation du matériel inhibé: l'activité réduite des gamètes mâles incolores dont la mobilité est plus sporadique et de plus courte durée que celle des gamètes orange de la culture témoin. En revanche, aucune anomalie de comportement n'a pu être notée dans le cas des gamètes femelles provenant des cultures sur milieu diphenylamine.

Malgré cette réduction de l'activité motrice des gamètes mâles, l'évolution des processus sexuels chez *Allomyces* peut donc s'effectuer en l'absence, visuellement complète, de γ -carotène dans les gamétanges et gamètes

mâles. L'activité de traces de caroténoïdes (détectables par extraction acétonique de cultures inhibées) dans ces processus n'est toutefois pas exclue.

Parallèlement à ces premières observations, nous poursuivons une étude analytique des polyènes de l'*Allomyces*; les résultats en seront publiés prochainement.

Nous tenons à remercier le Comité suisse d'échange universitaire Suisse-U.S.A. grâce à l'intermédiaire duquel nous avons pu bénéficier d'un Research Fellowship à la Johns Hopkins University.

Nous exprimons notre reconnaissance à M. le professeur F. HAXO pour ses précieux conseils et les facilités de travail offertes par son laboratoire.

G. TURIAN¹

Institut de Biologie, Johns Hopkins University, Baltimore, U.S.A., le 2 mai 1952.

Summary

The inhibition by 1/100 000 diphenylamine of γ -carotene formation in the male gametangia of *Allomyces javanicus* is reported.

Such inhibition reduces the motility of the male gametes without preventing subsequent formation of planozygotes.

¹ Adresse actuelle: Petit-Lancy, Genève.

Hemmung der Gehirnatmung durch Alkylphosphate *in vitro*

Gestützt auf eine Anzahl von Untersuchungen, in denen sich kein Einfluss der Alkylphosphate DFP (Diisopropyl-Fluorophosphat) und Parathion (*p*-Nitrophenyl-Diäthyl-Thiophosphat) auf die Zellatmung des Gehirns und anderer Gewebe *in vitro* und *in vivo* nachweisen liess¹, wird heute allgemein angenommen, dass die toxische Wirkung dieser Substanzen allein auf der durch sie hervorgerufenen Hemmung der Cholinesteraseaktivität des Gehirns beruhe². Da jedoch auch eine Beobachtung über Hemmung der Atmung und Dehydraseaktivität des Froschgehirns durch DFP und TEPP (Tetra-Äthyl-Pyrophosphat) vorliegt³, könnte vielleicht eine systematische Untersuchung mit Alkylphosphaten eine gewisse, diesen Stoffen allgemein zukommende Wirkung auf die Gewebsatmung des Gehirns nachweisen.

Wir untersuchten zunächst die Alkylphosphate *Parathion*, *Pestox III* (Bis-bis-[Dimethylamino]-Phosphorsäureanhydrid), *Pestox X IV* (Bis-[Dimethylamino]-Fluorophosphinoxid) und *Pestox XV* (Bis-[Monoisopropylamino]-Fluorophosphinoxid) in ihrer Wirkung *in vitro* auf die Atmung von Gehirnschnitten vom Meerschweinchen. Die Gewebsatmung wurde mit der direkten Methode nach WARBURG in Krebs-Phosphatringer bestimmt, wobei der normale QO_2 für 1½ Stunden $8,57 \pm 1,16$ betrug. Es ergab sich, dass im Konzentrationsbereich 10^{-2} bis 10^{-4} m die genannten Verbindungen eine signifikante Hemmwirkung besitzen (Abb. 1), wobei die Aktivitätsreihe wie folgt verläuft: *Pestox XIV* > *Parathion* >

¹ R. EMERSON et D. L. FOX, Proc. roy. Soc. London [B] 128, 275 (1940).

² G. TURIAN, Helv. chim. acta 33, 1988 (1950).

³ G. TURIAN, Résultats non publiés (1950).

⁴ T. W. GOODWIN, Biochem. J. 49, 23 (1951); 50, 550 (1952).

⁵ R. EMERSON et D. L. FOX, Proc. roy. Soc. London [B] 128, 275 (1940).

¹ S. ELLIS, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 69, 363 (1948). – E. C. WEBB, Bioch. J. 42, 96 (1948). – K. P. DUBOIS, J. DOULL, R. P. SALERNO und J. M. COON, J. Pharmacol. exp. Ther. 95, 75 (1949).

² D. NACHMANSOHN, in: G. PINCUS und K. V. THIMANN, The Hormones (Academic Press, New York 1948).

³ V. B. BROOKS, R. E. RANSMEIER und R. W. GERARD, Amer. J. Physiol. 157, 299 (1949). – M. MICHAELIS, N. J. ARANGO und R. W. GERARD, Amer. J. Physiol. 157, 463 (1949).