

Inhibition of Thiamine Synthesis by Vitamin B₁₂ in Cultures of *E. coli*

Concentration of B ₁₂ added γ ml	24 h			48 h		
	Growth % Transmission	B ₁₂ content γ /ml	Reduction in synthesis %	Growth % Transmission	B ₁₂ content γ /ml	Reduction in synthesis %
0	64	0.0176	—	55	0.0320	—
0.01	64	0.0136	22.8	57	0.0256	20.0
0.1	65	0.0120	31.8	55	0.0235	26.6
0.5	65	0.0096	45.5	56	0.0200	37.5
1.0	63	0.0080	54.6	57	0.0144	55.0

old culture, growing on agar slants and adjusted to approximately 60% transmission in a Lumetron photoelectric colorimeter with red-filter (650 m μ). One drop of this suspension was added to each of the flasks. The flasks were then incubated at 30°C. Twelve ml of the culture was taken out aseptically from each flask after 24 and 48 h and the growth was measured in terms of percentage transmission in the Lumetron colorimeter. The culture was then centrifuged at 4000 rpm. for 20 min and the supernatant was assayed for thiamine by thiochrome method¹, measuring the fluorescence in a Lumetron Fluorimeter 402 E using the filter accessories for thiamine. Five ml samples in duplicate were taken for each estimation and the results are presented in the Table.

It is clear from the table that the addition of vitamin B₁₂ inhibits the biosynthesis of thiamine by *E. coli*. The more the vitamin added the less is the synthesis and excretion of thiamine in the medium. At 24 h the percentage decrease in the synthesis was 31.8 at 0.1 γ B₁₂ level and 54.6 at 1.0 γ level. There does not appear to be any appreciable difference in the inhibition of synthesis at 24 and 48 h, in spite of the fact that slight variations have been obtained between the two periods. It may also be pointed out here that the growth of *E. coli* was not affected by the presence of vitamin B₁₂ in the medium.

This phenomenon of the inhibition of thiamine synthesis is interesting, but no explanation seems to be possible at this stage. It may be that vitamin B₁₂ blocks in some way the biosynthesis of thiamine by this organism or that the requirement of thiamine is dispensed with in the presence of vitamin B₁₂ in the medium. It may also be possible that vitamin B₁₂ accelerates the utilization of thiamine by the cells or that the retention of thiamine may be increased by the presence of vitamin B₁₂ in the medium. Further work, especially on the thiamine content of the cells, now in progress, may elucidate the role played by vitamin B₁₂ in the thiamine metabolism, as far as this organism is concerned.

The authors' grateful thanks are due to Dr. D. L. SHRIVASTAVA, Deputy Director (Incharge Biochemistry) and Dr. B. MUKERJI, Director, Central Drug Research Institute, for their helpful guidance and keen interest in this work.

K. C. SAXENA, S. GHATAK, and
S. C. AGARWALA

Central Drug Research Institute Lucknow, India, July 15, 1954.

Zusammenfassung

Zusatz von Vitamin B₁₂ in Kulturnährböden hemmt die Thiamin-Biosynthese von frisch isolierten *E.-coli*-Stämmen. Diese Hemmung steht im Verhältnis zur zugesetzten Menge von Vitamin B₁₂.

¹ The Association of Vitamin Chemists, Inc., "Methods of Vitamin Assay", Inter Science Publishers, New York, N. Y. 1947, p. 73.

DISPUTANDUM

To the Question of Somatic Reduction Divisions in Sea Urchin Micromeres

Some time ago LINDAHL¹ has drawn attention to the resemblance of sea urchin micromeres to polar bodies and suggested that they might be the result of somatic reduction divisions. He consequently claimed that sections of *Paracentrotus lividus* and *Strongylocentrotus droebachiensis* embryos revealed the presence of haploid chromosome sets in the micromeres.

On the other hand, a photometric study of the desoxy-ribonucleic acid content of embryonic nuclei of *Lytechinus variegatus* by McMASTER² gave no indication of haploidy in micromeres or their descendants.

The present authors had an opportunity to investigate this matter during a visit of the senior author at the University of California, in March 1953. Chromosome counts were made on 32-cell embryos of *Strongylocentrotus purpuratus* obtained through the courtesy of Professor D. MAZIA. The material was fixed in 5% acetic acid, stained *in toto* with aceto-orcein-fast-green³ or by the Feulgen method and mounted whole without dehydration. In many cases most of the cells of one embryo were found to be in various stages of division but reductional groupings or haploid chromosome sets were never seen. Macromeres, mesomeres and micromeres in different regions of one embryo were found to possess each approximately 38–40 chromosomes at metaphase.

The senior author subsequently had the opportunity to reexamine cleavage stages of the Japanese sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* by the same methods. The diploid chromosome number of this species is 50⁴. Careful observations of micromere divisions from metaphase to anaphase in 16-cell to 32-cell stages were made. No reductional grouping or haploid chromosome number occurred in any of the cells that were studied. A detailed account of these observations will be published elsewhere by the senior author.

Without adding substantial new evidence, LINDAHL⁵ more recently published a somewhat fuller account of his views and expressed the opinion that somatic reduction of chromosomes in micromeres is a consequence of secondary pairing of chromosomes. In the present authors' opinion such secondary pairing is not a natural feature of sea urchin cleavage, but the result of acciden-

¹ P. E. LINDAHL, Nature 171, 437 (1953).

² R. McMASTER, Anat. Rec. 113 (4), 36 (1952).

³ N. B. KURNICK and H. RIS, Stain Tech. 23, 17 (1948).

⁴ S. MAKINO and H. NIYAMA, J. Fac. Hokkaido Univ. Ser. VI, Zool. 9, 225 (1947).

⁵ P. E. LINDAHL, Exp. Cell Res. 5, 416 (1953).

tal chromosome aggregation and crowding, induced by the excessive shrinkage which accompanies inadequate fixation.

S. MAKINO and M. ALFERT

Zoological Institute, Hokkaido University, Sapporo, Japan, and Department of Zoology, University of California, Berkeley, Calif., June 2, 1954.

Über den enzymatischen Zuckerumbau in Nektarien¹

Die Zuckersekretion extrafloraler und floraler Nektarien erfährt erst im Verlauf der letzten Jahrzehnte eine befriedigende physiologische Deutung². Sie erfolgt durch eine Stauung des Assimilationsstromes im Moment, da das entsprechende Organ sein Wachstum eben abgeschlossen hat, bei Blättern und Blüten zum Beispiel während oder unmittelbar nach der Entfaltung. Die Nektarien liegen immer an der Basis von Blüten- oder Laubblättern, mit deren Leitbündeln sie durch Phloemstränge verbunden sind³. Mit Hilfe einer ins Phloem eingeführten Pentose, die sich neben den üblichen Zuckern des Nektars papierchromatographisch leicht nachweisen lässt und für die Pflanze nicht giftig wirkt, konnte auch chemisch die Herkunft des Nektars aus den Siebröhren nachgewiesen werden⁴. In den floralen Nektarien von *Robinia Pseudacacia* erfolgt die Ausscheidung einer Transglucosidase⁵, die dem sezernierten Zuckersaft beigemischt wird. Der Phloemsaft enthält nämlich nur Saccharose als einzigen Zucker und zeigt keinerlei Invertaseaktivität⁶; im Moment, da die Sekretion beginnt, setzt jedoch ein Saccharoseabbau ein⁵.

Diese Untersuchungen sind auf die Nektarien von *Euphorbia pulcherrima* ausgedehnt worden. Verfolgt man den Verlauf der Zuckerausscheidung während der gesamten Sekretionsdauer einer einzelnen Honigdrüse, erhält man die in Abbildung 1 dargestellten Kurven. Die Messungen wurden gleichzeitig bei 6 verschiedenen Nektarien durchgeführt und die erhaltenen Werte gemittelt. Die pro Tag ausgeschiedene Zuckermenge steigt bis zu einem Maximum von 1 bis 1,5 mg am fünften Tag an und sinkt dann langsam wieder ab. Nach etwa 20 Tagen wird die Sekretion eingestellt.

Die Nektarausscheidung ist sehr stark von klimatischen und anderen Einflüssen⁷ abhängig. Aus diesem Grunde dürfen wir keinen allzu regelmässigen Verlauf der Kurven erwarten. Trotzdem ist deutlich erkennbar, wie der Saccharosezerfall mit der Zeit langsam ansteigt. Ferner zeigt sich, dass die Invertaseausscheidung regelmässiger verläuft als die Zuckerausscheidung. Nimmt die Zuckerausscheidung beispielsweise aus irgendeinem Grunde rasch zu (zum Beispiel am 20. und 22. Januar), so ist der Saccharosezerfall geringer; wird umgekehrt

plötzlich weniger Zucker ausgeschieden (zum Beispiel am 21. und 27. Januar), so ist der Zerfall grösser. Der Verlauf der Zerfallskurve der Saccharose verhält sich daher spiegelbildlich zu den raschen Änderungen der Zuckerausscheidungskurven. Die Invertaseausscheidung muss

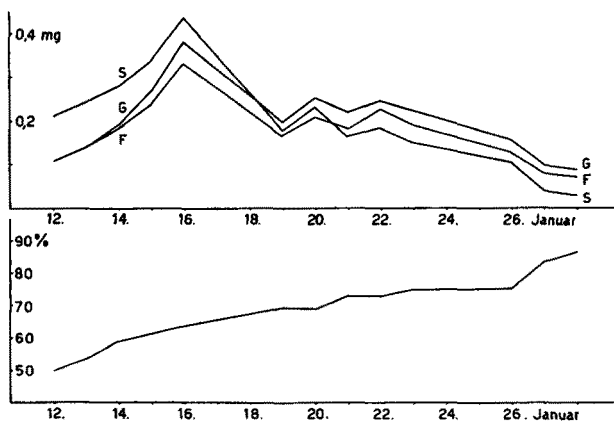


Abb. 1. Oben: Sekretionsverlauf in den Nektarien von *Euphorbia pulcherrima*. Täglich ausgeschiedene Zuckermengen. S = Saccharose + Oligosaccharide (wenig); G = Glucose; F = Fructose. Bestimmung nach SOMOGYI-NELSON¹. Unten: Prozentualer Zerfall der Saccharose, berechnet nach den oben dargestellten Werten von Saccharose und Glucose. Bei einem raschen Anstieg der Sekretion ist der Zerfall relativ kleiner und umgekehrt, was darauf hindeutet, dass die Ausscheidung der Invertase regelmässiger erfolgt als die Sekretion der Zucker.

deshalb weniger raschen Schwankungen unterworfen sein als der Zuckernachschub aus dem Phloem. Dessen Tätigkeit ist von der Wasserversorgung durch das Xylem abhängig² und somit den mannigfaltigsten Umwelteinflüssen (Transpiration, Wurzeldruck usw.) ausgesetzt. Die früher geäusserte Annahme, dass die Invertase im Ausscheidungsprodukt des Sekretionsgewebes mit der Saccharose des Phloemsaftes zusammenkommt³, wird dadurch bestätigt.

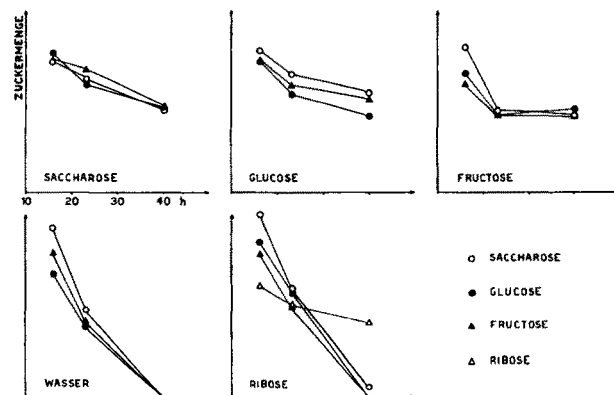


Abb. 2. Ausscheidung von Zuckern durch Nektarien, die auf Wasser und 5%igen Lösungen von Saccharose, Glucose, Fructose und Ribose schwammen. Zuckermenge als Flächenwert aufgetragen. Zu Beginn des Versuchs werden total etwa 20 γ Zucker je Stunde ausgeschieden.

Nach dem Kurvenbild der Abbildung 1 darf man annehmen, dass die ausgeschiedene Invertase bei *Euphorbia pulcherrima* eine Transfructosidase ist, da der Anteil

¹ Die vorliegende Arbeit wurde durch Mittel der Fritz-Hoffmann-La-Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz ermöglicht. Wir danken bestens für die Unterstützung.

² A. FREY-WYSSLING, Ber. schweiz. bot. Ges. 42, 109 (1933). – G. P. WOLFF, Bot. Arch. 8, 305 (1924).

³ C. AGTHE, Ber. schweiz. bot. Ges. 61, 240 (1951). – E. FREI, Diplomarbeit ETH, Zürich 1952. – A. FREY-WYSSLING und C. AGTHE, Verh. schweiz. naturf. Ges. 1950, 175.

⁴ M. ZIMMERMANN, Ber. schweiz. bot. Ges. 63, 402 (1953).

⁵ M. ZIMMERMANN, Exper. 10, 145 (1954).

⁶ H. WANNER, Ber. schweiz. bot. Ges. 63, 162, 201 (1953).

⁷ R. W. SHUEL, Plant Physiol. 27, 95 (1952). – R. BEUTLER, Bee World 34, 106, 128, 156 (1953). J. BOETIUS, Beih. schweiz. Bienenz. 2, H. 17, 257 (1948); siehe auch die dort zitierte Literatur.

¹ N. NELSON, J. Biol. Chem. 153, 375 (1944). – M. SOMOGYI, J. Biol. Chem. 160, 61 (1945).

² C. CZARNOWSKI, Arch. Geflügelzucht und Kleintierk. 1952, H. 1.

³ M. ZIMMERMANN, Exper. 10, 145 (1954).