

Swelling Properties of the Mitochondria of Unfertilized and Newly Fertilized Sea Urchin Eggs

Recent work from this laboratory¹ has given evidence of changes in the activity of some mitochondrial enzymes taking place in conjunction with fertilization of the sea urchin egg. It appeared of interest to investigate whether these were accompanied by changes in the physiological, and hence structural, conditions of the mitochondrial membrane. In fact, the structure of the membrane can no doubt influence the exchanges between the mitochondria and the surrounding cytoplasm.

For this analysis, advantage has been taken of the recent findings on the permeability of the mitochondria and of the factors which influence it².

Mitochondria from unfertilized and newly fertilized eggs (5–10 min after fertilization) of *Paracentrotus lividus* were prepared as previously described³. They were suspended in 0.5 M Tris (hydroxymethyl) aminometane buffer at pH 7.4. From this suspension 0.2 ml aliquots were diluted with 3.0 ml of sucrose at different concentrations from 0.5 to 0.1 M and in buffer only. Readings of the optical density at 520 m μ were taken immediately after mixing and then at 5 or 10 min intervals, up to 30 min.

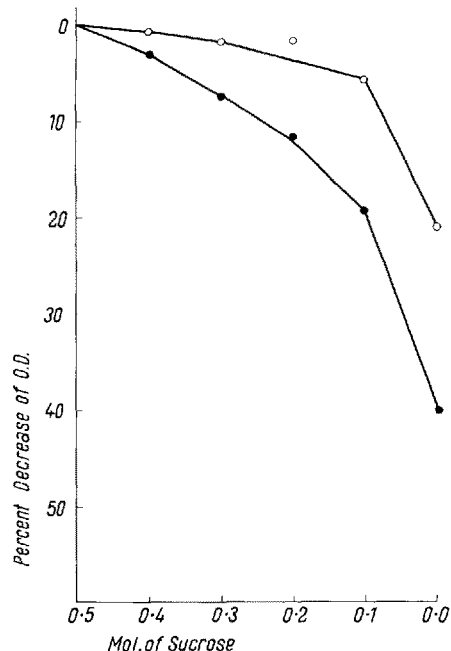


Fig. 1. — Swelling of mitochondria of unfertilized (•—•) and newly fertilized (—○—) eggs of *Paracentrotus lividus* in varying concentrations of sucrose and in Tris buffer. Swelling is expressed as per cent decrease of the optical density (O.D.) at 520 m μ with respect to the value in 0.5 M sucrose, after 10 min.

The results of one such experiment are reported in Figure 1. They show that the swelling of the mito-

chondria in a hypotonic medium is considerably greater in those prepared from unfertilized eggs than in those prepared from newly fertilized eggs.

It has been found recently⁴ that the most sensitive test to distinguish between mitochondria from tumor and from normal cells is the greater sensitivity of the former to low concentrations of trypsin (0.0046%). Anionic detergents on the contrary are much less effective on tumor mitochondria than on those of normal cells.

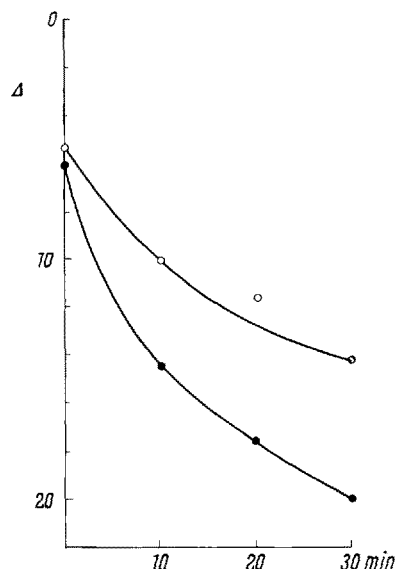


Fig. 2. — Effect of a 0.003% (final concentration) solution of Duponol B on the swelling of mitochondria of unfertilized (•—•) and newly fertilized (—○—) eggs of *Paracentrotus lividus*. The points on the diagram are the difference (Δ) between the per cent decrease of the O.D. of the mitochondria suspension in the presence of Duponol and of the control without Duponol.

Mitochondria from unfertilized and newly fertilized eggs are entirely insensitive to the same concentration of trypsin. Detergents, on the other hand, increase considerably the swelling of the mitochondria which, again, is much greater in the case of those prepared from unfertilized eggs (Fig. 2).

These findings give evidence of some structural change taking place in the membrane of the mitochondria of the sea urchin egg upon fertilization.

It seems interesting to recall here that unfertilized eggs of *Paracentrotus* are very sensitive to the cytolyzing effect of taurocholate but become almost insensitive to it during the first 2 min after fertilization⁵. It is tempting to visualize a common process which brings about the cortical changes and the changes of the mitochondrial membrane upon fertilization.

This investigation has been supported by a Grant from Consiglio Nazionale delle Ricerche.

A. MONROY

¹ A. MONROY, J. cell. comp. Physiol. (in press). — R. MAGGIO, J. cell. comp. Physiol. (in press).

² K. W. CLELAND, Nature 170, 497 (1952). — J. RAAFLAUB, Helv. physiol. pharmacol. Acta 11, 142 (1953). — D. F. TAPLEY, J. biol. Chem. 122, 325 (1956). — R. F. WITTER and M. A. COTTONE, Biochim. biophys. Acta 22, 364 (1956). — C. A. PRICE, A. FÖRNEST, and R. E. DAVIES, Biochem. J. 64, 754 (1956).

³ A. MONROY, J. cell. comp. Physiol. (in press).

Laboratory of Comparative Anatomy, The University of Palermo (Italy), June 22, 1957.

⁴ V. MUTOLO and F. ABBRIGNANI (in preparation).

⁵ A. MONROY, Pubbl. Staz. zool. Napoli 25, 188 (1954).

Riassunto

Mitocondri isolati da uova vergini e appena fecondate di *Paracentrotus lividus* sono stati trattati con soluzioni di saccarosio a concentrazioni decrescenti, a partire da 0,5 M, e con Duponol. Si è trovato che nelle soluzioni ipotoniche il rigonfiamento dei mitocondri è notevolmente maggiore per quelli preparati da uova vergini che per quelli preparati da uova fecondate. Anche al trattamento con Duponol sono più sensibili i mitocondri delle uova vergini.

Zur Biochemie des Gewächshaustabaks

Im Gewächshaus gezogene Tabakpflanzen weichen morphologisch stets vom Freilandtabak der gleichen Rasse erheblich ab. Besonders auffallend ist dies bei der Schweizer Sorte *Mont Calme brun*, deren sich entwickelnde Spitzenblätter im Freien pelzig behaart sind, während vergleichbare gleich hoch inserierte Blätter im Gewächshaus nur vereinzelte Haare tragen¹ und dadurch einen juvenilen Eindruck machen. Ferner sieht der Freilandtabak, verglichen mit Gewächshauspflanzen, stets etwas gedrungener aus, weil er grössere Blätter bildet; dadurch scheinen die Internodien relativ kürzer zu sein. Trotz optimaler Temperatur, Befeuchtung und Belüftung sowie zusätzlicher Belichtung² gelingt es nicht, diese Verschiedenheit völlig zum Verschwinden zu bringen, auch wenn der Gewächshaus- und der Freilandtabak in genau gleicher Erde stocken.

Der Unterschied bezieht sich indessen nicht nur auf die äussere Morphologie, sondern auch auf den Blattchemismus. Dies äussert sich bei der Aufarbeitung der geernteten Blätter, indem Gewächshaustabak wohl schön vergilbt, jedoch nur unvollkommen oder überhaupt nicht verbräunt, selbst wenn er von normalerweise sich stark bräunenden Rassen stammt. Hieraus folgt, dass in Gewächshausblättern entweder das bräunende Fermentsystem oder dann das zugehörige Substrat in ungenügender Menge entwickelt wird. KÜNZLI³ wies nach, dass eine mangelhafte Substratbildung vorliegt. Ähnlich wie in Freilandblättern der gelben Sorte *Mont Calme jaune*, werden Blatthomogenate bei Zusatz von Catechol braun, so dass also die notwendigen Polyphenolase vorhanden sind.

Eine nähere Charakterisierung des Verbräunungssystems ergibt, dass als Fermente eine Polyphenoloxydase vom Typus der Laccase, die also Monophenole wie das Tyrosin nicht zu oxydieren vermag⁴, und eine Peroxydase vorliegen, während als Substrate Chlorogensäure (Depsid der Kaffeesäure mit Chinasäure) und Rutin (Glukorhamnosid des Quercetins) auftreten⁵. Im Gewächshaustabak fehlt nun das Glukosid Rutin vollständig und die Chlorogensäure wird in unzureichendem Masse erzeugt. Ähnliche Feststellungen wurden gleichzeitig auch von DAWSON und WADA⁶ gemacht; ferner fanden diese Autoren, dass die papierchromatographisch erfassbare Chlorogensäuremenge bei Freilandtabak von der Tageslänge abhängt.

Dies bestätigt die Vermutung, dass die Belichtung im Gewächshaus den Minimumfaktor vorstellt, der die Substratbildung beschränkt. Weil die Steigerung der Lichtmenge (Intensität $\times$ Belichtungsdauer) im Gewächshaus nicht viel ändert, wurde geprüft, ob vielleicht die Lichtqualität ein massgebender Faktor für die Substratbildung sei. Da die ultraviolette Strahlung im Gewächshaus durch die Verglasung wegfiltriert wird, unternahmen wir orientierende Versuche mit einer zusätzlichen UV-Bestrahlung. Zuerst erhielten die Gewächshauspflanzen dreimal täglich während 30 min eine Zusatzbelichtung mit einer Quecksilberdampflampe. In einer weiteren Versuchsserie wurde die Bestrahlungszeit auf 8 h je Tag ausgedehnt.

Es scheint also erwiesen zu sein, dass kurzwelliges Licht die Bildung dieses Depsides zu stimulieren vermag.



Abb. 1. Links mit UV bestrahlte, rechts unbestrahlte Pflanze der Sorte *Mont Calme brun*, im Gewächshaus gezogen.

Trotz dieser Massnahme blieb die Rutinbildung völlig aus. Dagegen gelang es, die Menge der Chlorogensäure erheblich zu steigern, wie folgende Analysenzahlen zeigen (je zehntes Blatt der Rasse *Mont Calme brun*).

	Freiland	Gewächshaus ohne UV	Gewächshaus mit 1 1/2 h UV/Tag	Gewächshaus mit 8 h UV/Tag
Chlorogensäure	2,72 %	0,41 %	1,72 %	2,52 %

Bei achtstündiger Belichtung mit UV trat neben diesen chemischen Veränderungen ein auffallender Unterschied des Phänotypus im Vergleich zu unbestrahlten Pflanzen auf. Die mit UV belichteten Pflanzen wuchsen schneller und bildeten viel grössere Blätter aus als die unbestrahlten Pflanzen (Abb. 1 und 2). Aber nicht nur die Grösse, sondern auch die Beschaffenheit der Blätter ist verschie-

¹ E. EICHENBERGER, Diss. ETH. Zürich 1952, S. 124.
² P. WALTZ, Diss. ETH. Zürich 1957.
³ S. KÜNZLI, Diplomarbeit ETH. Zürich 1952 (unveröffentlicht).
⁴ M. SHIROYA, T. SHIROYA und S. HATTERI, *Physiol. Plantarum* 8, 594 (1955).
⁵ S. BÄBLER, Diss. ETH. Zürich (im Druck).
⁶ R. F. DAWSON und E. WADA, *Tobacco* 144, 18 (1957).