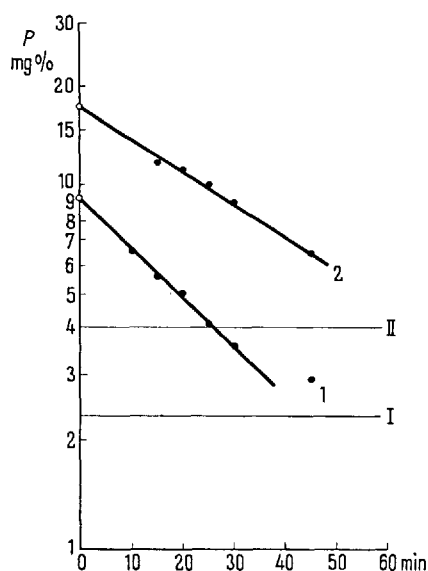


The values of fasting blood pyruvate level and the rate of assimilation of pyruvate in tissues in normal and thyroxine-treated rabbits

State	Number	Blood pyruvate level in mg%	p	Assimilation coefficient of pyruvate	p
Normal rabbits	13	2.48 ± 0.13	—	3.62 ± 0.16	—
Thyroxine-treated rabbits	6	4.60 ± 0.35	< 0.001	2.21 ± 0.23	< 0.01



The decline of the blood pyruvate concentration after i.v. administration of sodium pyruvate plotted against time on semilogarithmic paper. (1) normal rabbits, (2) thyroxine-treated rabbits, (I) fasting blood pyruvate level of normal rabbits, (II) fasting blood pyruvate level of thyroxine-treated rabbits.

numerically by the regression coefficient of the line^{7,8}. This rate is identical with the rate of assimilation of pyruvate by all tissues, because the elimination of pyruvate by the kidneys during the test is negligible.

Results and Discussion. The results of our experiments are summarised in the Table and Figure. We observed an increase in fasting blood pyruvate level in rabbits after the administration of thyroxine. The decline of blood pyruvate level after the thyroxine treatment was slower than in normal animals and the slope of the straight line on semilogarithmic paper was less striking: therefore the rate of assimilation of pyruvate was decreased. This slower rate of disappearance of pyruvate suggests that the higher levels of pyruvate in the blood in hyperthyroidism may be caused not only by higher production of pyruvic acid by accelerated glycolysis but also by a delayed assimilation of pyruvate. In further experiments, we found also a decreased rate of disappearance of α -ketoglutarate from the blood in thyroxine-treated rabbits, but that of some other acids of the tricarboxylic acid cycle was normal or accelerated¹⁰. These facts suggest that there are some disturbances in α -ketoacids metabolism *in vivo* in thyrotoxic rabbits.

Zusammenfassung. Der Einfluss von Thyroxin auf den Stoffwechsel der Brenztraubensäure von Kaninchen wurde untersucht. Nach Verabreichung von 0,25 mg Thyroxin pro kg Körpergewicht täglich während 10 Tagen stiegen die Werte des Brenztraubensäurespiegels im Blut der nüchternen Tiere an. Thyroxin setzte die Abbaugeschwindigkeit der Brenztraubensäure im Blut herab und hemmte ihre Metabolisierung in den Geweben.

L. MACHO

Endocrinological Institute of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava (Czechoslovakia), June 16, 1961.

⁹ V. CONARD, *Mesure de l'assimilation du glucose* (Les Éditions Acta Belgica, Bruxelles 1955). – D. IKKOS and R. LUFT, *Acta endocrin.* 25, 312 (1957). – L. MACHO and V. LIČKO, *Exper.* 13, 204 (1957). – L. MACHO, *Problémy endokrinologickej praxe z hľadiska výzkumu, SAV* (Bratislava 1958).

¹⁰ L. MACHO, in preparation to press.

Inverse Effect of Gibberellin and Amo-1618 on Growth, Catalase and Peroxidase Activity in Cucumber Seedlings

Cucumber seedlings' hypocotyls were previously used to assay gibberellins¹ and to study the effect of structure and concentration of quaternary ammonium compounds². Gibberellin stimulated hypocotyl elongation in light-grown seedlings. This stimulation was directly related to concentration in the range between 10 and 1000 ppm. The effect of most quaternary ammonium compounds was inverse to that of gibberellin. The most active of these compounds was found to be 2-isopropyl-4-dimethyl-amino-5-methylphenyl-1-piperidine carboxylate methyl chloride, designated Amo-1618. It retarded both hypocotyl and radicle elongation, in relation to concentration. When applied together, gibberellin and Amo-1618 antagonize their opposite effect on hypocotyl growth³. About half the amount of gibberellin, on a molar basis, is needed to counteract the retarding effect of Amo-1618 on hypocotyl. Gibberellin did not affect the retardation of radicle elongation by Amo-1618.

KAMERBEEK⁴ has reported that the dwarf type of plants show a greater peroxidase activity than their normal or giant types. McCUNE and GALSTON⁵ treated dwarf strains of peas and corn with gibberellin. This treatment increased growth rate and decreased peroxidase activity to the level found in normal strains of the indicated plants. The present report deals with the effect of chemical stimulation and retardation of growth on catalase and peroxidase activity of a normal plant.

Cucumber seeds var. Marketer were sown in petri dishes on filter paper previously saturated with distilled water, an aqueous solution of potassium gibberillate (GK), Amo-1618, or a mixture of both chemicals. Dishes were placed at constant temperature of 24° C and illuminated with 110 foot candles from fluorescent lamps for 8 h each day. After 5 days, seedlings were measured and dissec-

¹ A. H. HALEVY and H. M. CATHEY, *Bot. Gaz.* 122, 63 (1960).

² A. H. HALEVY and H. M. CATHEY, *Bot. Gaz.* 122, 151 (1960).

³ A. H. HALEVY, *Proc. 4th Congr. Sci. Soc. Israel* (1961), p. 151.

⁴ G. A. KAMERBEEK, *Acta bot. neerl.* 5, 257 (1956).

⁵ D. C. McCUNE and A. W. GALSTON, *Plant Physiol.* 34, 416 (1959).

ted. 100 mg of cotyledons, radicles and hypocotyl-tips were homogenated in 5 cm³ ice chilled 0.1 M phosphate buffer at pH 7. Proper dilutions were obtained using the buffer solution. Catalase activity was determined with the paper discs method⁶, and peroxidase by the colorimetric determinations of the change in colour intensity of guaiacol within 3 min⁷. Enzymatic activity was calculated on dry matter basis determined in plants receiving the corresponding treatments, and was expressed as percentage of activity of water controls.

Table I shows that the activity of catalase and peroxidase differs greatly in the various parts of the seedlings. The most remarkable difference in the activity of these enzymes is in the radicles. While their catalase activity is only 6% of that in cotyledons, their peroxidase activity is almost twice as much as that of cotyledons.

The most significant effect of GK was on the hypocotyl (Table II). It retarded both catalase and peroxidase activity. The retardation of activity was in relation to the stimulation of growth at the corresponding concentra-

tion¹. Effect on cotyledons was much smaller. GK did not affect catalase and peroxidase activity in roots, and only slightly affected their growth¹.

Amo-1618 stimulated both catalase and peroxidase activity in all three organs of the seedlings (Table III). The rate of activity increased in relation to the retarding effect of increasing concentration on growth of both hypocotyl and radicle. The most significant effect was on hypocotyl's peroxidase activity, which was more than 5-fold higher in 1000 ppm Amo-1618 than in water.

GK counteracted the retardation effect of Amo-1618 on hypocotyl growth³. Hypocotyl length of seedlings grown in a mixture containing 250 ppm GK and 500 ppm Amo-1618 equals that of seedlings grown in water, but their radicle growth is retarded at the same rate as that of seedlings grown on Amo-1618 solution alone. Similar effects were seen also on catalase and peroxidase activity (Table IV).

The reverse effects of Amo-1618 and GK on catalase and peroxidase activity of the hypocotyl and of the cotyledons were thus almost counterbalanced. On the other hand, GK did not affect the stimulatory influence of Amo-1618 on catalase and peroxidase activity of the radicles.

Similar results were obtained in a study on the effect of GK and Amo-1618 sprayings on citrus nursery stocks⁸. Peroxidase activity of leaves treated with Amo-1618 was

Tab. I. Relative catalase and peroxidase activity in the various parts of cucumber seedlings grown in water (Activity of cotyledons considered as 100.0)

	Relative catalase activity	Relative peroxidase activity
Cotyledons	100.0	100.0
Hypocotyls	16.1	52.3
Radicles	6.2	185.6

All differences are significant at the 0.01 level.

⁶ M. GAGNON, W. M. HUNTING, and W. B. ESSELEN, *Anal. Chem.* **31**, 144 (1959).

⁷ F. D. SNELL and C. T. SNELL, *Colorimetric Methods of Analysis* (Van Nostrand, New Jersey 1954), IV, p. 518.

⁸ S. P. MONSELISE and A. H. HALEVY, *Amer. J. Bot.*, in press.

Tab. II. Effect of various concentrations of potassium gibberillate (GK) on relative activity of catalase and peroxidase (activity of water controls taken as 100.0)

Concentration of GK	Cotyledon		Radicle		Hypocotyl	
	Relative catalase activity	Relative peroxidase activity	Relative catalase activity	Relative peroxidase activity	Relative catalase activity	Relative peroxidase activity
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
62.5 ppm	104.3	92.3	101.2	107.2	73.9	36.7
125 ppm	92.7	66.4	102.0	102.9	58.6	32.4
250 ppm	88.3	68.3	94.6	96.3	39.4	16.6
500 ppm	76.6	36.9	97.8	93.4	26.7	18.8
L.S.D.* 5%	10.3	18.3	N.S.	N.S.	16.2	16.5
L.S.D.* 1%	14.4	27.2	—	—	22.3	23.6

* L.S.D. = least significant difference

Tab. III. Effect of various concentrations of Amo-1618 on relative activity of catalase and peroxidase (activity of water controls taken as 100.0)

Concentration of Amo-1618	Cotyledon		Radicle		Hypocotyl	
	Relative catalase activity	Relative peroxidase activity	Relative catalase activity	Relative peroxidase activity	Relative catalase activity	Relative peroxidase activity
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
125 ppm	115.9	110.5	123.2	143.2	113.9	161.5
250 ppm	151.2	142.1	138.4	156.4	169.9	276.9
500 ppm	181.1	231.6	157.2	246.8	226.2	323.1
1000 ppm	197.3	272.7	182.3	384.7	231.0	538.5
L.S.D.* 5%	17.3	19.2	14.3	22.4	16.6	23.2
L.S.D.* 1%	26.2	28.6	23.4	36.1	25.8	37.2

* L.S.D. = least significant difference

Tab. IV. Relative activity of catalase and peroxidase in seedlings treated with 250 ppm GK and 500 ppm Amo-1618 (activity in water controls taken as 100.0)

	Relative catalase activity	Relative peroxidase activity
Cotyledon	117.3	94.8
Hypocotyl	113.8	83.6
Radicle	163.2	252.3
L.S.D.* 5%	12.1	16.2
L.S.D.* 1%	18.3	28.1

* L.S.D. = least significant difference

significantly higher than that of leaves treated with GK. The untreated controls had an intermediate activity. This effect of Amo-1618 was counteracted by spraying with half the concentration of GK.

The results reported here indicate that both gibberellin and Amo-1618 influence peroxidase and catalase activity. Their inverse effect was mutually counteracted and it thus seems that they affect the same sites of plant growth. Peroxidase is usually considered to be a part of the IAA oxidase system⁹. Direct or indirect effect of

gibberellin on auxin level was suggested as a possible mechanism of their interaction¹⁰. It may similarly be suggested that Amo-1618 affects auxin level in the reverse direction.

Zusammenfassung. Gibberellin beschleunigt das Wachstum von Hypokotylen bei Gurkensämlingen und verlangsamt die Katalase- und Peroxydasetätigkeit in Hypokotylen und Kotyledonen. Amo-1618 verlangsamt das Wachstum, beschleunigt jedoch die Tätigkeit dieser Enzyme in Hypokotylen, Kotyledonen und Wurzelanlagen. Das Ausmass der durch Gibberellin verursachten Verlangsamung, bzw. der durch Amo-1618 verursachten Beschleunigung stand zum Effekt auf die Hypokotyl-Elongation in entsprechender Konzentrationsabhängigkeit. Gleichzeitige Anwendung beider Substanzen führte zu Aufhebung des Retardierungseffektes.

A. H. HALEVY

The Hebrew University, Faculty of Agriculture, Rehovot (Israel), October 24, 1967.

⁹ P. M. RAY, Ann. Rev. Plant Phys. 9, 81 (1958).

¹⁰ P. W. BRIAN, Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 34, 37 (1959).

Blutagglutinierende und toxische Eiweissfraktionen aus Bohnen

Seit langem ist das Vorkommen von Haemagglutininen in Bohnen und andern Hülsenfrüchten bekannt¹; jedoch sind die Ansichten über die Anzahl der aktiven Fraktionen, ihre Zuordnung zu Albuminen oder Globulinen, sowie ihre mögliche Giftigkeit widersprechend².

In einer früheren Arbeit haben wir über Versuche zur Darstellung von Phyttagglutininen aus schwarzen Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) berichtet³. Durch Ausziehen der fein gemahlenden Samen mit 1% Kochsalzlösung wurde zunächst eine Rohlösung erhalten, die nach Zentrifugierung dialysiert wird, wobei eine Euglobulinfraktion ausfällt. Diese kann nach der Vorschrift von GOA und STRID⁴ oder durch 5maliges Lösen in 1% Kochsalzlösung und Fällung durch Dialyse gereinigt werden. Es wird eine schwerlösliche Fraktion D erhalten, die dem Legumin von DANIELSON⁵ entsprechen dürfte und wegen seiner Unlöslichkeit in physiologischer Kochsalzlösung nicht biologisch untersucht werden konnte und eine lösliche Fraktion, die wir E genannt haben und die dem Vicelin entspricht. Sie war bei der Prüfung mit der Papierelektrophorese nicht ganz einheitlich. Eine kaum mit Amidoschwarz anfärbbare Komponente trennte sich von einer stark gefärbten, wobei die erstere den grössten Teil der Agglutinierungsaktivität enthält. Durch andere Verfahren gelang ihre Abtrennung nicht.

Aus der salzfreien Lösung wurden bei pH 6 drei weitere Fraktionen durch 0,55, 0,7 und Ganzsättigung mit Ammonsulfat erhalten. Dieselben wurden durch 3malige Wiederholung der Fällung und jeweiliges Lösen durch Dialyse gereinigt. Die bei 70%iger Sättigung gewonnene Fraktion wurde Phaseolotoxin A genannt. Sie war bei Prüfung in der Ultrazentrifuge, sowie in der Tiselius- und Papierelektrophorese rein. Die Sedimentationskonstante S_{20} wurde mit $6,04 \times 10^{-13}$, der isoelektrische Punkt bei 5,9 und das Molekulargewicht bei 126 000 gefunden.

Die bei Ganzsättigung mit Ammonsulfat ausfallende Fraktion B war nicht einheitlich. Durch Elektrophorese oder Chromatographie an CM-Cellulose zwischen pH 4

und 10 konnten 3 Fraktionen erhalten werden, von denen keine mit der Fraktion A identisch ist. Sie wurden in den vorliegenden Versuchen nicht einzeln geprüft.

Ebenso war in der bei der Ammonsulfatfraktionierung zuerst ausfallenden Fraktion C das Vorhandensein von 3 verschiedenen Komponenten nachweisbar, die durch Chromatographie an DEAE-Cellulose getrennt werden konnten. Sie waren von allen oben beschriebenen Fraktionen verschieden. Auch in diesem Falle wurde die Rohfraktion für die hier beschriebenen Versuche verwandt, weil die Verluste bei der Chromatographie sehr gross waren und ausserdem diese die biologischen Eigenschaften (Toxizität) ändern kann, wie es zum Beispiel kürzlich für Chlostridiumtoxin beschrieben wurde⁶ und wir es auch bei reinem Phaseolotoxin A beobachtet haben (Tabelle I).

Die Agglutinerung wurde mit gewaschenen Erythrocyten auf der Tüpfelplatte bestimmt. Für die toxiologischen Untersuchungen wurden weisse Mäuse eigener Zucht beiderlei Geschlechts von 6–9 Wochen verwandt. Die zu prüfenden Lösungen wurden in einer Dosis intraperitoneal gespritzt, wobei die Konzentration so gewählt wurde, dass für 10 g Mäusegewicht stets 0,25 ml der in 0,85% Kochsalzlösung enthaltenen Fraktion appliziert wurden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in der Tabelle I zusammengefasst.

Alle 4 Fraktionen zeigten sowohl haemagglutinierende wie auch toxische Wirkungen, jedoch waren die beiden Aktivitäten nicht streng proportional, soweit die Genauigkeit der Technik diesen Schluss zulässt. Die Toxizität von Phaseolotoxin A war bei einer LD_{50} von etwa 50 mg/kg Maus ungefähr 1/700 der toxischen Dosis von

¹ K. LANDSTEINER und L. RAUBITSCHER, Zbl. Bakt. 45, 660 (1907).

² M. KRÜPE, Blutgruppenspezifische pflanzliche Eiweisskörper (Phyt-agglutinine) (Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1956).

³ W. G. JAFFÉ und K. GAEDE, Nature 183, 1329 (1959).

⁴ J. GOA und L. STRID, Arch. Mikrobiol. 33, 235 (1959).

⁵ C. E. DANIELSON, Biochem. J. 44, 387 (1949).

⁶ E. J. SCHANTZ, D. STEFAYE und L. SERO, J. biol. Chem. 235, 3489 (1960).