

Glutamine levels in digestive gland, foot and body fluid of normal, starved and aestivated *Pila globosa*

	Digestive gland			Foot			Body fluid		
	Normal	Starved	Aestivated	Normal	Starved	Aestivated	Normal	Starved	Aestivated
Mean	7.33	5.4	4.26	6.68	6.23	2.64	1.09	1.09	0.33
SD	± 0.37	± 0.54	± 0.65	± 0.33	± 0.26	± 0.65	± 0.02	± 0.39	± 0.04
Difference (%)		-26.3	-41.8		-6.7	-60.4		+0.76	-69.4
p-value		< 0.001	< 0.001		NS	< 0.001		NS	< 0.001

Values expressed in $\mu\text{moles NH}_3/\text{g wet wt}$ and $\mu\text{moles NH}_3/100 \text{ ml body fluid}$. p-value indicates level of significance. NS: Nonsignificant. Values are mean $\pm$ SD of 6 independent observations.

The decrease was relatively more in aestivated snails as compared with the starved ones. The changes during starvation were not statistically significant in the body fluid and foot tissue, while they were significant in the digestive gland.

Using $1,4\text{-}^{14}\text{C}$ succinate, ^{14}C succinate and ^{14}C bicarbonate¹⁰⁻¹² showed glutamine synthesis in some terrestrial snails, *Periwinkles* and *Otala lactea*, respectively. Glutamine was shown to contribute the N-3 and N-9 of purine and uric acid biosynthesis during aestivation^{13,14}. The decrement in the levels of glutamine during aestivation and

starvation in all the tissues studied, except in the body fluid of starved snails, as found in the present study, and increased levels of glutamate¹⁵ indicate the low level of glutamine synthetase activity as well as the enhanced synthesis of uric acid from glutamine. The increase in uric acid accumulation during aestivation and starvation is well in line with the present work^{3,5}. The glutamine, serving as a precursor in the synthesis of uric acid during the torpid state, may be of adaptive value for the snail in its shift from ammonogenesis to uricogenesis during starvation and aestivation.

- Acknowledgments. C. Sree Ramulu Chetty and P. Aruna are thankful to CSIR for the award of Junior fellowships, during the tenure of which the work has been done.
- M.B. Lal and B.B. Saxena, *Nature* 170, 1024 (1952).
- Y. Srinivasa Reddy, P. Venkateswara Rao and K.S. Swami, *Indian J. exp. Biol.* 12, 454 (1974).
- Nayeemunnisa, *Comp. Biochem. Physiol.* 42, 1049 (1972).
- Okumura, Jun-Ichi and I. Tasaki, *J. Nutr.* 97, 316 (1969).
- H.A. Harper, W. Victor, Rodwell and Peter, in: *Review of Physiological Chemistry*, 16th ed. Lange Medical Publications, Los Altos, California 1977.
- J.W. Campbell and S.H. Bishop, in: *Comparative Biochemistry of Nitrogen Metabolism. I. The Invertebrates*, p. 103. Ed. J.W. Campbell. Academic Press, New York and London 1970.
- Y. Srinivasa Reddy, dissertation, S.V. University, Tirupati 1974.
- S.P. Colowick and N.O. Kaplan, *Meth. Enzym.* 11, 63 (1967).
- C. Bryant, *Comp. Biochem. Physiol.* 14, 223 (1965).
- C. Bryant, W.J.W. Hines and M.J.H. Smith, *Comp. Biochem. Physiol.* 11, 147 (1967).
- K.V. Speeg and J.W. Campbell, *Comp. Biochem. Physiol.* 26, 539 (1968a).
- S.C. Hartmann and J.M. Buchanan, *J. biol. Chem.* 233, 431 (1958).
- T.W. Lee and J.W. Campbell, *Comp. Biochem. Physiol.* 15, 457 (1965).
- K.V. Ramana Rao, dissertation, S.V. University, Tirupati 1974.

Substances fluorescentes dans les téguments à pigment blanc de *Processa robusta* (Crustacé, Natantia)

Fluorescent substances in the white pigment teguments of *Processa robusta* (Crustacean, Natantia)

A. Momzikoff et P. Noël

Institut Océanographique, Laboratoire de Physiologie des Etres Marins; 195, rue Saint-Jacques, F-75005 Paris (France), et Laboratoire de Zoologie, Université Pierre et Marie Curie, 4, place Jussieu, F-75230 Paris Cédex 05 (France), 25 mai 1978

Summary. Riboflavin and isoxanthoptérin are identified as possible constituents of the white pigment chromatophores of the shrimp *Processa robusta*. These chromatophores contain 11.76 times more riboflavin than the surrounding tegument.

La crevette *Processa robusta* possède sur la face dorsale de son abdomen une tache blanche constituée de chromatophores contenant des granules de pigment blanc. Chez l'animal, ces granules, présentent au sein du chromatophore des migrations qui suivent un rythme nyctéméral: étalement le jour, concentration la nuit¹; ces migrations peuvent être induites par des stimulus hormonaux^{2,3} ou lumineux, in vivo⁴ comme in vitro⁵. La nature chimique du pigment blanc n'a pu être, jusqu'ici, clairement établie chez les espèces de crustacés où elle a été recherchée: acide urique chez *Eriocheir sinensis*⁶, ptérines chez diverses autres espèces⁷. Comme *P. robusta* est une espèce particulièrement favorable à l'étude de la physiologie du chromatophore, nous avons examiné son pigment blanc du point de vue de sa composition en substances photosensibles du type flavine et ptérine.

Matériel et méthodes. Les animaux (55 individus) proviennent de la région de Banyuls-sur-mer (juin 1977). On prélève sur le vivant la partie pigmentée en blanc (lot B) et, pour comparaison, une portion de surface équivalente (lot T) ne contenant qu'une très faible quantité de pigment blanc (environ 10% de celle contenue dans le lot B). On conserve des exuvies de *P. robusta* (E.P.R.) et celles de *P. edulis* (E.P.E.), espèce très voisine. On congèle le matériel jusqu'aux analyses qui sont faites en lumière réduite, suivant la méthode utilisée par l'un d'entre nous⁸: 3 broyages et macérations dans NH_4OH à 1% (1 h à 27 °C), filtration, acidification du filtrat à pH 3 par de l'acide acétique, adsorption sur colonne de Florisil ($\varnothing$ 12 mm, h = 4 cm), lavage par de l'acide acétique à 1%, élution par de l'acétone à 30%, chromatographie de l'éluat sur du papier Whatman no 1 dans du n-propanol:ammoniaque à 1%

(2:1); dosage des produits séparés par fluorescence, identification par co-chromatographie dans les solvants: A=eau, B=n-propanol:ammoniaque à 1% (2:1), C=n-butanol:acide acétique:eau (4:1:1), D=n-butanol:pyridine:eau (6:4:3) et par électrophorèse dans les tampons: I=acide acétique, II=acide formique, III=acide borique, IV=acétate de Na (0,05 M; 400 V; 12 min, dans chaque cas); étude des produits de dégradation éventuels.

Résultats. On identifie 2 composés: la riboflavine fluorescente en jaune et l'isoxanthoptérine, fluorescente en violet. Pour la riboflavine: $R_f=0,49, 0,42, 0,32$ et $0,37$, respectivement dans les solvants A, B, C et D et migrations (en mm): $-10, -11, -6$ et $+2$, respectivement dans les tampons I, II, III et IV. Pour l'isoxanthoptérine: $R_f=0,41, 0,33, 0,21$ et $0,14$, respectivement dans les solvants A, B, C et D et migrations (en mm): $-16, -16, 0$ et $+10$, respectivement dans les tampons I, II, III et IV. Une substance fluorescente en jaune, non-identifiée, est présente dans les exuvies

seulement. La comparaison des teneurs des lots B et T (tableau) montre que:

- la riboflavine et l'isoxanthoptérine sont toutes deux présentes dans chaque lot,
- chaque composé est plus abondant dans le tégument avec pigment blanc qu'à l'extérieur de celui-ci,
- la différence essentielle entre les 2 substances porte sur la répartition de leurs concentrations respectives entre les 2 types de tégument: la riboflavine est 11,76 fois plus abondante dans la partie pigmentée, alors que l'isoxanthoptérine ne l'est que 6,88 fois.

Discussion. La présence simultanée de la riboflavine et de l'isoxanthoptérine dans le tégument contenant le pigment blanc ne permet pas de considérer l'une des 2 substances plus que l'autre comme responsable de la pigmentation blanche étudiée. Les résultats obtenus souligneraient plutôt le caractère complexe et même composite du pigment blanc. Il convient de rappeler ici l'existence des complexes flavine-proteines signalés chez certains crustacés par Busnel et Drilhon⁷. Des expériences seront prochainement faites pour préciser la forme sous laquelle se trouve la riboflavine au niveau du pigment blanc et étudier le rôle possible de ce composé, en tant que substance photosensibilisatrice⁹, dans le caractère photosensible des chromatophores blancs.

Teneurs des différents tissus étudiés en riboflavine et en isoxanthoptérine

Substance et origine		Poids frais de l'échantillon (g)	Concentration en μg par g de tissu frais
Riboflavine	T	3,357	0,34
	B	3,858	4,03
	E.P.E.	6,981	0,25
	E.P.R.	0,194	2,04
Isoxanthoptérine	T	3,357	0,26
	B	3,858	1,84
	E.P.E.	6,981	0,13
	E.P.R.	0,194	1,40
Substance fluorescente jaune	E.P.E.	6,981	0,15
	E.P.R.	0,194	5,95

- 1 P. Noël, *Chronobiologia* 4, 136 (1977).
- 2 D.B. Carlisle et F.G.W. Knowles, *Camb. Monogr. exp. Biol.* 10 (1959).
- 3 L.H. Kleinholz, in: *The Physiology of Crustacea*, vol. II, p. 133. Ed. T.H. Waterman. Academic Press, London 1961.
- 4 M. Chicewicz, *Studia Soc. Sci. torun. (Zool.)* 3, 1 (1956).
- 5 F.G.W. Knowles, *Nature* 146, 131 (1940).
- 6 A. Mollitor, *Zool. Jb. Abt. Physiol.* 57, 323 (1937).
- 7 R.G. Busnel et A. Drilhon, *Bull. Soc. zool. France* 73, 141 (1948).
- 8 A. Momzikoff, thèse doctorat d'état, Paris (1977).
- 9 D.R. Knowles, *J. Am. chem. Soc.* 89, 5455 (1967).

Primary tissue cultures from organ fragments: A simplified method¹

E.J. Noga²

Department of Biological Sciences, Florida Atlantic University, Boca Raton (Florida 33431, USA) 18 May 1978

Summary. Organ fragments washed in Ca^{++} and Mg^{++} - free saline, treated with trypsin and placed directly into culture flasks adhered within seconds to the vessel surface. If the fragments were suspended in culture medium before they were added to the flasks, they did not adhere. This technique permits the rapid attachment and subsequent growth of the primary tissue cultures.

Organ fragments offer distinct advantages over single cell suspensions for initiating primary cultures. Individual fragments are less affected by deleterious culture conditions than are single cells³. Prolonged enzyme treatment for the release of individual cells causes the loss of cellular components and lowers cell survival⁴. But trypsin-treated organ fragments which are not separated into individual cells exhibit minimal cell damage and loosened intracellular connections, which aids in cell migration⁵.

Since fragments must firmly attach to the vessel surface in order to allow cell growth, various methods have been explored to secure them. These have included plasma clot⁶, drying of the tissues onto the vessel surface⁷, and the use of collagen films⁵. Fragments have been either left undisturbed to allow attachment⁸ or physically held in place by sandwiching them between 2 surfaces⁹, but it may often require several days before the fragments will adhere³. The method described herein eliminates the need for such procedures and results in fragments which are quickly and

securely attached to the vessel surface, thus facilitating cell outgrowth. The entire procedure can be performed in less than 1.5 h. While the following is a description of the method used in the initiation of cultures from a fish, the procedure has also been found to be equally successful with rat kidney, spleen and lung¹⁰.

Materials and methods. Kidney, gonad and liver from adult walking catfish (*Clarias batrachus* (L.)) were placed into separate plastic petri dishes. Approximately 3 ml of Puck's saline G⁶ without calcium or magnesium (CMF) were added and the organs minced into 1-mm³ pieces with a pair of scalpels. The fragments were transferred to 16 × 125 mm test tubes, 4 vol. of CMF added, the fragments allowed to settle and the fluid removed. Washing was repeated until the supernatant fluid was clear. 4 vol. of 0.25% trypsin (Difco 1:250; Difco, Detroit, Michigan) in CMF were added and each tube was mixed by pipetting. A cloudy supernatant was normally produced by this enzymatic treatment, except in the case of gonadal tissue. The super-