

cuvette contents at a rate identical to that used in platelet aggregation studies was provided by a mixer mounted on a removable sample compartment cover⁸⁻¹⁰. As seen in the Figure (open circles) there is a very rapid increase in pH of the suspending medium with time, which would result in an exaggerated increase in aggregation patterns as the pH of the medium approached that of the aggregation optimum of 8. This could serve as a possible explanation of the observation by KERBY and TAYLOR¹¹ that the degree of aggregation (induced by ADP or palmitate) of washed human platelets suspended in a bicarbonate containing Krebs-Ringer medium was greater than that in a phosphate containing Krebs-Ringer medium.

Introduction of a 95% O₂-5% CO₂ atmosphere in the sample compartment results in a decrease in the pH of the

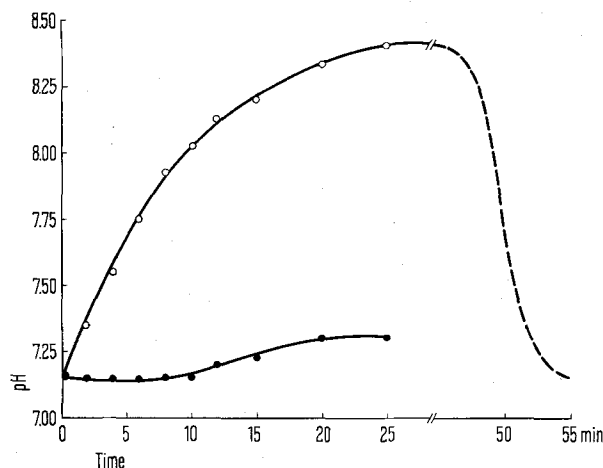
suspending medium (broken-line) and a return to the initial base value. This medium can therefore effectively be used if there is an atmosphere containing a small amount of CO₂ present during turbidometric monitoring of aggregation. Moreover, the presence of oxygen in the gaseous atmosphere would also tend to approximate physiological conditions more closely.

In other studies (not quoted) we have employed *Tris* [*tris* (hydroxy-methyl) aminomethane buffer] (1.45 g/l) in place of NaHCO₃ in the modified Tyrode's solution. At this concentration *Tris* had no effect on platelet aggregation and would thus function to maintain normal pH levels without the requirement for a specific gaseous atmosphere in the sample compartment of the spectrophotometer during turbidometric measurements of platelet aggregation.

Résumé. L'agitation constante de la solution de Tyrodes modifiée, un moyen physiologique fréquemment utilisé pour resuspendre les plaquettes isolées ou pour diluer le plasma riche en plaquettes durant le contrôle turbidométrique de l'aggrégation, cause une augmentation rapide du pH. De ce fait, l'introduction d'un mélange de 95% O₂ à 5% CO₂ dans le compartiment d'échantillon du spectromètre réduit le pH de cette solution à son taux original.

R. E. A. GADD and S. CLAYMAN

Research Laboratories, Food and Drug Directorate,
Tunney's Pasture, Ottawa (Ontario, Canada),
2 December 1971.



Effect of Various Treatments on the pH of modified Tyrode's solution. No agitation at 37°C (Closed circles), agitation at 37°C (open circles) and agitation at 37°C in the presence of a 95% O₂-5% CO₂ atmosphere (broken line).

⁸ M. VAN DYK, R. E. A. GADD and S. CLAYMAN, *Lab. Pract.* 20, 582 (1971).

⁹ S. CLAYMAN, R. E. A. GADD and D. HEBERT, *Pharmacologist* 13, 318 (1971).

¹⁰ R. E. A. GADD, S. CLAYMAN and D. HEBERT, *Experientia* 27, 1339 (1971).

¹¹ G. P. KERBY and S. M. TAYLOR, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 136, 452 (1971).

Technique nouvelle d'étude des phénomènes de transport dans le protonéma des Bryales

La morphogénèse des végétaux supérieurs et des champignons¹ est très souvent contrôlée par des phénomènes de transport de métabolites entre les diverses parties de l'organisme. Un centre de synthèses actives détourne à son profit les éléments nutritifs ou les hormones: une carence peut alors être créée au niveau des organes dominés.

Nombreux sont les résultats qui, pour les Bryales, sont apparemment favorables à cette conception. Les cellules apicales responsables de la croissance des filaments seraient les centres d'appel actif de métabolites. Cependant, chaque filament du protonéma est entouré par un mince film d'eau, et d'intenses phénomènes de diffusion rendent difficilement interprétables les résultats obtenus. Quelque soit la technique utilisée: application de substances diverses sous la forme d'un petit bloc d'agar déposé sur les axes, ou technique des milieux de composition différente, séparés par une discontinuité¹, la diffusion est telle, au niveau du film aqueux, que les molécules agissent aussi bien en avant qu'en arrière du point d'application.

Les expériences réalisées par BRANDES² n'ont pas apporté d'amélioration très nette de la technique: les cultures en croissance sur de la cellophane en contact avec

des anneaux de gélose sont mises en présence de ³²P et la radioactivité est testée par autoradiographie. La cellophane permet une trop grande diffusion du phosphate radioactif.

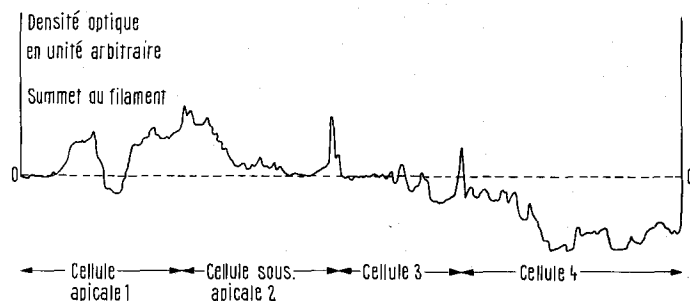
Nous avons mis au point sur le *Ceratodon purpureus* (Hedw.), une technique qui élimine ce phénomène de diffusion. Les cultures de protonéma du *Ceratodon purpureus* (Hedw.) sont réalisées en boîtes de Pétri, étanche «Falcon» (Poly-Labo, Strasbourg) plastique, d'un diamètre égal à 50 mm et d'une hauteur de 12 mm. 3 mm de milieu A (KOFLER³) glucosé à 5 g/l, sont répartis dans chaque boîte de Pétri et recouverts d'une feuille de cellophane stérile selon la technique de BOPP, JAHN et KLEIN⁴. Après l'inoculation, les boîtes sont mises à incuber à l'étuve à 23°C ± 1°C à l'obscurité.

30 h après l'inoculation, les spores germent. Les tubes germinatifs sont de longs filaments ramifiés qui s'orientent verticalement en direction du couvercle sur lequel ils

¹ J. P. LARPENT, *Annls Sci. nat.* 7, 1 (1966).

² H. BRANDES, *Planta* 75, 55 (1967).

³ L. KOFLER, *Revue bryol. lichen.* 28, 1 (1959).



Enregistrement au Chromoscan, à partir d'un film en négatif, d'un filament de protonéma: localisation de la phénylalanine tritiée dans la cellule apicale.

s'étaient. Au 20^e jour de culture, sous les spores et sous la cellophane, 0,02 ml d'une solution de phénylalanine tritiée (25 μ C/ml) est alors déposé à l'aide d'une microsiringue.

48 h après l'application de l'acide aminé marqué, les différentes parties des filaments sont autoradiographiées selon la technique adaptée de KNOPP, HAHN et BOPP⁵.

Les cellules apicales des filaments sont un peu plus fortement marquées que les sous-jacentes (Figure); la phénylalanine est incorporée dans les protéines cytoplasmiques. Les apex seraient donc bien des centres d'appel pour les métabolites. Aucun phénomène de diffusion n'est intervenu, car le marquage observé au niveau des filaments aériens est uniquement intracellulaire.

En attendant de pouvoir expliquer le mécanisme responsable de cette orientation géotropique négative du protonéma du *Ceratodon purpureus*, il est possible d'utiliser cette propriété pour entreprendre l'étude des transports et échanges de divers métabolites au sein du protonéma. Des expériences sont en cours avec des acides aminés et du glucose marqués, métabolites dont on connaît le rôle dans la ramification des axes protonématiques en relation avec

les hormones de type kinétine et auxine, qui interviennent lors de la caulogénèse.

Les premiers résultats obtenus démontrent déjà que certaines molécules circulent dans les deux sens, d'autres au contraire sont transportées en direction acropète. Cette technique doit donc nous permettre d'approfondir la physiologie du protonéma, matériel très favorable à l'étude de la morphogénèse sur des végétaux chlorophylliens.

Summary. A method of detecting translocation of metabolites in protonema of *Ceratodon purpureus* (Hedw.) has been investigated.

M. LARPENT-GOURGAUD

Laboratoire de Phytomorphogénèse,
4, 6, rue Ledru, F-63 Clermont-Ferrand (France),
25 août 1971.

⁴ M. BOPP, H. HAHN et B. KLEIN, *Revue bryol. lichen.* 33, 219 (1964).

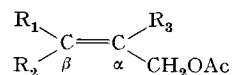
⁵ B. KNOPP, H. HAHN et M. BOPP, *Planta* 88, 288 (1969).

A Simple Method for Conformational Assignment of Trisubstituted Allylic Alcohols

Although there are an increasing number of natural products containing a trisubstituted allylic alcohol grouping in their gross structures, only limited methods¹⁻³ have been proposed for determining the stereochemistry of these compounds. Recent study on Z-E conformational isomerism of nerol and geraniol⁴ prompts us to present our results.

Our method is composed of an acetylation of an alcohol sample and an estimation of relative shift value(s) (ν_{rel}) of appropriate proton signal(s)⁵ with or without an addition of a NMR shift reagent Eu(DPM)₃. As far as an approximate linear relationship is confirmed between shift of the signal and amount of the reagent, the observed ν_{rel} can be easily correlated to a pronounced, structural feature of one isomer and a pure specimen of the other isomer is not necessary for comparison. Thus, the tabulated result clearly indicates that the stereochemistry of the

Relative shift values of trisubstituted allylic alcohols.



A: $R_3 = H$, R_1 or $R_2 = CH_3$

B: $R_3 = CH_3$, R_1 or $R_2 = H$

Relative position against $-CH_2OAc$ group	ν_{rel}^a	$-CH_2-O-$	Examples (acetates) ^b
$C_\alpha-CH_3$ (B)	27-35	singlet	11, 12, 13, 14, 15
$C_\beta-cis-CH_3$ (A and B, $R_2 = CH_3$)	18-21	doublet	1, 3, 5, 6, 7, 8, 13 ^c
$C_\beta-trans-CH_3$ (A and B, $R_1 = CH_3$)	8-11	doublet	2, 4, 9, 10, 12 ^c
$C_\alpha-H$ (A)	48-53	doublet	1, 2, 3, 6, 7
$C_\beta-cis-H$ (B, $R_2 = H$)	30-35	singlet	11, 12
$C_\beta-trans-H$ (B, $R_1 = H$)	17-22	singlet	11, 13, 14, 15

¹ R. B. BATES and D. M. GALE, *J. Am. chem. Soc.* 82, 5749 (1960).

² J. W. K. BURRELL, R. F. GARWOOD, L. M. JACKMAN, E. OSKAY and B. C. L. WEEDON, *J. chem. Soc. (C)*, 2144 (1966).

³ K. C. CHAN, R. A. JEWELL, W. H. NUTTING and H. RAPOPORT, *J. org. Chem.* 33, 3382 (1968).

⁴ J. W. DE HAAN and L. J. M. VAN DE VEN, *Tetrahedron Lett.* 13, 2703 (1971).

⁵ K. TSUKIDA and M. ITO, *Experientia* 27, 1004 (1971).

^a 60 MHz, in CCl_4 . The ν_{rel} refers to a relative paramagnetic shift against acetoxyl group ($\nu_{rel} = 100.0$). ^b Compounds reported herein had correct spectral data. 1. geraniol; 2. nerol; 3. phytol; 4. *trans*-crotyl alcohol; 5. *cis*-crotyl alcohol; 6. *trans*- β -ionylidene-ethanol; 7. all-*trans*-vitamin A₁; 8. 9-*cis*-vitamin A₁; 9. 13-*cis*-vitamin A₁; 10. 9,13-dicis-vitamin A₁; 11. β -methallyl alcohol; 12. tiglyl alcohol; 13. angelyl alcohol; 14. α -santalol; 15. β -santalol. ^c $-CH_2-O-$: singlet.