

Auch in dieser Versuchsanordnung verhält sich Chlorazin ähnlich wie CMU und deutlich verschieden von 2,4-D und CIPC.

Gestützt auf die Laboratoriums- und Gewächshausversuchsergebnisse wurde G 25 804 zu einer praktischen Prüfung als Pre-emergence<sup>1</sup> und Kontaktherbizid vorgeschlagen und 1954 in orientierenden Freilandversuchen in der Schweiz und in Amerika geprüft. Über seine Untersuchungen hat H. M. DAY am Meeting der Southern Weed Control Conference<sup>2</sup> am 17. Januar 1955 vorgetragen.

Diese Versuche haben bestätigt, dass Chlorazin, in geeigneten Konzentrationen angewandt, insbesondere in Baumwoll- und Bohnenkulturen eine gute Wirksamkeit u.a. gegenüber Raygras (*Lolium perenne* L.), Hühnerdarm (*Stellaria media* Vill.), Bluthirse (*Digitaria sanguinalis* Scop.) und Spitzwegerich (*Plantago lanceolata* L.) hat, ohne die Nutzpflanzen wesentlich zu beeinflussen. Über weitere Untersuchungen mit Chlorazin soll später berichtet werden.

A. GAST, E. KNÜSLI und  
H. GYSIN

*Aus den Forschungslaboratorien der J. R. Geigy AG.,  
Basel, den 13. Dezember 1954.*

#### Summary

It has been demonstrated that 2-chloro-4,6-bis-(diethylamino)-s-triazine (G 25 804, common name: Chlorazin) shows remarkable phytotoxic reactions. The possible use of Chlorazin as a pre- and post-emergence herbicide is discussed.

<sup>1</sup> Als Pre-emergence-Herbizide werden in der angelsächsischen Literatur Unkrautmittel bezeichnet, welche vor der Keimung der Kulturpflanzen auf die Oberfläche des besäten Feldes appliziert werden. Besonderes Interesse bieten dabei Mittel, welche selektiv wirken, das heisst die keimende Unkrautflora vernichten, ohne die Kulturpflanzen zu schädigen.

<sup>2</sup> J. ANTOGNINI und H. M. DAY, *Exp. Comp.* 444 (entspricht G 25 804 = Chlorazin) a Pre- and Post-emergence Herbicide.

#### Einfluss von Streptomycin und von Tetracyclinen auf die Entwicklung keimender Samen

Lässt man die Samen von Getreidearten, zum Beispiel Gerste, nach Behandlung mit Lösungen von Streptomycin geeigneter Konzentration zwischen Filterpapier und dann am Tageslicht keimen, so bleiben die Keimblätter, auch im Licht, farblos, ihr Katalasegehalt ist stark vermindert, und es besteht anscheinend eine gewisse Analogie der so gebleichten Pflanzen mit den chlorophylldefekten Mutanten, welche zum Beispiel bei Albina von Gerste spontan oder in höherem Grad nach Röntgenbestrahlung auftreten<sup>1</sup>.

Die Wurzeln der durch Streptomycin behandelten Samen sind anomal kurz und zeigen deutlich Klauenform, die aber nicht für die Streptomycinwirkung spezifisch ist.

An der Flagellate *Euglena gracilis* wurde dieser Chlorophylleffekt des Streptomycins von PROVASOLI, HUTNER

und SCHATZ<sup>1</sup> bestätigt und von HUTNER und seiner Schule<sup>2</sup> durch genetisch bemerkenswerte Versuche an Flagellaten erweitert. Weitere diesbezügliche Versuche verdankt man besonders SCHOPFER<sup>3</sup> und ROSEN<sup>4</sup>. Ebenfalls Hemmungen der Chlorophyllbildung durch Streptomycin beobachteten BOGORAD<sup>5</sup> an Fichtensamen, WRIGHT<sup>6</sup> an Weizen und Rettichsamen und DUBÉ (1952) an *Chlorella*<sup>7</sup>.

Die erwähnte Hemmung der Chlorophyllbildung konnten wir ausser durch Streptomycin auch durch Dihydro-streptomycin hervorrufen; mit anderen Stoffen konnte bisher ein solcher Effekt nicht erzeugt werden.

Da wir hofften, die chemischen Vorgänge, die bei den chlorophylldefekten Gerstenmutanten vom Albinotypus auftreten, durch das Studium von chemisch induzierten Analogiefällen aufzuklären zu können, haben wir systematisch Stoffe gesucht, die – ähnlich wie Streptomycin – Chlorophyllbildung in keimenden Samen beeinflussen. Strukturanalogen scheinen hierbei nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, jedenfalls sind keine solchen erkannt worden. Wir haben deshalb Stoffe zum Vergleich herangezogen, welche, wie Streptomycin, in *Actinomyceten* vorkommen. Zu diesen Stoffen, den Actinomycinen, gehören – ausser dem zuerst von WAKSMAN und WOODRUFF<sup>8</sup> isolierten Actinomycin A und dem von BROCKMANN<sup>9</sup> mit Erfolg bearbeiteten Actinomycin C – auch die *Tetracycline*, die wegen ihrer hohen Aktivität und ihres breiten Wirkungsbereiches (wir vermeiden den ungeeigneten Ausdruck «Wirkungsspektrum») bereits eine weitgehende medizinische Anwendung gefunden haben.

Chlortetracyclin (Aureomycin), Tetracyclin (Akromycin) und Oxytetracyclin (Terramycin,) deren Konstitutionsformeln hier als bekannt vorausgesetzt werden dürfen, sind in bezug auf ihre antibakterielle Wirkung *in vitro*<sup>10</sup> und *in vivo*<sup>11</sup> (an mit verschiedenen Bakterien infizierten Mäusen) und im übrigen pharmakologisch<sup>12</sup> in *Lederle Laboratories Division* sehr eingehend geprüft worden und haben sich als einander sehr ähnlich erwiesen, wenn auch gewisse Unterschiede festgestellt werden konnten.

*Keimungsversuch mit Tetracyclinen.* Zur Verwendung kamen die Samen<sup>13</sup> von Gerste (*Hordeum distichum*), Weizen (*Triticum vulg.*, Bancovete) und Hafer (*Avena sativa*, Bancovahre II), von denen wir je 50 Körner der Einwirkung von 5 bis 25 mg Antibiotikum unterwarfen, in der gleichen Weise wie früher Streptomycin. Einige

<sup>1</sup> L. PROVASOLI, S. H. HUTNER und A. SCHATZ, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 69, 279 (1951).

<sup>2</sup> L. PROVASOLI, S. H. HUTNER und I. J. PINTNER, Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol. 16, 113 (1951).

<sup>3</sup> W. H. SCHOPFER und Mitarbeiter, Arch. Sci. 5, 9 (1952); Soc. Helv. Sci. nat. 1956, 320. – Bull. Soc. chim. Biol. 36, 1195 (1954).

<sup>4</sup> W. ROSEN, Ohio J. Sci. 54, 73 (1954); Soc. exp. Biol. Med. 85, 385 (1954).

<sup>5</sup> I. BOGORAD, Amer. J. Bot. 37, 676 (1950).

<sup>6</sup> J. M. WRIGHT, Ann. Bot. 15, 493 (1951).

<sup>7</sup> R. GIULIANO, M. L. STEIN und H. v. EULER, Ark. Kemi 6, Nr. 53 (1954).

<sup>8</sup> S. A. WAKSMAN und H. B. WOODRUFF, J. Bact. 40, 585 (1940).

<sup>9</sup> H. BROCKMANN und Mitarbeiter, Naturwissenschaften 36, 376 (1949). – Siehe auch Actinomycin X in Naturwissenschaften 40, 225 (1953). – CHR. HACKMANN, Z. Krebsf. 58, 607 (1952); Strahlenther. 1953, 296.

<sup>10</sup> N. BOHONOS et al. Antibiotics Ann. 1953–1954, 49.

<sup>11</sup> J. S. KISER et al. Antibiotics Ann. 1953–1954, 57.

<sup>12</sup> R. W. CUNNINGHAM et al. Antibiotics Ann. 1953–1954, 63.

<sup>13</sup> Wir danken Herrn Direktor Dr. H. LAMPRECHT, Weibullsholm, für das sehr keimkräftige Samenmaterial, Herrn Professor Dr. Å. AKERMAN, Svalöv, für die freundliche Überlassung von Gerstenmutanten vom Albinotypus.

<sup>1</sup> B. v. EULER, Kem. Arb. [NF. II] 9, 1 (1947). – M. BRACCO und H. v. EULER, Kem. Arb. [NF. II] 10, I und II (1947). – H. v. EULER, Ark. Kemi, Min. Geol. [A] 26, Nr. 6 (1948); Ark. Kemi 1, Nr. 31 (1949). – H. v. EULER und L. HELLER, Ark. Kemi 1, Nr. 31 (1949); C. r. Acad. Sci. 227, 16 (1948). – Siehe auch: F. CEDRANGOLO, Acta Pont. Acad. Sci. 14, Nr. 7 (1951).

Actinomycine haben sich beim Keimungstest als toxisch erwiesen. Es muss gleich betont werden, dass die mit Gerste, Weizen und Hafer erhaltenen Resultate erhebliche Unterschiede<sup>1</sup> bezüglich des Einflusses der Antibiotikummenge und der Azidität (pH) gezeigt haben.

Reine Präparate der untersuchten Antibiotika bzw. ihrer Hydrochloride verdanken wir der *American Cyanamid Comp., Lederle Laboratories Division, Pearl River*.

Bei unseren hier kurz mitzuteilenden Versuchen hat es sich zunächst um einen Vergleich gehandelt zwischen unseren chemisch induzierten, den mittels Röntgenstrahlen<sup>2</sup> induzierten und den in Albinamutanten der Gerste spontan auftretenden Chlorophylldefekten.

Bezüglich der Methodik verweisen wir auf die früheren Arbeiten dieses Institutes; die Behandlung der Samen geschah teils direkt in den Lösungen des Antibiotikums, teils nach sechsständigem Quellen in Wasser. Wenn die Keimlinge eine Länge von 1 bis 3 mm erreicht hatten, wurden die Samen zwischen Filterpapier in Schalen ausgebreitet und nach etwa 3 Tagen dem freien Tageslicht ausgesetzt. Stets Parallelversuche mit reiner Wasserkeimung. Azidität der Lösungen stets pH 5,5–5,8.

*Aureomycin*. Die Keimung sowohl der Gersten- wie der Weizensamen war schon in den verdünntesten Aureomycinlösungen gegenüber den Parallelversuchen in Wasser 3 Tage verzögert, aber fast alle Samen (96%) keimten. Bei der Konzentration 10 mg Aureomycin per 100 ml Lösung wurden nach 6 Tagen die Keimlinge sichtbar. Besonders stark gehemmt war durchweg die Bildung der Wurzeln, die nie länger als 5 mm wurden (normale Länge in dieser Zeit 70 mm). Innerhalb von 15 Tagen erreichten die Keimlinge nach Quellung in Lösungen von 5 mg % Aureomycin die mittlere Länge von 40 mm; die Keimblätter ragten dann etwa 4–6 mm aus den Coleoptilen heraus. Sie waren nach zwölftägigem Stehen in hellem Tageslicht noch – je nach der Konzentration des Aureomycins – rein weiß oder ganz hellgrün, und der schwache Chlorophylleinhalt nahm auch nach weiteren 10 Tagen nicht mehr zu. Bei den Kontrollwasser-Versuchen betrug die mittlere Länge der Keimblätter in 15 Tagen 160 mm.

*Achromycin (Tetracyclin)*. Verwendet zur Quellung wie Aureomycin in Lösungen von 2 bis 40 mg je 100 ml. Von den kleinsten Konzentrationen an vollständige (96%ige), aber sehr verzögerte Keimung, die in 20 Tagen bis zu einer Länge der Keimblätter von etwa 20 mm fortsetzt, Wurzeln immer klauenförmig und höchstens 10 mm lang.

Wenn nach 7–12 Tagen die Keimblätter aus den stets weissen Coleoptilen hervortreten und dann dem Tageslicht ausgesetzt sind, tritt bei Gerste, Weizen und Hafer eine schwache Ergrünung ein. Die Katalasewirkung dieser Blatteile beträgt dann im Mittel 40% der Katalasewirkung der grünen Blätter. Beim Hafer macht sich ein Maximum des Chlorophyldefektes mit der Achromycin-Konzentration deutlicher bemerkbar als bei Gerste und Weizen. Das Maximum tritt bei etwa 5 mg Achromycin je 100 ml ein. Bei dieser Konzentration bleiben die Keimblätter viel bleicher als die normalen. Besonders empfindlich gegen die Einwirkung von Aureomycin und Achromycin sind die Samen der Gerstenmutanten

(Albinatypus). Sie entwickeln nur minimale Wurzeln und (durch 5 mg Achromycin) Keimblätter, die nie länger sind als 11 mm.

*Terramycin (Tetracyclin)* übt im wesentlichen den gleichen Einfluss auf die Samenkeimung aus wie Achromycin. Bei der Konzentration 10 mg je 100 ml bleibt etwa 1/5 der 18 mm langen Keimlinge ganz weiß, die übrigen Keimblätter sind schwach grünlich.

Nach den Tetracyclinen wurden noch zwei weitere Actinomycine untersucht. *Neomycin A*<sup>1</sup> wurde aus dem Neomycin-Sulfat A (LEDERLE) durch Baryt freigesetzt; es steht mit der Formel  $C_{12}H_{28}N_4O_6$  dem Streptomycin strukturell nahe<sup>3</sup>. Nach Quellung in Lösung von 10 mg je 100 ml entwickelten sich die Samen von Gerste und Weizen gut, was der geringen Toxizität des Neomycins entspricht. Nach 8 Tagen erreichten die Keimlinge fast die gleiche Länge wie in den Parallelversuchen mit Wasser; sie waren normal grün, obwohl die Wurzeln nur 4–7 mm lang (normale Länge 50–60 mm) und klauenförmig waren.

*Fällung der Nukleinsäure durch Neomycin*. Streptomycin und Dihydrostreptomycin haben die Fähigkeit, Nukleinsäuren und Nukleoproteide zu fällen; diese Wirkungen sind früher von uns in Gemeinschaft mit GIULIANO<sup>3</sup> gemessen worden. Zum Vergleich seien hier die folgenden Zahlen für Neomycin angegeben:

Konzentration der Nukleinsäure	Molarität des Neomycins				
	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200
0,1 %	+++	++	–	–	–
0,05 %	+++	+++	+++	+	–
0,025 %	++	+++	+++	++	–
0,0125 %	++	++	++	++	–

Die fällende Wirkung des Neomycins zeigt sich noch grösser als die früher (1.c.) bestimmte Wirkung des Dihydrostreptomycins.

Durch die Gegenwart von Salzen von höherer Molarität als 0,02 wird diese Fällungswirkung stark erniedrigt. Über den Einfluss des Cysteins auf die Nukleoproteidfällung durch Neomycin wird an anderer Stelle berichtet. ZIEGLÉ<sup>4</sup> fand die antibiotische (bakterizide) Wirkung des Neomycins auf einen Stamm von *Klebsiella pneumoniae* höher als diejenige des Streptomycins<sup>5</sup>.

Jedenfalls zeigt sich, dass das Neomycin auch in Hinblick auf die Nukleinsäure- und Nukleoproteidfällungen dem Streptomycin nahestehrt. Die hier untersuchten Tetracycline besitzen keine Fällungswirkung gegen Nukleinsäuren und Nukleoproteide. *Pikromycin*<sup>6</sup>,  $C_{22}H_{48}O_7N$ , hemmt die Keimung von Weizen und Gerste schon nach der Quellung in Lösung von 10 mg je 100 ml fast vollständig.

Was die Chlorophyldefekte betrifft, so unterscheiden sich die durch Tetracycline hervorgerufenen wesentlich von den durch Streptomycin und Dihydrostreptomycin erzeugten sowie von den bei Mutanten vom Albinatypus auftretenden: Während nach der Streptomycinbehandlung neben normal grünen Keimblättern nur rein weiße (eventuell mit grünen Spitzen), nie aber mehr

<sup>1</sup> Starke Unterschiede zwischen verschiedenen Getreidearten sind schon bezüglich anderer chemischer Einflüsse, zum Beispiel von Carbamaten, gefunden worden. Siehe W. G. TEMPLEMAN und W. A. SEXTON, Nature 156, 630 (1945). – MICHELL, MARTIN und PRESTON, jr., Science 120, 263 (1954).

<sup>2</sup> Siehe Å. GUSTAFSSON, Hereditas 28, 483 (1942). – H. V. EULER, B. BERGMAN, H. HELLSTRÖM und D. BURSTRÖM, Hereditas 21, 119 (1934). – G. HOLM, Acta Agric. Scand. 4, 466 (1954).

<sup>1</sup> Neomycin, entdeckt von S. A. WAKSMAN und H. A. LECHER-VALIER, Science 109, 305 (1940).

<sup>2</sup> KUEHL et al. J. Amer. Chem. Soc. 71, 2590 (1949).

<sup>3</sup> R. GIULIANO, M. L. STEIN und H. v. EULER, Ark. Kemi 6, Nr. 53 (1954).

<sup>4</sup> L. ZIEGLÉ, C. r. Acad. Sci. 231, 310 (1950).

<sup>5</sup> H. BROCKMAN und Mitarbeiter, Chem. Ber. 84, 284 (1951); 87, 856 (1954).

oder weniger hellgrüne Keimblätter auftreten, erscheinen nach der Quellung in Aureomycin- und in Achromycinlösungen (oder in einem Gemisch beider) je nach Menge des Tetracyclins und Dauer der Einwirkung alle Grade der Bleichung. Zum Teil beruht dieser Unterschied darauf, dass Streptomycin (wie auch Neomycin) weniger keimungshemmend ist als Aureomycin, so dass man letzteren Chlorophylldefekt nur in einem später eintretenden, aber weniger fortgeschrittenen Keimungsstadium beobachten kann. In diesem Zusammenhang mag noch erwähnt werden, dass Aureomycin *in vitro* die Succinodehydrogenase hemmt (blockiert).

Andere Arten von Chlorophyllhemmungen als die hier besprochenen sind früher von uns<sup>1</sup> erwähnt worden.

Über die Biochemie der Tetracycline, besonders des Aureomycins, findet man in der Literatur wertvolle Angaben. Die toxischen Wirkungen, welche Aureomycin im tierischen Stoffwechsel ausübt, konnten durch Versuche von LOOMIS sowie von METER, OLESEN und WILLIAMS<sup>2</sup> auf die Hemmung der oxydativen Phosphorylierung zurückgeführt werden. Dieselbe wird durch einen Enzymkomplex in den Mitochondrien vermittelt. Von wesentlichem Interesse ist der Nachweis (ROINE<sup>3</sup>), dass Aureomycin nach peroraler Eingabe einen erheblichen Einfluss auf die Bakterienflora des Darms ausübt. Der Gehalt des Aureomycins im Serum nach oraler Eingabe wird durch Zitronensäure, Brenztraubensäure oder andere stark erhöht<sup>4</sup>. Zahlreichen Angaben zufolge ist Aureomycin ein spezifisches Mittel zur Virus-Bekämpfung. Diese und andere Ergebnisse haben uns veranlasst, den Einfluss des Aureomycins auf die frischen Tumorzellen des Yoshida-Ascites-Tumors zu untersuchen.

Von diesen an anderer Stelle demnächst mitzuteilenden Versuchen sei hier nur folgendes erwähnt:

0,3–0,5 ml Ascites unserer Yoshida-Ascites-Tumorzellen wurden mit dem gleichen Volumen von Aureomycinlösungen verschiedener Konzentration (pH 7) 22 h bei 0° inkubiert und dann den Versuchsratten intraperitoneal eingespritzt. Wenn der verwendete Ascites 150 000–200 000 Tumorzellen je Kubikmillimeter enthielt, so waren zur Inkubation rund 4 mg Aureomycin erforderlich, um die Tumorentwicklung zu verhindern. Die tumorhemmende Wirkung des Achromycins war wesentlich schwächer, diejenige des Neomycins war nicht sicher nachweisbar.

H. v. EULER und M. L. STEIN

*Institut für organisch-chemische Forschung der Universität Stockholm, den 10. November 1954.*

### Summary

EULER (1947) and M. L. STEIN (1953) had observed that germinating seeds of barley, rye, wheat and other grasses are colourless when exposed to solutions containing more than 0.2% of streptomycin or dihydrostreptomycin. These plants are not inhibited in growth. The chlorophyll already formed is not destroyed by streptomycin.

The present authors describe the bleaching effect on germinating seeds of chlortetracycline and tetracycline.

<sup>1</sup> H. v. EULER, Z. physiol. Chem. 295, 411 (1953). – Siehe auch C. L. HAMNER und H. B. TUKEY, Bot. Gazz. 112, 525 (1952).

<sup>2</sup> J. C. METER, J. J. OLESEN und J. H. WILLIAMS, Science 113, 273 (1951). – Proc. exp. Biol. Med. 81, 215 (1952). – H. A. LARDY, J. Biol. Chem. 195, 215 und 225 (1952).

<sup>3</sup> P. ROINE und T. ETALA, Nature 169, 1014 (1952).

<sup>4</sup> H. J. EISNER et al., Pharm. exp. Therap. 108, 442 (1951).

These antibiotics inhibit or reduce the formation of chlorophyll in germinating seeds but the authors could not obtain this inhibition without toxic effects (reduced growth). Contrary to streptomycin, the tetracyclines are not able to precipitate nucleic acids and nucleoproteins.

### On the Irreversible Agglutination of the Sperm of the Sea-Urchins Caused by the Sperm Extract

Antifertilizin, a substance neutralizing the sperm agglutinating effect of egg-water of the sea-urchin, was extracted from the sperm first by FRANK<sup>1</sup>. Later TYLER and O'MELVENY<sup>2</sup> described an acid soluble substance, which is extracted by acidulated sea-water. As to the action of antifertilizin in neutralizing fertilizin, agglutinating the eggs, dissolving the gelatinous coat of the egg, paralyzing the sperm and activating the unfertilized egg, this has been previously reported (TYLER; WICKLUND<sup>3</sup>).

In the present experiment a new method of extraction of antifertilizin was used. The materials used were the sea-urchins *Paracentrotus lividus* and *Arbacia lixula*. About 10 cm<sup>3</sup> of sperm suspension in sea-water were fixed by adding 50 cm<sup>3</sup> of acetone. The solid fraction was collected on filter paper, and was then suspended in 20 cm<sup>3</sup> of distilled water by vigorous shaking. The suspension was acidulated by adding 5 cm<sup>3</sup> of N/10 HCl, and gently heated by boiling and after cooling filtered. The filtrate thus obtained was brought to pH 8 before use.

The sperm extract of both species of sea-urchins show a remarkable power to agglutinate the sperm of both species irreversibly. The sperm cells move actively in dilute solutions of the sperm extracts at the beginning and then form spherical masses. The mode of agglutination at the beginning is nearly the same as that caused by egg-water of the same species. Within 10 min the sperm cells form clots of irreversible agglutination. The sperm extracts of *Paracentrotus* and *Arbacia* cause the irreversible agglutination on the sperm of *Paracentrotus* up to 40 and 20 times dilution with sea-water respectively. The agglutination of the sperm of *Arbacia* is also observable in the presence of excess of NaHCO<sub>3</sub>. After mixing equal volumes of sperm extract and M/2 NaHCO<sub>3</sub>, the mixture is diluted with sea-water. The above mentioned extracts of *Paracentrotus* and of *Arbacia* show irreversible agglutination of the sperm of *Arbacia* up to 16 and 64 dilutions respectively. The agglutination is not observable in the control (mixture of bicarbonate and sea-water).

The eggs agglutinate instantaneously by sticking to each other forming a precipitation membrane on the surface of the jelly-coat, when they are put into the neutralized extracts. The sperm extract of *Paracentrotus* shows the ability of egg agglutination up to 40 and 160 dilutions to the eggs of *Paracentrotus* and of *Arbacia* respectively, and that of *Arbacia* is effective up to 20 and 80 dilutions to the eggs of those species respectively. The egg of *Arbacia* is therefore more sensitive to the extracts.

The extracts also show the capacity to neutralize the fertilizin, the sperm agglutinin of egg-water. The egg-

<sup>1</sup> J. A. FRANK, Biol. Bull. 76, 199 (1939).

<sup>2</sup> A. TYLER and K. O. MELVENY, Biol. Bull. 81, 364 (1941).

<sup>3</sup> A. TYLER, Physiol. Rev. 28, 180 (1948). – E. WICKLUND, Ark. Zool. [A] 40, Nr. 5 (1948).