

auch bei den 0-Minuten-Ansätzen sichtbar wird. Aus unseren Versuchen geht hervor, dass Calcium, wie Phenyläthylamin und Tyramin (SCHÜMANN und WEIGMANN³), in der Lage ist, aus den isolierten Nebennierenmarkgranula Brenzcatechinamine freizusetzen, während Acetylcholin keinen Einfluss hat.

Summary. (1) Experiments on isolated perfused suprarenals of cattle have shown that the acetylcholine-induced release of catechol amines, but not that of phenylethylamine, is dependent on calcium, since a perfusion with calcium-free Tyrode's solution abolishes the action of acetylcholine and not that of phenylethylamine. (2) In incubation experiments with isolated chromaffin granules, calcium produces a dose-dependent, significant release of

catechol amines even in physiological concentrations (2.5 mM). (3) Acetylcholine does not release catechol amines from isolated granules, either in the presence or in the absence of calcium.

A. PHILIPPU⁷ und H. J. SCHÜMANN⁸

Pharmakologisches Institut der Universität Frankfurt am Main (Deutschland), 12. Dezember 1961.

⁷ Forschungs-Stipendiat der A. von Humboldt-Stiftung.

⁸ Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Vergleich der Alkaloidbildung von *Claviceps purpurea* in parasitischer und saprophytischer Kultur¹

Wir züchteten Stämme von *Claviceps purpurea* einerseits auf diploidem Petkuserroggen, andererseits als Oberflächenkultur auf Nährlösung und verglichen die Mengen und die Art der dabei gebildeten Alkaloide.

Ausgangsmaterial. Wir verwendeten je einen mit Mikromanipulator aus Konidien isolierten Einsporstamm von Ergotamin-reichem und Ergocornin-Ergokryptin-reichem Mutterkorn sowie eine durch UV-Bestrahlung erzeugte alkaloidreiche Mutante eines Ergocornin/Ergokryptin-Stammes (Tabelle I). Als Impfstoff wurden Konidienaufschwemmungen von 20 Tage alten Bierwürzeagarkulturen hergestellt.

Parasitische Züchtung:

Der Roggen wurde Anfang Mai mit Impfbrett in die schlüpfenden Ähren geimpft.

Für die Untersuchung wurde nur durch Primärinfektion gebildetes Sklerotienmaterial verwendet.

Saprophytische Züchtung:

Folgende Nährlösung wurde nach Sterilisation (30 min, 110°C) mit Konidien dicht beimpft: Saccharose: 100 g, Ca(NO₃)₂: 1 g, KH₂PO₄: 0,25 g, MgSO₄: 0,25 g, KCl: 0,12 g,

Tab. I. Ernteergebnisse bei parasitischer Züchtung

Stamm	Erntegewicht kg/Äre	Alkaloidgehalt der Sklerotien ^b
I ^a	2,58	0,33%
II	2,27	0,70%
III	2,33	1,01%

^a I Ergotaminstamm; II Ergocornin/Ergokryptin-Stamm; III Ergocornin/Ergokryptin-Mutante. ^b Kolorimetrisch nach Van Urk-Smith bestimmt und auf Molekulargewicht 600 bezogen.

Tab. II. Ernteergebnisse bei saprophytischer Züchtung (nach ca. 60 Tagen)

Stamm	Erntemenge pro l Nährlösung		Alkaloidgehalt ^b	
	Trockenmycel g	Filtrat ml	Trockenmycel %	Filtrat mg/l
I ^a	25	625	0,16	117
II	21,3	650	0,48	123
III	27,5	625	0,55	87

^a ^b siehe Tabelle I.

¹ 53. Mitteilung über Mutterkornalkaloide. 52. Mitt. s. Helv. chim. Acta 45, 276 (1962).

Tab. III. Zusammensetzung des Alkaloidgemisches

Alkaloide	Stamm I ^a			Stamm II			Stamm III		
	Sklerotien	Mycel	Filtrat	Sklerotien	Mycel	Filtrat	Sklerotien	Mycel	Filtrat
Totalgehalt (<i>M</i> = 600)	0,33%	0,16%	117 mg/l	0,70%	0,48%	123 mg/l	1,01%	0,55%	87 mg/l
Ergotamin	76,0	44,4	2,4	1,7	—	—	0,6	0,2	—
Ergotaminin	12,1	28,5	6,5	0,3	—	—	—	—	—
Ergocornin	0,9	2,6	0,3	25,6	21,7	4,2	29,5	26,2	6,5
Ergokryptin				23,6	21,7	3,0	27,3	26,2	4,1
Ergocorninin + Ergokryptinin	0,9	5,3	1,4	14,0	27,8	7,8	15,1	35,0	16,1
Ergosin				17,1	3,0	1,8	13,0	3,1	2,8
Ergosinin	—	—	—	3,7	0,7	1,2	3,1	1,2	0,4
Ergobasin	8,2	5,9	28,5	11,5	4,5	18,7	9,2	3,5	21,6
Ergobasinin	0,9	5,3	14,5	1,4	3,5	21,7	0,7	1,4	12,9
Lysergsäureamid	0,4	1,3	0,7	0,3	—	1,8	0,4	0,3	3,5
Chanoclavin	0,3	5,3	32,2	0,3	1,5	15,6	0,5	1,9	18,4
Elymoclavin	—	—	—	—	3,0	6,0	—	0,7	2,3
Agroclavin	0,3	0,7	0,7	—	12,6	9,6	—	—	0,4
Penniclavin	—	—	0,7	—	—	6,0	—	—	5,5
Andere Clavine	—	0,7	5,1	—	Spur	2,6	—	0,3	—
Unbekannte	—	—	7,0	0,5	—	Spur	0,6	—	5,5

Die Verteilung wird in Prozenten des Gesamtgehaltes angegeben. Der Berechnung wurde für alle Alkaloide das Molekulargewicht 600 zugrundegelegt. — ^a Siehe Tabelle I.

Glykokoll: 10 g, Aneurin: 0,1 mg, Cystein: 10 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 8,3 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 3,4 mg, Leitungswasser ad 1 l, pH mit HNO_3 auf 4,2. Der genannte Zusatz von Fe^{++} und Zn^{++} ist für die verwendeten *Claviceps*-Stämme optimal und wesentlich². Die Kulturen wurden bei 24°C im Dunkeln inkubiert. Nach 10 Tagen hatte sich eine dünne, weisse Myceldecke gebildet. Nach 20 Tagen war das Mycel dick und begann sich rötlich zu verfärben. Nach 60 Tagen waren Mycel und Nährlösung dunkelviolettblau verfärbt (Tabelle II).

Alkaloidverteilung. Nach Extraktion der Gesamtalkaloide wurde die Zusammensetzung des Gemisches durch quantitativ-papierchromatographische Methoden^{1,3} ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle III wiedergegeben.

Es zeigt sich, dass das Alkaloidspektrum in saprophytischer Kultur nur kleine Abweichungen gegenüber jenem in parasitischer Kultur aufweist. Bezüglich des quantitativen Anteiles der einzelnen Alkaloide innerhalb des

Spektrums sind zum Teil erhebliche Unterschiede feststellbar.

Summary. Three monoconidial strains of *Claviceps purpurea* were grown parasitically on rye and saprophytically on a nutrient medium. The qualitative alkaloid spectra were nearly identical in the sclerotia and in the corresponding saprophytic cultures, while the quantitative distribution of some of the alkaloids differed considerably.

H. KOBEL, R. BRUNNER und A. BRACK

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium SANDOZ, Basel (Schweiz), 29. Dezember 1961.

² A. STOLL, A. BRACK, A. HOFMANN und H. KOBEL, U.S. Patent Nr. 2809920 (1957).

³ A. STOLL und A. RÜEGGER, Helv. chim. Acta 37, 1725 (1954).

Végétalisation de l'œuf de l'oursin *Paracentrotus lividus* par le chloramphénicol

Au cours de son développement, l'œuf d'oursin élabore les protéines nécessaires à la différenciation de l'embryon. On peut en inférer que les modifications expérimentales de la différenciation perturbent les synthèses protéiques. Réciproquement des modifications de la différenciation embryonnaire doivent pouvoir être provoquées par des substances chimiques capables d'altérer le métabolisme des protéines. Chez l'oursin le développement peut être modifié expérimentalement en traitant les œufs par des substances chimiques déterminées. C'est ainsi que le lithium provoque la végétalisation, c'est à dire l'extension des structures entomésodermiques¹. L'animalisation, phénomène correspondant à l'extension des structures ectodermiques, est aisément obtenue avec les ions zinc² et certains dérivés polysulfoniques³. Différentes indications ont déjà été recueillies montrant que les agents actifs sur la détermination embryonnaire perturbent également le métabolisme protéique. Le lithium ralentit la synthèse des protéines⁴ et inhibe l'élaboration de certaines enzymes mitochondriales⁵. Un nombre croissant de données indique que la plupart des protéines cellulaires sont synthétisées au niveau des particules ribonucléoprotéiques, les ribosomes⁶. Or nous avons montré dès 1950⁷ que le lithium change la distribution de l'acide ribonucléique dans les particules ribonucléoprotéiques cytoplasmiques. Toutes ces observations suggèrent que les effets végétalisants du lithium sont liés à des perturbations des synthèses protéiques. Des recherches ont été faites en vue de changer la différenciation de l'œuf d'oursin en agissant sur les synthèses protéiques avec des analogues d'acides aminés. Une végétalisation assez faible a pu être obtenue avec certains d'entre eux en combinant leur action avec celle du lithium. Cette action peut toutefois être rattachée à d'autres propriétés de ces substances telles que, par exemple, leur tensioactivité ou leurs propriétés chélatrices⁸.

Dans le présent travail nous examinerons les effets d'un inhibiteur des synthèses protéiques, le chloramphénicol⁹ sur la différenciation de l'œuf de l'oursin *Paracentrotus lividus*. Nous étudierons également l'influence du chloramphénicol sur les effets végétalisants du lithium et sur l'animalisation provoquée par les ions zinc et un colorant polysulfonique, le bleu d'Evans.

Aux concentrations comprises entre 2 et 1 mg/ml, le chloramphénicol inhibe la division cellulaire; cette action est d'autant plus forte que la concentration est plus élevée. Les anomalies de la segmentation sont variées. L'inhibition peut être totale, empêchant complètement la formation des deux premiers blastomères. Souvent un seul des deux premiers blastomères est bloqué, tandis que l'autre subit une série de segmentations. Les blastomères polynucléés sont fréquemment observés. Dans les cultures contenant de 1 à 0,7 mg/ml de chloramphénicol, la proportion d'œufs arrêtés au cours de la segmentation diminue et le développement se poursuit, bien que fortement ralenti, jusqu'au stade blastula. Ces blastulas, après éclosion, s'agglomèrent très facilement en formant des masses arrondies constituées de dizaines ou même davantage de larves. On rencontre tous les intermédiaires entre l'adhérence simple par contact avec conservation de la structure des blastulas et la fusion complète avec coalescence des blastocèles. Laisser en présence de chloramphénicol, les blastulas se lysent et la lyse commence généralement par les cellules du pôle animal. Les embryons traités pendant 23 h par le chloramphénicol puis reportés, après lavages, dans l'eau de mer, achèvent de s'y développer en formant des larves végétalisées typiques. Tous les degrés de végétalisation comparables à ceux provoqués par le lithium ont été obtenus en traitant les œufs pendant 23 h par le chloramphénicol. Les concentrations les plus favorables pour obtenir la végétalisation vont de 1 mg/ml à 0,7 mg/ml.

En raison de son activité végétalisante propre le chloramphénicol doit être capable d'augmenter les effets végétalisants de faibles quantités de lithium. Nous avons effectivement observé que les œufs traités simultanément par le chloramphénicol (0,5 mg/ml) et le chlorure de lithium (0,0065 M) se développent en embryons fortement

¹ C. HERBST, Z. wiss. Zool. 55, 446 (1892).

² R. LALLIER, Arch. Biol. 66, 75 (1955).

³ R. LALLIER, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 30, 185 (1957).

⁴ T. GUSTAFSON et M. B. HJELTE, Exp. Cell Res. 2, 474 (1951).

⁵ T. GUSTAFSON et I. HASSELBERG, Exp. Cell Res. 2, 642 (1951).

⁶ P. Z. ZAMECNIK, The Harvey Lectures 1958-1959, 256.

⁷ R. LALLIER, Bull. Soc. Chim. Biol. 32, 451 (1950).

⁸ T. GUSTAFSON et S. HÖRSTADIUS, Exp. Cell Res. Suppl. 3, 170 (1955).

⁹ E. F. GALE et J. P. FOLKES, Biochem. J. 53, 493 (1953).