

sucht und einem papierchromatographischen Trennungsversuch weiter unterworfen.

Der Rückstand wurde dann in 0,5 ml bidestilliertem Wasser/g des ursprünglichen Aphidenfrischgewichts gelöst, je 0,5 ml auf die Startlinie von 20 cm Breite der zur Chromatographie vorbereiteten Whatmann-1-Filterpapiere aufgetragen und in einem *n*-Butanol-Azeton-Wassergemisch (5:1:2) absteigend chromatographiert. Nach dem Trocknen wurden die Chromatogramme in 6 horizontale Zonen mit den Rf-Werten 0,0–0,14, 0,14–0,2, 0,2–0,4, 0,4–0,6, 0,6–0,8 und 0,8–1,0 geteilt. Die Trennungslinie zwischen der ersten und der zweiten Zone wurde mittels einer UV-Lampe gewählt. Einzelne Zonen wurden nach dem Zerschneiden der Chromatogramme mit 50 ml destilliertem Wasser eluiert und alle Eluate im Vakuum auf 5 ml eingeeengt. Die Anwesenheit phytotoxischer Stoffe in den einzelnen eingeeengten Eluaten wurde auf den abgeschnittenen Tomatensprossen in den Erlenmeyerkolben untersucht.

Durch die oben beschriebene Methode wurden insgesamt 16 g gesammelte Blattläuse in drei Portionen unabhängig bearbeitet. Auf diese Weise wurden 16 Chromatogramme gewonnen, von denen 7 in Zonen geteilt, eluiert und die Eluate weiter biologisch geprüft wurden. Die Testversuche wurden von August bis Oktober unter Laboratoriumsbedingungen durchgeführt (Lufttemperatur 17–22°C, Luftfeuchtigkeit 60–80%). Die Testtomaten (Sorte «Olmützer») stammten aus der Sommeraussaat. Zu den Versuchen wurden 15 cm der oberen Sprosssteile verwendet, denen nur das zweite Blatt von oben und die Gipfelblätter belassen wurden. Die Testpflanzenteile standen nach dem Abschneiden zunächst 24 h zur Akklimatisation im Versuchsraum, dann wurden pro Kolben 2–3 mit Eluat eingestelltes und nach dreitägiger Behandlung ins frische Wasser übertragen. Eluate jeder Chromatogrammzone (mit denselben Rf-Werten) wurden auf je 18 Versuchspflanzen geprüft.



Erste Nekrosen auf der Blattfläche einer Tomatenpflanze, welche 3 Tage im Eluat aus der ersten Chromatogrammzone eingestelltes worden war (nähere Angaben im Text).

Ergebnisse. In Eluaten aus den ersten Zonen (Rf-Werte 0,0–0,14) konnte an Testpflanzen nach 48 h leichtes Erschlaffen der Blätter beobachtet werden. Nach dreitägiger Wirkung der Eluate traten auf den Blattflächen die ersten Anzeichen der Nekrosen auf, die nach 5 Tagen deutlich sichtbar waren. Am Anfang handelte es sich meist um runde, zum Teil auch um unregelmässig geformte kleine bis 3 mm grosse, schwarzbraune nekrotische Flecken auf den Interkostalfeldern der Blattflächen, in geringerem Masse auch auf den Blatträndern und -spitzen. In weiter fortgeschrittenen Stadien flossen manche Flecke zusammen, die Umgebung der Nekrosen begann zu chlorotisieren und schliesslich verdorrte die Blattfläche bis auf restliche Bezirke entlang der Hauptadern. Hauptadern, Mittelrippen, Blattstiele und Stengel blieben symptomlos. Diese Schäden zeigten sich auf allen Blättern der 18 in die Eluate aus den ersten Chromatogrammzonen eingestellten Tomatenpflanzen. An Testpflanzen, die in die Eluate aus den fünften und sechsten Chromatogrammzonen eingestelltes wurden, traten an einigen Blattspitzen nach 4–5 Tagen braungrüne Nekrosen auf; doch erschienen sie unregelmässig und in keinem Fall innerhalb der Blattflächen. Tomatenpflanzen in Eluaten aus anderen Zonen sowie auch Kontrollpflanzen im Wasser wiesen keine makroskopisch sichtbaren Schäden auf.

Schlussfolgerungen. Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse kann für wahrscheinlich gelten, dass durch die angewandte Methode aus dem Extrakt von *Brachycaudus napelli* Schrk. mindestens ein phytotoxischer, wenn auch nicht gereinigter Stoff abgetrennt wurde, der Erschlaffen und irreversible Schädigung der Versuchspflanzen hervorrief. Visuelle Symptome, das heisst nekrotische Flecke auf den Interkostalfeldern der Blattflächen sowie an den Blattspitzen, entsprachen auffallend den von GÄUMANN² für die Schädigung durch Welketoxine pilzlicher Natur beschriebenen Symptomen. Zurzeit kann die Frage noch nicht beantwortet werden, ob eine Beziehung zwischen dem hier aus dem Blattläusextrakt gewonnenen und phytotoxisch wirkenden Stoff und den von KLOFT³ festgestellten Störungen in der Wasserbilanz der durch Blattläuse angestochenen Pflanzenteile besteht.

Summary. A substance was isolated from extracts prepared from aphids (*Brachycaudus napelli* Schrk.) which induces black-brown necrotic areas in leaves of detached tomato shoots which are put into an aqueous solution of the substance. The purity of the isolated substance mentioned above has not yet been determined.

V. KAZDA

Institut für experimentelle Botanik der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, Phytopathologische Abteilung, Prag (Tschechoslowakei), 22. Januar 1962.

² E. GAUMANN, ST. NAEF-ROTH und G. MIESCHER, *Phytopath. Z.* 16, 257 (1950). – E. GAUMANN, ST. NAEF-ROTH und H. KOBEL, *Phytopath. Z.* 20, 1 (1952). – E. GAUMANN, *Phytopath. Z.* 29, 1 (1957).

³ W. KLOFT, *Phytopath. Z.* 22, 251 (1954); *Z. angew. Entomol.* 45, 337 (1960); 46, 12 (1960).

Induction of the Formation of a Coli-bacteriophage and Colicin by Hydroperoxide

Ultraviolet radiation is nowadays by far the most widely used way of provoking an induction of the formation of bacteriophages from lysogenic bacteria; less is

known about the induction with hydroperoxide. LWOFF and JACOB¹ found that the same factors which induce the production of phage – among them the UV-rays and hydroperoxide – equally well induce the production of colicin in

¹ A. LWOFF and F. JACOB, *C. R. Acad. Sci. Paris* 234, 2308 (1952).

bacteria *Escherichia coli*. Yet up to now it has not been determined what degree of induction of both phage and colicin may be obtained with hydroperoxide in the same strain, and this action of H_2O_2 has not been compared with the effect of UV-rays. The purpose of the present communication is to answer these questions.

We used the lysogenic and colicinogenic strain L II-18, the induction of which by UV-rays was analysed in a previous work². The essential experimental conditions were the same as in the previous experiments on the induction by UV-rays^{2,3}. In all experiments, 3 h old broth cultures of the strain L II-18, inoculated from stock cultures and containing about $6 \cdot 10^7$ living cells in 1 ml, were treated with hydroperoxide; the same cultures without H_2O_2 served as controls. During the experiment they were incubated at 34°C. At appropriate intervals, samples were filtered through collodion ultrafilters. The phage was then titred according to the number of plaques in the agar cultures of a sensitive strain. The colicin was titred according to the diminution of living indicator bacteria in an appropriately diluted suspension (our own method³).

(1) *Chronological Course of the Production of the Phage and Colicin after H_2O_2 Induction.* Preliminary experiments proved that the best concentration of H_2O_2 to produce colicin is about $M/2000$. Peroxide of this concentration has therefore been added to 20 ml of a L II-18 culture. Samples of 2 ml each were taken after 0, 2, 4, 6, 8, and 10 h of incubation from the experimental and control cultures and treated as stated.

From the results it appears that, already up to 2 h after addition of peroxide, the production of both phage and colicin increases against the control, even if the titer of colicin increases distinctly slower. The production of both reaches its maximum 6 h after the addition of peroxide; it then decreases again to the value of the control (which is, similarly as after UV², probably due to adsorption of them onto the surviving cells). These results are summarized in Figure 1.

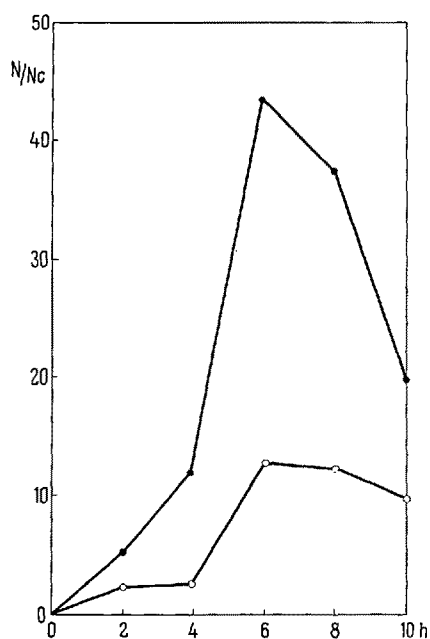


Fig. 1. Release of free phage and colicin in a culture of the strain L II-18 after the induction by $M/2000$ solution of H_2O_2 . x: time after induction in hours; y: ratio of the titer in the induced culture: the titer in a control ($N:N_c$). ●—● means free phage, ○—○ means free colicin.

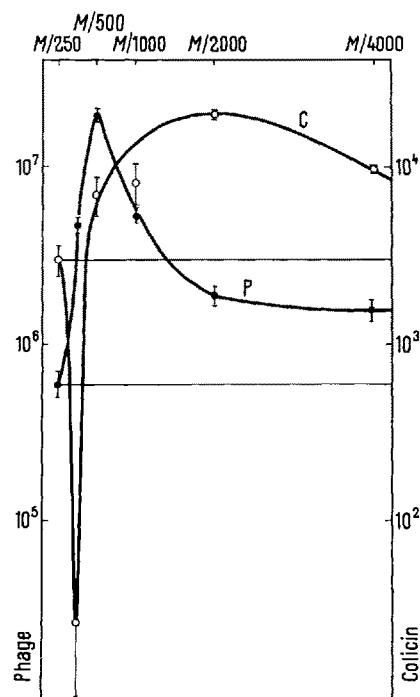


Fig. 2. The induction of the synthesis of phage and colicin in the strain L II-18 by various concentrations of H_2O_2 . Values of average mistakes are noted. x: concentration of H_2O_2 ; y: titer. ●—● means free phage, ○—○ means free colicin.

(2) *Inductive Effect of Different H_2O_2 Concentrations upon the Production of the Phage and Colicin.* In these experiments, a culture of the strain L II-18 was distributed into test-tubes in 6 doses of 2 ml each. To each dose H_2O_2 was added in the following concentrations: $M/250$, $M/500$, $M/1000$, $M/2000$, and $M/4000$; the sixth test-tube served as control. All cultures were incubated for 6 h at 34°C, then filtered and phage and colicin counts made. This was repeated 8 times.

The macroscopical observation of the course of these experiments (as well as in the experiments of the first series) showed a clear slackening of the multiplication of the cells in the cultures with peroxide, and the more clearly, the higher the concentration of peroxide the culture contained; at a concentration of $M/250$ H_2O_2 the density of the culture persisted for whole 6 h at the original degree.

As far as the titers of phage and colicin are concerned, the results were on the whole identical in all experiments. The average values of the titers obtained by different concentrations and their average mistakes are summarized in Figure 2. All concentrations employed induce the production of phage, whereas the production of colicin is not induced by the concentration $M/250$ (nor by higher concentrations); on the contrary, this concentration diminishes the titer of the colicin to about 1% of control value. Here it is probably a toxic action of freed oxygen on the production of colicin. This may be in connection with the findings that the production of some colicins is

² J. ŠMARDÁ, *Fol. microbiol.* 6, 44 (1961).

³ J. ŠMARDÁ, *Fol. biol. Praha* 6, 225 (1960).

stimulated by anaerobiosis^{4,5} which is not the case in phage.

The optimum H_2O_2 concentration for the induction of phage is $M/500$, whereas that for the induction of colicin is by 4 times lower. This optimum is more clearly expressed in the phage than in colicin.

Up to now we can compare these results with the data of NORTHROP⁶, LWOFF and JACOB¹, LWOFF⁷, and FAGUET⁸. They agree very well. Our results moreover show clearly that the effective dose for the induction of colicinogeny is considerably lower than that for the induction of lysogeny—a conclusion similar to that drawn by HAMON⁹ and ourselves³ for UV induction.

In comparing the induction of the strain L II-18 by hydroperoxide with that by UV-rays³, we find on the whole that the effect of the induction by H_2O_2 is less. Whereas, when using UV-rays of a wave-length 2537 Å, the titer of the phage with this strain was increased by 161 times, and that of colicin by 20 times against the control, hydroperoxide increased the production of phage 35 times at most and of colicin only 7 times. This means at any rate that the inducing effect of UV-light cannot be identified with that of H_2O_2 .

We therefore seem not only to have the right to postulate, together with THIMANN¹⁰, that in the mutagenic effect several different kinds of reaction may participate, but we may expect the same also from induction.

Zusammenfassung. Die Arbeit gibt die Resultate der Induktion der Lysogenie und der Colicinogenie im selben Stamme *E. coli* (L II-18) mit Wasserstoffperoxid an. Der Phagentiter wurde 35mal, der Colicintiter 7mal erhöht. Die optimale Konzentration des H_2O_2 für Phagenbildung war $M/500$, die für Colicinbildung $M/2000$. Im Vergleich mit der Induktion desselben Stammes mit UV-Licht ist die Wirkung des H_2O_2 verhältnismässig schwach.

J. ŠMARDA,
with technical cooperation of V. ČERMÁK

Department for Biology, Medical Faculty, J. E. Purkyně University, Brno (Czechoslovakia), February 2, 1962.

- ⁴ J. ŠMARDA, J. Hyg. Epid. Microbiol. Immunol. 4, 151 (1960).
- ⁵ H. MATSUSHITA, M. S. FOX, and W. F. GOEBEL, J. exp. Med. 112, 1055 (1960).
- ⁶ J. H. NORTHROP, J. gen. Physiol. 42, 109 (1958).
- ⁷ A. LWOFF, Bact. Rev. 17, 269 (1953).
- ⁸ M. FAGUET, Ann. Inst. Pasteur 99, 297 (1960).
- ⁹ Y. HAMON, C. R. Acad. Sci. Paris 249, 478 (1959).
- ¹⁰ K. V. THIMANN, *The Life of Bacteria* (The Macmillan Company, New York 1955).

Isolement et identification du 5 β -prégnane 11 β , 17 α , 21-triol 3, 20-dione (Dihydrocortisol) dans l'urine humaine

Les urines de 24 h d'un patient atteint d'une tumeur féminisante de la surrenale ont été hydrolysées par le suc digestif d'*Helix pomatia*. Après extraction par l'éther sulfurique, l'extrait est lavé une fois par 0,05 v de CO_3Na_2 9% p/v et par une fois 0,05 v d'eau. L'extrait dissous dans le dichlorométhane est adsorbé sur une colonne de florisil et élué par: (a) 80 ml de dichlorométhane contenant 2,5% de méthanol, (b) 150 ml de dichlorométhane contenant 12,5% de méthanol, (c) 80 ml de méthanol. La fraction (b) qui contient 90% des corticostéroïdes est chromatographiée dans le système chloroforme/formamide. On trouve une tache réduisant le bleu de tétrazolium entre le cortisol et la cortisone; cette zone est éluee et le résidu sec est rechromatographié dans le même système pendant 6 h; on ne trouve qu'une seule tache réduisant le bleu de tétrazolium. La zone correspondante est éluee et après chromatographie sur gel de silice des corticostéroïdes correspondants, on les chromatographie dans les systèmes: benzène/méthanol-eau (2/1-1); isooctane/butanol tertiaire-eau (10/5-9); toluène-acétate d'éthyle/méthanol-ea (9-1/5-5) toluène/propanediol et benzène/formamide; on ne détecte dans tous ces systèmes qu'une seule tache réduisant le bleu de tétrazolium et ayant le même Rf que le 5 β -prégnane 11 β , 17 α , 21-triol 3, 20-dione (dihydrocortisol) de synthèse.

Une partie aliquote du composé isolé, est oxydée d'une part par le bismuthate de sodium et d'autre part par l'oxyde chromique. Le produit d'oxydation bismuthique¹ a le même Rf que le 5 β -androstane 11 β -ol 3, 17-dione (II) dans les systèmes hexane-benzène (1-1)/propanediol et ligroïne/propanediol. Le produit d'oxydation chromique² a le même Rf que le 5 β -androstane 3, 11, 17- trione (III) dans les systèmes hexane-benzène (1-1)/propanediol et

ligroïne/propanediol. Une autre partie aliquote a été acétylée et son acétate présente le même Rf que le 21 monoacétate de 5 β -prégnane 11 β , 17 α , 21-triol 3, 20-dione (IV) dans les systèmes toluène/propanediol et benzène/formamide. L'acétate du composé isolé a été oxydé par l'oxyde chromique et le produit de l'oxydation a le même

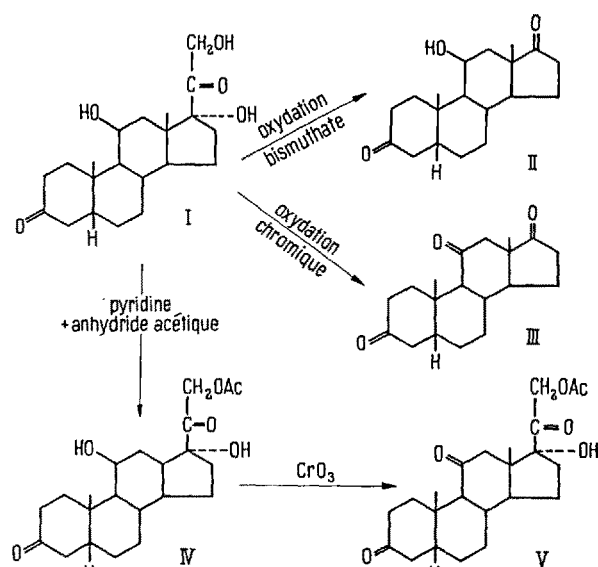


Schéma de l'identification du 5 β -prégnane 11 β , 17 α , 21-triol 3, 20-dione

- ¹ J. K. NORBYERSKI et R. D. STUBBS, Biochem. J. 64, 168 (1956).
- ² A. ZAFFARONI et R. B. BURTON, J. biol. Chem. 193, 749 (1951).