

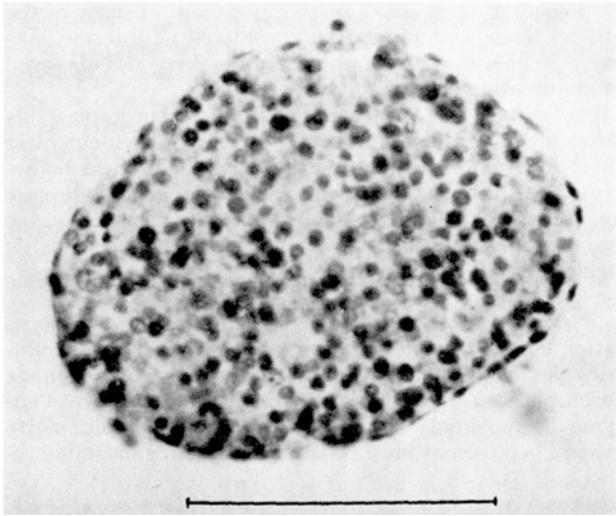


Fig. 1. Solid aggregate derived from cells isolated from blastulae of *Paracentrotus lividus* treated with lithium. Note the flattened cells lining the surface of the mass. Reference line = 50 μ .

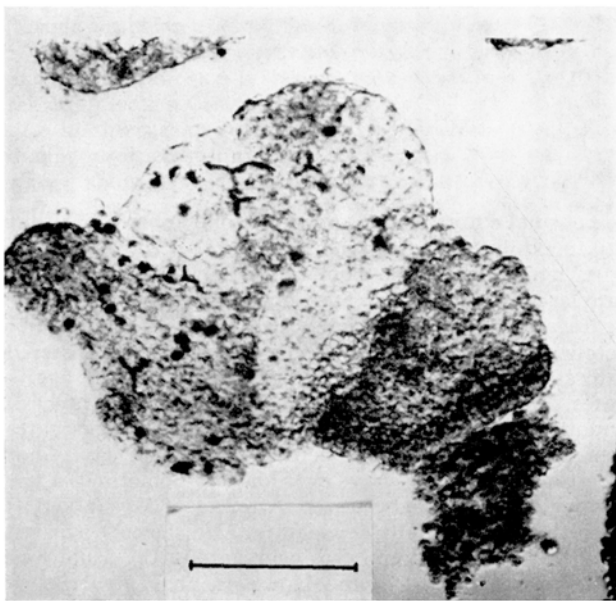


Fig. 2. A mixed aggregate of cells from vegetalized and animalized blastulae of *Paracentrotus lividus* as viewed *in toto*, after flattening between slide and cover-slip. The black spots are pigment cells. Note several triradiate spicules. Reference line = 50 μ .

ectoderm. In fact, the formation of the intestine has been suggested (GUSTAFSON⁵) to depend upon the drawing of the presumptive endodermic cells towards the ectoderm by the mesenchymal cells which in turn need the ectodermal contact to perform their function.

Also the development of the skeleton is considered to be due to the interaction between mesenchymal and ectodermal cells (UBISCH⁶; WOLPERT and GUSTAFSON⁷). It is, on the other hand, a common observation that, in vegetalized embryos, the more reduced the ectodermal covering is, the less developed the skeleton.

A number of experiments have been carried out in which we have tried to mix together cells isolated from animalized and vegetalized embryos in the hope of re-establishing a normal mixture of ectodermal endodermal and mesodermal cells. In only one case did we obtain embryos of vegetalized-like type but which developed many tri-radiated spicules (Figure 2). Although this is fairly meagre evidence it may be taken at least as an indication in favour of the above suggestion as to the effect of the ectoderm on the differentiation of the skeleton.

The present results cannot be considered as a final proof that normally the dissociated cells did not dedifferentiate during the formation of the aggregates. They do, however, suggest that the induced changes which bring about vegetalization or animalization (which on the whole, are an exaggeration of the main differentiation in the early development of the sea urchin egg) may be retained by the cells during isolation and aggregation⁸.

Riassunto. Blastule di *Paracentrotus lividus* trattate con LiCl (vegetalizzate) o con ZnSO₄ (animalizzate) sono state disaggregate con la tecnica precedentemente descritta.

Le cellule da blastule vegetalizzate si riaggregano in masse solide che non differenziano nè scheletro nè intestino. Quelle da blastule animalizzate danno origine a vescicole ciliate. Tentativi di combinazione di cellule da blastule animalizzate e vegetalizzate in un caso hanno dato origine ad aggregati con abbozzi di scheletro.

G. GIUDICE

Istituto di Anatomia Comparata, Università di Palermo (Italy), November 5, 1962.

⁵ T. GUSTAFSON and H. KINNANDER, *Exp. Cell Res.* 10, 733 (1956).

⁶ L. v. UBISCH, *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* 30, 279 (1957).

⁷ L. WOLPERT and T. GUSTAFSON, *Exp. Cell Res.* 25, 311 (1961).

⁸ This work has been supported by Grants from the Consiglio Nazionale delle Ricerche (Research Group on the Problems of Differentiation) and the National Institutes of Health, U.S. Public Health Service (RG-06211) to the Laboratory of Comparative Anatomy.

Zur Trennung der C₁₉-Steroide des Harns im Dünnschichtchromatogramm

Bei der Anwendung des Dünnschichtverfahrens nach STAHL^{1,2} zur Chromatographie der C₁₉-Steroide des Harns gelangten wir zu einer Änderung der ursprünglichen Versuchsanordnung, über die wir hier berichten.

Sowohl das von STAHL angegebene aufsteigende Verfahren auf den 200 × 200 mm-Platten als auch das Durchlaufverfahren nach BRENNER und NIEDERWIESER³ haben

sich zur Trennung der 17-Ketosteroide des Harns nicht bewährt. Auf den immer noch kurzen Trennstrecken liess sich eine genügende Scheidung der einzelnen Substanzen, besonders aber des Androsterons vom Dehydroepiandrosteron, nicht erreichen. Beim Versuch, das Verfahren von

¹ E. STAHL, *Chemikerzeitung* 82, 323 (1958).

² E. STAHL, *Pharmazeutische Rundschau* 1, Nr. 2, 1 (1959).

³ M. BRENNER und A. NIEDERWIESER, *Exper.* 17, 237 (1961).

BRENNER auf längere Platten (400 mm) anzuwenden, zeigte es sich, dass die Trennung der Testgemische – sei es einer Farbmischung, wie sie STAHL angibt, sei es einer Steroidmischung – anfangs gut war, wenn auch nicht genügend, dass aber später die bereits getrennten Komponenten wieder zusammenliefen. Dies mag mit einem unterschiedlichen Verdunsten der einzelnen Lösungsmittelfractionen zusammenhängen. Vermutlich werden die R_f -Werte in Zonen, in denen sich die Zusammensetzung der mobilen Phase an der Platte ändert, zunehmend kleiner, während die nachfolgenden Stoffe «aufholen». Kondensationstropfen des Lösungsmittels, die sich an der Deckplatte bildeten, verschwanden zwar durch leichtes Erwärmen der Platte, eine Verbesserung des Trenneffektes konnte aber dadurch nicht erzielt werden. Erst durch eine Änderung der Versuchsanordnung gelang es uns, die 17-Ketosteroide des Harns in einem Arbeitsgang mit einem Elutionsmittel scharf voneinander zu trennen. Auf diese

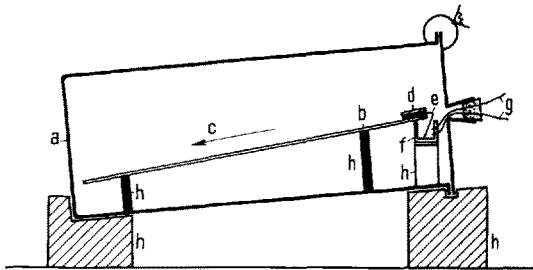


Fig. 1. a Glastrommel, b Dünnschichtplatte, c Laufrichtung, d Glasplatte zum Halten des Filterpapierstreifens, e Filterpapierstreifen, f Glastrog, g zwei Schläuche, die von aussen in den Glastrog führen, h Holzblöcke.

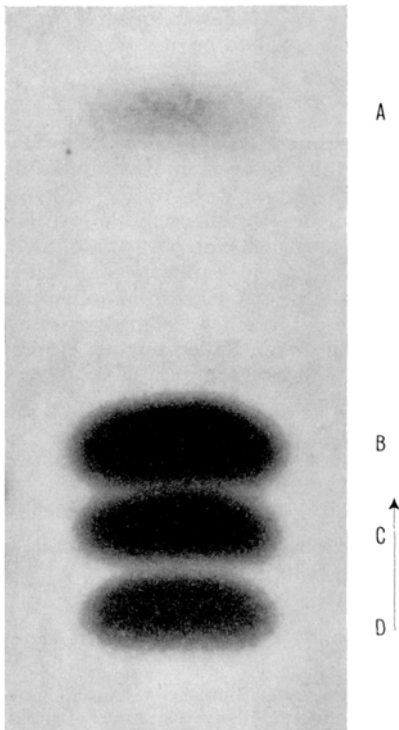


Fig. 2. Chromatographie von 17-Ketosteroid-Reinsubstanzen (A Androstendion, B Androsteron, C Androstenolon (DHA), D Ätiolcholanon). Pfeil in Laufrichtung.

Weise wurde es möglich, die Steroide bei kurzer Laufzeit zu chromatographieren.

Versuchsanordnung. Die Platten wurden auf 200×550 mm vergrößert. Die Exposition der in üblicher Weise mit Silicagel und Gips (Fa. Merck AG, Darmstadt) bestrichenen und bei 110°C aktivierten Platten erfolgte in einer nicht ganz horizontal liegenden Glastrommel (Figur 1), wie sie bei der Papierchromatographie verwandt wird. Die Platten wurden in die Trommel überdies noch leicht geneigt (Winkel von etwa 10°) eingelegt, so dass das Ende um etwa 6 cm tiefer liegt als der Startpunkt. Eine allzu starke Neigung führte zu einem unregelmässigen Einlaufen des Elutionsmittels. Die Kammer sättigten wir mit mobiler Phase, indem wir die Wände mit getränkten Filterpapierstreifen behängten. Die Platte lag mit ihrem oberen Ende auf einem Glastrog (Figur 1, f), in den schliesslich durch einen Kunststoffschlauch das Lösungsmittel eingefüllt wurde. Ein zweiter Schlauch (Figur 1, g) diente zur Entlüftung bei der Füllung. In dieser Anordnung wurde ein Trog, wie von BRENNER³ angegeben, verwandt. Die Übertragung des Lösungsmittels auf die Platte erfolgte mittels eines 200 mm breiten Filterpapierstreifens, der von einer schmalen Glasplatte (50 $\times$ 200 mm) unterhalb des Startpunktes gehalten wurde, indem man die Platte einfach auf Dünnschicht und Filterpapier legte. Wenn keine längere Sättigung der Kammer nötig ist, genügt es, einen mit Lösungsmittel vollgesogenen Wattebausch auf den Anfangsteil der Platte zu legen, um das Chromatogramm voll zu entwickeln.

Ergebnisse. Zur Trennung der 17-Ketosteroide benutzen wir als Elutionsmittel Chloroform:Äthanol (100:1,5). Die Expositionszeit betrug bei Zimmertemperatur $5\frac{1}{2}$ h.

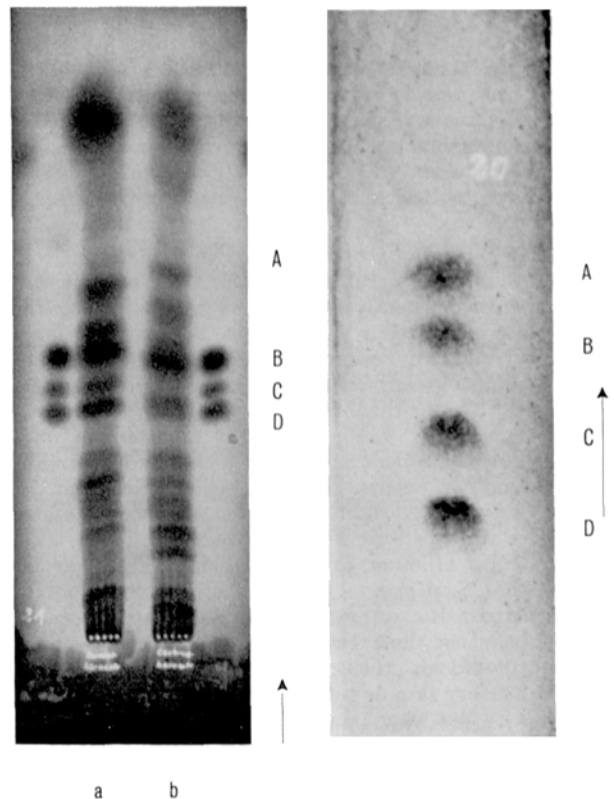


Fig. 3. Chromatographie von Harn-Steroidextrakten, a Normalperson, b Cushing-Syndrom.

Fig. 4. C-21-Steroide Reinsubstanzen getrennt mit Dünnschichtchromatographie (A Cortison, B Corticosteron, C Hydrocortison, D Aldosteron). Pfeil in Laufrichtung.

Die Sichtbarmachung der Flecken erfolgte mit 5%iger alkoholischer Phosphormolybdänsäurelösung. Figur 2 zeigt die Trennung von Reinsubstanzen (Androstanol-3 α -on-17, Ätiocholanol-3 α -on-17, Δ^5 -Androstenol-3 β -on-17, Δ^4 -Androstendion-3 α , 17). Figur 3 ist die Photographie zweier mit H₂SO₄ hydrolysierten und mit Äther extrahierter Harnsteroidextrakte, und zwar (a) einer Normalperson und (b) eines Patienten mit Cushing-Syndrom (Nebennierenrinden-Hyperplasie). Die scharfe Trennung der Einzelkomponenten ist deutlich zu erkennen, am Rande laufen die Vergleichsubstanzen (vgl. Figur 2) mit. Hinter dem Ätiocholanolon werden Metaboliten erkennbar, die nach unseren Erfahrungen in der Chromatographie von Harnsteroiden an der Aluminiumsäule 11-oxygenierten 17-Ketosteroiden entsprechen. Testsubstanzen standen leider nicht zur Verfügung.

Unsere Versuche, die Steroide mit Alkohol quantitativ aus der von der Platte heruntergekratzten Schicht zu lösen, um die Menge chemisch zu bestimmen, waren nicht erfolgreich. Es traten wechselnd starke Verluste auf. Die Bestimmung der Menge könnte somit nur semiquantitativ durch vergleichenden Auftrag von bekannten Steroiden in steigender Konzentration erfolgen. Dieses Verfahren wurde uns auch von WALDI⁴ angegeben.

Mit der von uns angegebenen Modifikation des Dünnschichtverfahrens ist es auch möglich, die Steroide der Nebennierenrinde (Corticosteron, Cortison, Hydrocortison und Aldosteron) scharf voneinander zu trennen (Figur 4). Die Aktivität der Platte wurde zu diesem Zweck durch Lagern an der Luft über Nacht herabgesetzt. Das Elutionsmittel war dann Chloroform:Aceton (2:1). Die Expositionszeit betrug 6 1/2 h. Für die Harnsteroiden ist unserer Ansicht nach allerdings eine Vortrennung zur sicheren Identifizierung des Aldosterons nötig.

Summary. By a change of method to thin-layer chromatography, it was possible to fractionate completely the 17-ketosteroids from urine extract in one run. The chromatography was done in a horizontal manner on plates of 200 $\times$ 550 mm.

P. M. REISERT und D. SCHUMACHER

Medizinische Klinik der Universität Freiburg i. Br. (Deutschland), 22. Juni 1962.

⁴ D. WALDI, persönliche Mitteilung.

***Stysanus stemonites* (Pers.) Corda on Potato in Cold Store in India**

In a tropical country like India, the potato is grown as a winter crop and the tubers harvested in March and April are stored in commercial cold stores at a temperature of 5°C. While rotting due to the bacteria and fungi in general is largely reduced, the tubers suffer from a number of diseases apparently characteristic under the cold storage conditions.

A large number of tubers stored in commercial cold stores around Patna, Bihar were found severely affected by a fungus apparently inciting dry rot of tubers. The organism was isolated in pure culture. Presence of characteristic synnemata bearing chains of ovate to lemon-shaped, bluish-green, translucent conidia ranging 6 to 8 μ $\times$ 4 to 5 μ in dimensions indicated its identity as *Stysanus stemonites* (Pers.) Corda. Several attempts to inoculate healthy tubers both with and without wounds yielded negative results. It was noticed further that the synnemata were invariably associated with the infections on the potato tubers by *Fusarium coeruleum* (Lib.) Sacc. and *Pythium ultimum* Trow. Further observations indicated that *S. stemonites* was not pathogenic on potato but hyperparasitic on *Fusarium* and *Pythium* species. Pure cultures of these two fungi grown in petri plates were inoculated with the isolate of *S. stemonites*. The latter exhibited a very slow or poor growth at room temperature (22 to 24°C), but when incubated at 5°C in a refrigerator, the mycelium developed rapidly overgrowing and penetrating the hyphae of *F. coeruleum* and *P. ultimum*. The synnemata developed in large numbers bearing the spore chains after an incubation of 15 to 20 days.

Stysanus stemonites, occurring almost all over the world, is primarily a saprophyte in soil often with the coprophilous habitat^{1,2}. It has also been reported to incite a

secondary rot in potato tubers, often known as 'speck rot' or 'brown rot' in several parts of the U.S.A.³. It is probable that in all these cases *S. stemonites* may be occurring as a hyperparasite on some fungus inciting decay of the potato tubers. Further studies on these psychrophilic and mesophilic strains of *S. stemonites*, relative to their hyperparasitic behaviour, would be of interest.

Zusammenfassung. *Stysanus stemonites* (Pers.) Corda wurde aus in Kälte gelagerten Kartoffelknollen isoliert. Kulturversuche zeigten, dass dieser Pilz unter Kältebedingungen auf den Knollenschädlingen *Pythium ultimum* und *Fusarium coeruleum* parasitiert. *Stysanus stemonites* ist ursprünglich ein Saprophyt, soll aber nach Berichten aus den USA auf Kartoffelknollen eine Flecken- oder Braunfäule verursachen. Möglicherweise wächst der Pilz aber auch in diesen Fällen nur als Hyperparasit auf andern Knollenfäuleerregern.

M. J. THIRUMALACHAR and M. S. PAVGI

College of Agriculture, Banaras Hindu University, Pimpri, Poona (India), July 20, 1962.

¹ E. J. BUTLER and G. R. BISBY, *The Fungi of India* (Revised by R. S. VASUDEVA, Indian Coun. Agr. Res. New Delhi 1960).

² J. C. GILMAN, *A Manual of Soil Fungi* (The Iowa State College Press, Iowa 1957).

³ *Plant Disease Survey*—Index of plant diseases in the United States, part I, p. 1126 (U.S. Dept. Agr. 1950).