

primary spread, multiplicity of phage-types of vibrios were seen to occur among the strains from those places. But during the subsequent spread of the disease from the secondary foci in these areas, only fewer phage-types of vibrios would be transmitted; in conformity with this argument only 2 types of vibrios could be found in Pakistan and India, where cholera El Tor entered in 1963-64.

The epidemiological validity of the phage-typing scheme has been established by demonstrating the uniformity in phage-types of strains in outbreaks originating from single sources of infection. Vibrios isolated in the localized outbreaks in Kowloon in 1964⁷ originated from the Nam Yuen restaurant in Temple Street; similarly outbreaks in Indore, Karnal and Nagpur in India in 1965 and in Korat in Thailand in 1966, could be ascertained as having originated from a single source of infection. In all these outbreaks, the isolates of *V. eltor* were of identical phage- and sero-types. Successive isolates from 14 chronic carriers of *V. eltor* in the Philippines and Thailand, and 37 sets of strains isolated from cholera patients and infections in their known contacts also showed uniformity of phage- and sero-types.

The chief utility of the phage-typing scheme for *V. eltor* is in tracing the spread of the epidemic from one place to

another, rather than in tracing chronic carriers and the spread of infection through individuals.

A detailed account of the work will be published elsewhere.

Résumé. On a développé un schéma de lysotypie de *Vibrio eltor*. A l'aide de 5 types de bactériophages on a classé 3464 souches en 6 lysotypes et trouvé un type de bactériophage qui est toujours lytique pour les souches de *V. eltor* isolées de malades cholériques El Tor.

S. BASU⁸ and S. MUKERJEE

WHO International Reference Centre for Vibrio Phage-Typing, Indian Institute of Experimental Medicine, Calcutta-32 (India), 29 September 1967.

⁷ P. H. TENG, Proc. Cholera Res. Symp., U.S. Publ. Hlth Serv., Publ. No. 7328, p. 328 (1965).

⁸ Present address: Dr. S. BASU, University of California, Department of Bacteriology, Los Angeles, California 90024, USA.

Bildung von Reaktionsholz durch Zentrifugalbeschleunigung

In krummwüchsrigem Holz findet man häufig ein anomales Holzgewebe, Reaktionsholz genannt, dessen Bildung durch sehr verschiedene exogene und endogene Faktoren ausgelöst werden kann, wobei dem Schwerkraftkreis eine besondere Bedeutung zukommt^{1,2}. Zur weiteren Aufklärung der Schwerkraftwirkung auf die Differenzierung der Kambiumzellen haben wir Versuche mit Zentrifugalbeschleunigungen durchgeführt. Im Gegensatz zu JACCARD^{3,4} und SCOTT und PRESTON⁵, die ihre Untersuchungen über die ganze Vegetationsperiode ausdehnten, um die bei der Zentrifugation auftretenden Krümmungsbewegungen mit der Reaktionsholzbildung in Beziehung zu bringen, haben wir versucht, durch möglichst kurze Reizgaben die Reaktionsholzbildung ohne Krümmungsreaktion auszulösen. Darüber hinaus bemühten wir uns, den Einfluss der Zentrifugalbeschleunigung quantitativ zu erfassen, indem wir die Zahl der gebildeten Reaktionsholzzellen in Abhängigkeit von der Beschleunigung und der Versuchszeit ermittelten.

Methode. Als Versuchspflanzen verwenden wir 10 Tage alte, gleichgestaltete Sämlinge der Rosskastanie (*Aesculus hippocastanum* L.). In den Zentrifugenteller wurden jeweils 4 Blumentöpfe für einen Versuch eingesetzt (Figur 1). Der Stamm der Pflanze war 21,5 cm vom Mittelpunkt des Tellers entfernt. Die Versuchsdaten sind aus der Tabelle ersichtlich.

Die Versuche liefen über 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120 h. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch an Querschnitten, die der Mitte des Stammes (10 cm über der Basis) entnommen wurden. Hierbei wurden Zellzählungen im Holzteil vorgenommen, und zwar auf jedem Querschnitt jeweils 6 radiale Zellreihen auf der zentrifugalen und 6 radiale Zellreihen auf der zentripetalen Seite. Jeder Versuch mit je 4 Einzelpflanzen wurde 4- bis 5mal wiederholt, so dass bei der Mittelwertbildung eine gute statistische Sicherung gegeben ist. In dieser Veröffentlichung

beziehen sich alle Angaben nur auf die Mittelwerte der in einer radialen Zellreihe gebildeten Reaktionsholzzellen (in den Figuren als Zellen bezeichnet).

Ergebnisse. Die Zentrifugalbeschleunigung verursacht in den Kastanien-Epikotylen eine Reaktionsholzbildung. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von JACCARD⁴ wird das Reaktionsholz stets zentripetal angelegt, auf der zentrifugalen Seite sind keine Reaktionsholzzellen nachweisbar. Damit ist erwiesen, dass die Zentrifugalkraft gleichartig wie die Schwerkraft einwirkt und die Massenbeschleunigung als Ursache der Reaktionsholzbildung anzusehen ist.

Mit wachsender Versuchszeit nimmt die Zahl der Reaktionsholzzellen zu (Figur 2). Die Zunahme ist jedoch

n	ω	b	b/g
0,25	1,571	52	0,05
0,5	3,142	212	0,2
1	6,283	850	0,9
2	12,566	3395	3,5

$$\begin{aligned} \text{Drehzahl} & n = U \times \text{sec}^{-1} \\ \text{Winkelgeschwindigkeit} & \omega = 2\pi n \times \text{sec}^{-1} \\ \text{Beschleunigung} & b = r \omega^2 \text{ cm} \times \text{sec}^{-2} \\ \text{Erdbeschleunigung} & g = 981 \text{ cm} \times \text{sec}^{-2} \end{aligned}$$

¹ G. CASPERSON, Flora 155, 515 (1965).

² G. CASPERSON, Planta 64, 225 (1965).

³ P. JACCARD, Rev. gén. Bot. 32, 273 (1920).

⁴ P. JACCARD, Ber. schweiz. Bot. Ges. 49, 135 (1939).

⁵ D. R. M. SCOTT und S. B. PRESTON, Forest Sci. 1, 178 (1955).

nicht linear wie bei reinem Schwerkraftreiz⁶, sondern die Kurven fallen nach längerer Versuchszeit hin ab, was durch ein Nachlassen der kambialen Zellteilung bedingt ist. In der Annahme, dass alle kambialen Zellen, die gereizt wurden, sich zu Reaktionsholzzellen ausdifferenzieren, ergibt sich bei einer Zentrifugalbeschleunigung von $b/g = 0,9$ nach 24 h Versuchsdauer ein Zellenzuwachs von 3 Zellen/Tag und nach 120 h 2,1 Zellen/Tag. Bei Versuchen über den Einfluss der Schwerkraft auf die Reaktionsholzbildung fanden wir dagegen bei gleichartigem Versuchsmaterial über 6–8 Wochen eine konstante Zellenzunahme von 3 Zellen/Tag als statistisch gesicherten Wert⁶. Die Zentrifugation beeinflusst offenbar den Stoffwechsel negativ. Gegenüber Versuchen mit dem Schwerkraftreiz wird bei Zentrifugalversuchen die Pflanze bewegt, so dass der Strömungswiderstand der Luft wie eine dauernde Bewindung einwirkt, wodurch besonders bei einer Beschleunigung von $b/g = 3,5$ Störungen der Reaktionsholzbildung und nach längerer Versuchsdauer auch mechanische Schädigungen an den Blättern auftreten. Der physiologische Einfluss dürfte in erster Linie den Wasserhaushalt betreffen.

Auf Grund früherer Untersuchungen⁷ nehmen wir an, dass die Determination zur Reaktionsholzzelle bereits in den kambialen Zellen erfolgt. Zu dieser Umstimmung bedarf es einer bestimmten Präsentationszeit. So mussten unsere Zentrifugenversuche bei allen Beschleunigungen auf mindestens 24 h ausgedehnt werden, um zu auswertbaren Ergebnissen zu gelangen. Der zeitliche Schwellenwert dürfte somit bei 24 h liegen, wie wir es auch bei Schwerkraftversuchen gefunden hatten⁸. Bei einer Beschleunigung unter $b/g = 0,9$ lag der Schwellenwert bei 48 und 72 h. Der Schwellenwert ergibt sich nämlich nach dem Reizmengengesetz aus dem Produkt von Reiz-

intensität und Zeit, wobei in unserem Fall der Zeitfaktor im Minimum 24 h betragen muss.

Die Kurven in Figur 2 gestatten Aussagen über die Reaktionsholzbildung bei bestimmter Zentrifugalbeschleunigung in Abhängigkeit von der Zeit oder den Vergleich verschiedener Beschleunigungen zu einer bestimmten Zeit. Bei einer Auftragung der Reizmenge $b \times t$ gegen die gebildeten Reaktionsholzzellen fanden wir keine direkte Proportionalität zur Beschleunigung b , sondern in guter Näherung zu $\sqrt[3]{b}$, denn bei einer Auftragung der Reaktionsholzzellen über $\sqrt[3]{b} \times t$ lassen sich alle errechneten Werte auf einer Kurve vereinigen (Figur 3).

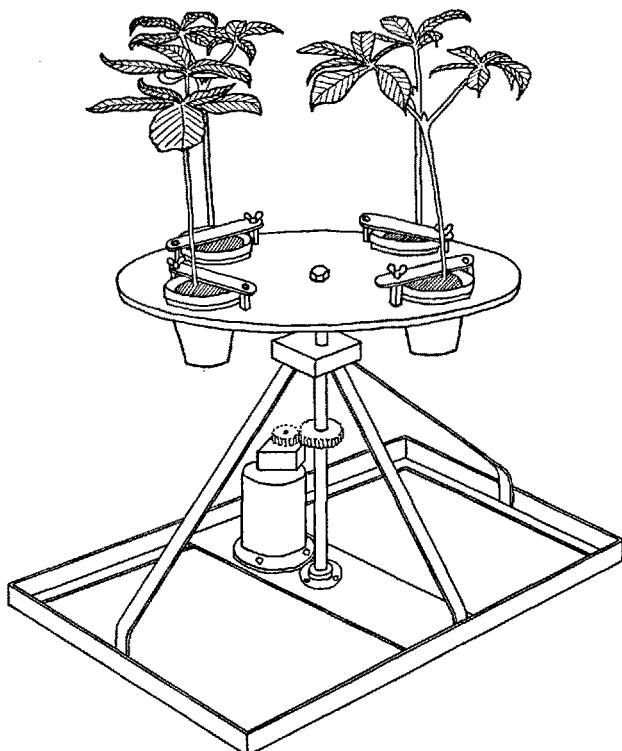


Fig. 1. Versuchsanordnung auf der Zentrifuge. Stäbe zur Befestigung der Epikotylen in der Zeichnung weggelassen.

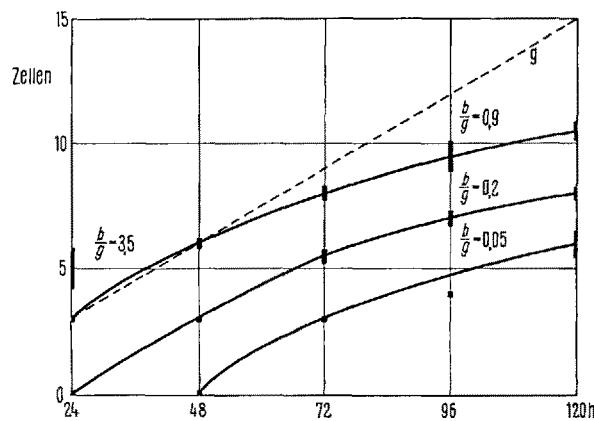


Fig. 2. Reaktionsholzbildung infolge einer Zentrifugalbeschleunigung von $b/g = 0,05, 0,2, 0,9, 3,5$ in Abhängigkeit von der Versuchszeit. Zellenzahlen beziehen sich auf den jeweiligen Mittelwert mit mittlerem Fehler aller Auszählungen für Reaktionsholzzellen in einer zentripetalen Zellreihe des Xylems. Gestrichelte Kurve Reaktionsholzbildung durch Erdbeschleunigung g nach^{1,6}.

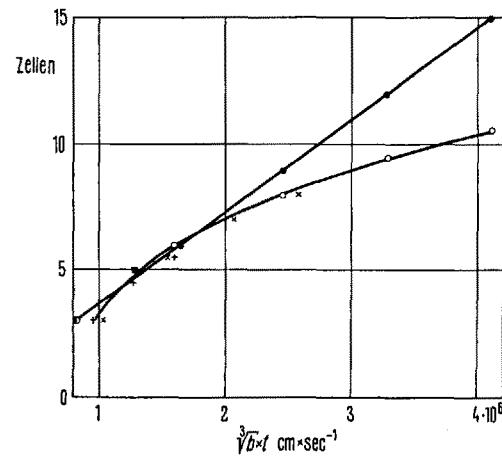


Fig. 3. Reaktionsholzbildung nach dem Reizmengengesetz $\sqrt[3]{b} \times t$ aufgetragen. Mittelwerte wie in Figur 2. Zentrifugalbeschleunigung $b/g = 0,05 +$, $b/g = 0,2 \times -x$, $b/g = 0,9 o-o$, $b/g = 3,5 \blacksquare$. Erdbeschleunigung g •—•.

⁶ G. CASPERSON, *Chemiefasersymposium 1962* (Akademie-Verlag, Berlin 1963), p. 39.

⁷ G. CASPERSON, *Z. Bot.* 49, 289 (1961).

⁸ G. CASPERSON, *Ber. dt. bot. Ges.* 73, 349 (1960).

Wir sind der Auffassung, dass mit diesem Ausdruck das Reizmengengesetz für die Reaktionsholzbildung angewandt werden kann. Bei Zellenzahl = 3 ist die Reizschwelle angedeutet, das heisst die Reizmenge, die zur Umstimmung der Kambiumzellen notwendig ist. Sie liegt in der Größenordnung von $1 \times 10^6 \text{ cm} \times \text{sec}^{-1}$.

Unsere Versuche zeigen die Möglichkeit auf, mit Hilfe der Massenbeschleunigung die Differenzierung der Holzzellen gerichtet zu beeinflussen und damit einen Einblick in die Kambiumphysiologie und den Wuchsstoffhaushalt² zu gewinnen.

Summary. In leaning stems, reaction wood can be formed as a response to gravitation stimulus. In seedlings of *Aesculus hippocastanum*, reaction wood formation could likewise be stimulated by centrifugation. This

proved the differentiation of wood cells to be affected by mass acceleration. The reaction wood formation is related quantitatively to mass acceleration b and time t , the formation of reaction wood being described by quantitative stimuli law as $\sqrt[3]{b} \times t$. The threshold of stimulation lies in the dimension $\sqrt[3]{b} \times t = 1 \times 10^6 \text{ cm} \times \text{sec}^{-1}$. The arrangement of the experiments permits a direct approach to cambium physiology and the following differentiation of wood cells.

G. C ASPERSON

Institut für Faserstoff-Forschung der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Teltow-Seehof (DDR), 24. Juli 1967.

Isolation and Antiviral Activity of the Gymnemic Acids

Of current interest in our program^{1,2} in the identification of biologically active compounds from *Gymnema sylvestre* R.Br. (Asclepiadaceae) leaves is 'gymnemic acid', the antisweet principle of the plant^{3,4}. The present report describes the isolation of compounds with significant antiviral activity from this principle. These findings assume added significance based upon the recent advance in the chemistry of gymnemic acid presented from Professor REICHSTEIN's laboratories⁵.

Crude gymnemic acid mixture was obtained by mineral acid precipitation³ from the aqueous extract of the leaves. The preferred procedure to resolve this acid mixture was to plate it from a methanol solution on silica gel, and extract with chloroform and ethyl acetate in a Soxhlet extractor. The ethyl acetate extractive was then chromatographed over silica gel with elution by increasing proportions of acetone in ethyl acetate. Four principal acids have been isolated by this procedure and named gymnemic acids A-D based upon their order of elution.

In order to examine gymnemic acid fractions and to monitor their separations, 4 silica gel thin-layer chromatographic (TLC) systems⁶ were developed. Gymnemic acids A-C, homogeneous in the 4 TLC systems, were obtained by individual rechromatography over silica gel employing ethyl acetate for elution and recrystallization from ethyl acetate. Homogeneous acid D was secured by reversed phase chromatography over Teflon-6 at 17°C with elution by the aqueous phase of *n*-butanol-water-methanol (10:10:1) while the organic layer served as the stationary phase. As an average of 20 determinations, Rf values for these gymnemic acids in TLC system I were: A, 0.60 ± 0.07 ; B, 0.49 ± 0.04 ; C, 0.30 ± 0.01 and D, 0.25 ± 0.02 .

Gymnemic acid A, isolated by STÖCKLIN, WEISS and REICHSTEIN⁶, consists of 4 acids A₁-A₄ based upon silica gel TLC in butyl formate-methyl ethyl ketone-formic acid-water (5:3:1:1) (system V). Direct TLC comparison of our gymnemic acids A-D with acid A (A₁-A₄) isolated by the Swiss investigators⁷ established that in TLC systems I-V our acids A and B are identical to their acids A₁ and A₂. However, acids C and D do not correspond to acids A₃ and A₄. Our acids A and B, in agreement with gymnemic acid A (A₁-A₄) isolated by REICHSTEIN's group, contain glucuronic acid as the sole sugar residue.

In contrast, our gymnemic acids C and D contain both glucuronic acid and glucose as shown by acidic hydrolysis, chromatography⁸ and isolation⁹. Ferulic acid has been indicated in our studies in alkaline hydrolysates of acid C

Table I. Effects of gymnemic acids against influenza (A₂/Ann Arbor/6/60) virus in vitro

Sample	Virus yield		Inhibition
	Hemagglutinin	Infectivity	
Control	256	7.3	none
Crude acid mixture	64	5.0	some
Ethyl acetate acids	8	4.5	moderate
Gymnemic acid A	0	2.5	good
B	8	4.3	moderate
C	256	7.0	none
D	512	7.5	none

¹ P. E. MANNI and J. E. SINSHEIMER, J. Pharm. Sci. 54, 1541 (1965).

² J. E. SINSHEIMER and H. M. McILHENNY, J. Pharm. Sci. 56, 732 (1967).

³ D. HOOPER, Pharm. J. 17, 867 (1887).

⁴ R. M. WARREN and C. PFAFFMANN, J. appl. Physiol. 14, 40 (1959).

⁵ W. STÖCKLIN, E. WEISS and T. REICHSTEIN, Helv. chim. Acta 50, 474 (1967); W. STÖCKLIN, Helv. chim. Acta 50, 491 (1967).

⁶ The TLC systems: I, chloroform-formic acid-methanol-*t*-butanol (4:1:1:1, aged for 3 h at 27°C); II, chloroform-acetic acid-methanol (5:1:1); III, iso-amyl alcohol-ammonium hydroxide-chloroform-*t*-butanol (5:2:1:1) and IV, iso-amyl alcohol-ammonium hydroxide-iso-propanol (3:2:1). A modified LIEBERMANN-BURCHARD spray reagent [I. BELIC, Nature 178, 538 (1956)] was used as the chromogen.

⁷ We are grateful to Prof. T. REICHSTEIN and Dr. W. STÖCKLIN, University of Basel, for these reference samples.

⁸ I. SMITH, *Chromatographic and Electrophoretic Techniques* (Interscience, New York 1960), vol. 1, p. 246.

⁹ H. M. McILHENNY, Ph.D. Dissertation, University of Michigan (1966).