

Materials and methods. The microorganism used was *Epicoccum nigrum* (Strain 5-1-3)². The inoculum consisted of uniform suspension of spores and mycelial fragments. Both Czapek-Dox glucose medium³ and germination medium⁴ were used for growing the fungus.

The fungus was grown as surface mat on shallow layers of liquid medium. Usually 1 ml of inoculum was used per 20 ml of a culture medium in a 200 ml conical flask. The flasks were incubated at 25 °C for 5 days exposed to 50 foot candles of light. The source of light was the daylight fluorescence electric tubes TL 80 W/55, 5' suspended at a suitable distance above the culture vessels.

At the end of the incubation period, the mycelial felt was separated from the culture fluid by filtration or centrifugation, washed and dried to constant weight at 80 °C. Growth was expressed in terms of dry weight of mycelium.

Table I. Fungistatic action of the pigment

Concentration of crude pigment	Growth of <i>Botrytis</i> in mg dry mycelium per flask	Inhibition (%)	Growth of <i>E. nigrum</i> in mg dry mycelium per flask	Inhibition (%)
5	54	82	326	1
2.5	61	79	340	0.07
1.25	101	50	359	0.01
0.625	268	1	371	−0.025
0.313	312	−0.1	383	−0.06
0	279	0	362	0

Table II. The effect of pH on the fungistatic action of the pigment (1.25% w/v) on *B. allii*

Initial pH	Final pH	Growth in control flasks mg dry mycelium per flask	Growth in test flasks mg dry mycelium per flask	Inhibition of growth (%)
2.8	3.22	87.4	—	90–100
3.4	3.83	131.8	71.5	66.0
4.0	4.46	137.0	63.2	54.0
5.0	4.95	245.6	203.4	17.2
6.2	6.0	256.3	245.1	4.4
7.2	6.24	161.5	256.2	2.0
8.0	6.87	101.2	102.4	— 1.1
9.0	7.88	55.7	61.6	—10.0

The pigment was extracted from the medium using diethylether after acidification with concentrated hydrochloric acid to pH 2.6. The ether extracts were collected together, and concentrated over a water-bath. The solvent was then filtered off and further concentrated and then allowed to cool. The pigment separated out as golden yellow crystals. The crystals were washed, dried, weighed, dissolved in water and tested for fungistatic action. The effect of a given amount of the pigment on mycelial yields by *Botrytis allii* and *E. nigrum* was determined. pH determination was made by both pH indicator papers and a pH meter (type 222).

Results and discussion. The results (Tables I and II) show the fungistatic action of the crude pigment. High concentrations of the pigment were highly inhibitory to growth of *Botrytis allii* and only slightly inhibitory to growth of *E. nigrum* (Table I). At sufficiently low concentrations the crude pigment tended to be slightly stimulatory to the growth of both organisms.

The fungistatic actions of the pigment was found to be pH dependent (Table II). There was a low anti-fungal activity at pH levels above 5.0. FOPPEN and GRIBANOVSKI-SASSU⁵ reported that under their growth conditions no anti-fungal effect was detected in culture fluid of *E. nigrum*. The lack of anti-fungal activity might have been associated, at least in part, with the high pH (6.7–7.0) of their yeast extract.

The chemical nature of the pigment producing fungistatic action is under investigation. There are conflicting reports on the nature of the pigment produced by *Epicoccum* species. It has been designated flavipin¹, carotenoid⁵, and humic acid-like substance⁶.

Résumé. On a constaté que le pigment sécrété par le mycète *Epicoccum nigrum* a une réaction fungistatique sur le *Botrytis allii* utilisé comme un organisme d'essai. Cette réaction a été dépendante du pH et a été assez basse aux niveaux dépassant 5.0.

O. U. EKA⁷

Department of Industrial Microbiology,
University College, Dublin 4 (Ireland), 28 May 1970.

¹ P. C. BAMFORD, G. L. F. NORRIS and G. WARD, Trans. Br. mycol. Soc. 44, 354 (1961).

² B. SCHOL-SCHWARZ, Trans. Br. mycol. Soc. 42, 149 (1959).

³ G. SMITH, *An Introduction to Industrial Mycology*, 5th edn (Edward Arnold, Publishers, Ltd., London 1960), p. 291.

⁴ P. W. BRIAN and H. G. HEMMING, Am. appl. Biol. 32, 214 (1945).

⁵ F. H. FOPPEN and O. GRIBANOVSKI-SASSU, Biochem. J. 106, 97 (1968).

⁶ The author is extremely grateful to Prof. KÜSTER who supervised the research and to Nigerian Government for providing the fund.

⁷ Present address: Department of Biochemistry, University of Ibadan (Nigeria).

Normaler und aberranter Karyotyp von *Cepaea hortensis* (Müller) (Gastropoda)

Bei *Cepaea hortensis* fand RAINER¹ haploid 30 Chromosomen im Gegensatz zu zwei früheren Autoren (BALTZER², PERROT³), die für die gleiche Art haploid nur 22 Chromosomen beschrieben haben. Der Karyotyp war nicht bekannt. Unsere Untersuchungen bestätigten zwar die frühere Zahl $n = 22$, förderten jedoch eine Chromosomenaberration zu Tage.

Das untersuchte Material stammte von drei Fundplätzen im Kanton Zürich: 4 Tiere aus dem Klotener

Ried, 3 Tiere vom linken Limmatufer gegenüber dem Kloster Fahr und 2 Tiere aus einer an den Friedhof in Uster grenzenden Wiese.

¹ M. RAINER, Malacologia 5, 341 (1967).

² F. BALTZER, Arch. Zellforsch. 77, 152 (1913).

³ M. PERROT, Rev. suisse Zool. 45, 487 (1938).

Wir untersuchten Mitosen aus Zwitterdrüse, Mitteldarmdrüse und Mantelrand. Die Chromosomen der Mitteldarmdrüsen- und Mantelrandmitosen waren höchstens $\frac{1}{4}$ so lang wie die der Zwitterdrüsenmitosen. Deswegen wurde nur die Zwitterdrüse für die Chromosomenuntersuchungen verwendet.

Lebenden Tieren wurden die obersten Schalenwindungen mit verdünnter Salpetersäure angeätzt und mit einer Pinzette entfernt. Dann bekamen 8 der 9 untersuchten Tiere 0,2 ml einer isotonischen 0,04%-Colcemidlösung in 3-4 Portionen an verschiedenen Stellen in die Zwitterdrüse injiziert. Nach 2-4 h Aufenthalt in einer Feuchtkammer wurden die Schnecken dekapitiert, ihre Zwitterdrüsen herauspräpariert, diese 10 min in aqua dest. hypotonisch behandelt und anschliessend 1 h in 45% Essigsäure fixiert. Dieses Verfahren zogen wir einer Alkohol-Essigsäurefixierung vor, weil bei letzterer das Gewebe der Drüse hart wird und sich nicht mehr genügend quetschen lässt. Das Gewebe kam dann zum Färben für 24-72 h in orceingetränkte 45%-Essigsäure. Vor dem Quetschen wurden die Zwitterdrüsen in einer Mischung aus konzentrierter Milchsäure und 45% Orcein-Essigsäure im Verhältnis 1:1 gespült, um Orceinkristalle zu entfernen. Das Quetschen geschah in der gleichen Mischung. Auf diese Art wurden auch Präparate ohne vorherige Colcemidbehandlung hergestellt.

Das Quetschen erfolgte zum Teil mit dem Daumen, zum Teil mit einer sogenannten Blindprägepresse. Die handgequetschten Präparate zeigten fast nie Luftblasen, doch waren die Metaphasenplatten in den seltensten Fällen eben. Unter der Lupenvergrößerung des Mikroskops wurden die betreffenden Stellen mit einer feinen Pinzette nachgequetscht. Maschinengequetschte Präparate zeigten mehr Plattenbruchstücke und Einzelchromosomen als die handgequetschten, doch waren die Platten ebener. Nach

dem Quetschen wurde die Fuge zwischen Objektträger und Deckglas mit Nagellack verschlossen. Diese Präparate zeigten nach 6 Wochen Aufbewahrung im Eisschrank keine Schäden.

Der normale Karyotyp. Von den 44 Chromosomen von *Cepaea hortensis* sind das 1. und 2. Paar submediozentrisch. Das 1. ist fast doppelt so lang wie das 2. (Figur 1). An 3. und 4. Stelle im Karyotyp folgen submedio- bis subtelozentrische Chromosomen. In Mitosen mit schwach kontrahierten Chromosomen lassen sich diese vier noch der Länge nach unterscheiden (Figur 2). In solchen Mitosen ist darüber hinaus noch das 5. Paar identifizierbar. Dieses ist submediozentrisch und kleiner als das 4. Chromosom. Die übrigen Chromosomen sind etwa gleich gross und medio- bis submediozentrisch. Gelegentlich ist noch ein kleines, deutlich subtelozentrisches Chromosom zu identifizieren, das letzte auf Figur 1. Wir fanden diesen Karyotyp in 8 der 9 untersuchten Tiere.

Der aberrante Karyotyp. Bei einem Tier von *C. hortensis* vom Klotener Ried, das nicht mit Colcemid behandelt worden war, zeigten die Chromosomen einen geringeren Spiralisationsgrad als die colcemidbehandelten (Figur 2). Bei diesem Tier lag das Centromer des ersten Chromosoms nicht submediozentrisch wie im normalen Karyotyp, sondern subtelozentrisch. 9 Mitosen dieses Typs wurden analysiert. Die Platten waren alle unvollständig, aber alle zeigten das aberrante 1. Chromosom. Das mittlere Armverhältnis normaler 1. Chromosomen beträgt 1,2, dasjenige aberranter 1. Chromosomen 4,9. Den Mittelwerten liegen 17 bzw. 16 Messungen zugrunde.

Diskussion. Diese abgeänderte Chromosomenform lässt sich am einfachsten mit einer perizentrischen Inversion erklären. Beide 1. Chromosomen unseres Ausnahmetieres zeigten die veränderte Chromosomenstruktur. Da wir ausschliessen, dass zwei Ereignisse beide Partner eines Homologenpaares gleichartig verändern, muss das Ereignis in einer früheren Generation passiert sein. Das jüngste denkbare Alter der Aberration ist eine Generation, wenn nämlich die angenommene Inversion im mütterlichen Tier stattgefunden hat und durch Selbstbefruchtung, die bei dieser Art zwar selten, aber möglich ist⁴, in den Nachkommen homozygot geworden ist. Falls jedoch keine Selbstbefruchtung vorliegt, muss unser Ausnahmetier von beiden Eltern ein aberrantes Chromosom erhalten haben. Die Inversion muss dann spätestens in der Grosselterngeneration entstanden sein. In diesem Fall ist anzunehmen, dass es sich um einen chromosomalen Polymorphismus handelt. Unter insgesamt acht 1. Chromosomen vom Klotener Ried waren 2 aberrant. Eine Schätzung für $\alpha = 5\%$ ergab für die Häufigkeit des aberranten Chromosoms eine untere Vertrauensgrenze von 3,2% und eine obere von 65,1%.

Die Chromosomenzahl von *C. hortensis* ist zum ersten Mal von KLEINERT⁵ im Rahmen einer Spermatogonien-

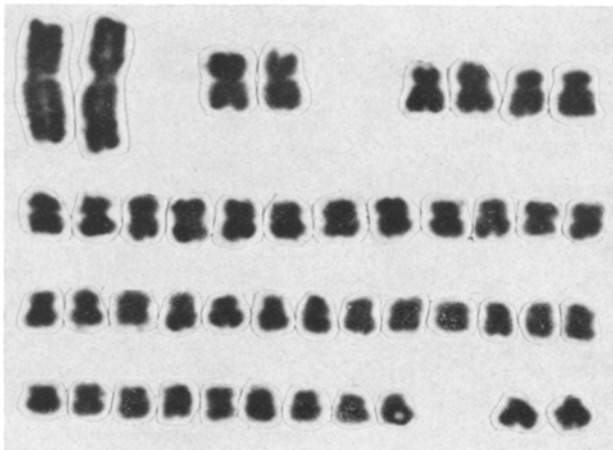


Fig. 1. Normaler Karyotyp von *Cepaea hortensis*, $2n = 44$; Colcemid-Behandlung. Das Armverhältnis des 1. Chromosoms beträgt 1,2.

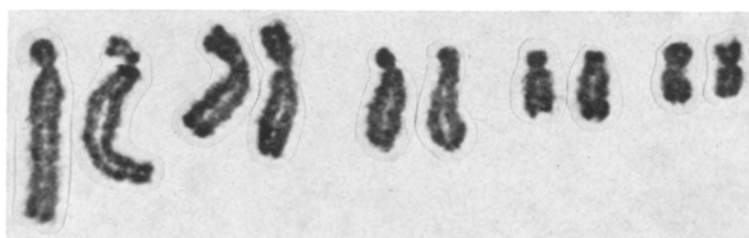


Fig. 2. Aberranter Karyotyp von *Cepaea hortensis*, ohne Colcemid-Behandlung. Das Armverhältnis des 1. Chromosoms beträgt 4,9.

⁴ A. LANG, Z. indukt. Abstamm. u. Vererb. Lehre 8, 233 (1912).

untersuchung mit $2n = 48$ angegeben worden. Er zählte aber auch 45, 42 und 40 Chromosomen, hielt diese Zahlen jedoch für Zählfehler. Es scheint nicht ausgeschlossen, dass in seinem Material mehrere Chromosomenzahlen vorlagen. Alle vier von RAINER¹ untersuchten Tiere hatten haploid 30 Chromosomen. In dem von ihm abgebildeten Chromosomensatz gibt es ein sonst bei *C. hortensis* nicht vorhandenes kleines Chromosom. Das 1. Chromosom ist nur wenig länger als das 2. im Gegensatz zum 1. Chromosom bei haploid 22 Chromosomen. Von 5 Untersuchern haben 2, vielleicht 3, Veränderungen am Chromosomensatz von *C. hortensis* gesehen, die sicher alle auf Bruchereignisse zurückgehen. *Cepaea* scheint relativ unempfindlich gegen Veränderungen des Karyotyps zu sein⁶.

Summary. The karyotype of 9 *Cepaea hortensis* were analyzed. The haploid chromosome number was 22. 2 types of longest chromosomes were encountered. In

8 out of 9 animals, the longest chromosome had an arm ratio of 1.2. One animal showed a ratio of 4.9. This aberration is thought to have arisen by a pericentric inversion. Because both the normal and the aberrant chromosome coexisted in the same population, a chromosomal polymorphism seems to be present.

ST. ARRENBRECHT,
ELISABETH HAUSCHTECK-JUNGEN
und H. JUNGEN

Zoologisches Museum der Universität Zürich,
Künstlergasse 16, CH-8006 Zürich (Schweiz),
13. April 1970.

⁵ M. KLEINERT, Jena. Z. Naturw. 45, 445 (1909).

⁶ Wir danken Fräulein ELISABETH RÄBER für die technische Assistenz.

The Effect of Alkylation on the Antimicrobial Activities of 7-Hydroxy- and 4-Hydroxycoumarins

Although it has been reported that some natural coumarins possess antibacterial or antifungal properties^{1,2}, the effects of structural variations on microbial inhibition are not well established. In the case of bacteria, some relations between structure and antibacterial activity were recently proposed by DADÁK and HÖDÁK³ on the basis of the effects of 15 natural coumarins and derivatives on bacterial growth. All were inactive against Gram-negative microorganisms (*Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes* and *Serratia marcescens*). However, growth of Gram-positive organisms belonging to the genera *Staphylococcus*, *Micrococcus* and *Bacillus* were inhibited by ammosesinol I, dicoumarol II, and ostruthin III, I being 2–5 times more effective than II or III. DADÁK and HÖDÁK pointed out that the activity of ammosesinol is dependent on the presence of the free hydroxyls at positions 4 and 7, since the dimethyl derivative of I was completely inactive. The particular importance of the free hydroxyl at position 4 for antibacterial activity was also indicated by the inhibitory effect of dicoumarol II. The antibacterial activity of ostruthin appears to require both the free 7-hydroxyl group and the carbon-linked, unsaturated geranyl group, since methylation of the hydroxyl and removal of the side chain (to give 7-hydroxycoumarin) resulted in partial or complete loss of activity.

We have now investigated the effects of *O*-alkylation and *O*-benzoylation on the inhibitory effects of simple monohydroxy-coumarins on microbial growth. With the exception of *Byssoschlamys fulva* 7-hydroxycoumarin IVa was inactive against the variety of molds and yeasts shown in Table I. In contrast to the inactivity of IVa, the methyl ether IVb strongly inhibited the growth of 5 *Aspergillus* species, of *Byssoschlamys fulva*, and of 8 of the 9 species of yeasts examined. The activity of 7-ethoxycoumarin IVc was similar to that of 7-methoxycoumarin and it strongly inhibited growth of all of these fungi.

7-Benzoyloxycoumarin IVf inhibited growth of *Candida chalmersii* and *Saccharomyces mellis*. With these two exceptions the antifungal properties of 7-geranyloxy- IVd, 7-allyloxy- IVe, 7-benzyloxy- IVf, and 7-benzoyloxycoumarin IVg were similar to those of the parent 7-hydroxycoumarin IVa, i.e. they inhibited *Byssoschlamys fulva* but were ineffective against *Aspergillus* species and

yeasts. Groupings such as allyloxy-, benzyloxy-, and geranyloxy- are structurally and chemically related in that, being α, β -unsaturated, they are much more readily hydrolyzed or hydrogenolyzed than stable methoxy- or ethoxy-groups. The inactivity of these derivatives IVd–g may be due, therefore, to their facile enzymic hydrolysis or hydrogenolysis to the inactive 7-hydroxycoumarin.

