



Chromatogram showing amino acids and amides of healthy and "Yellow mosaic" infected leaves of *Hibiscus esculentus*. A and D Reference solutions HA(1) and HA(3)—Alcoholic extract of healthy leaves 0.001 and 0.003 ml spotted. MA(1) and MA(3)—Alcoholic extract of Mosaic leaves. YA(1) and YA(3) alcoholic extract of yellow mosaic leaves—severe infection.

From left to right: Section No. I: Ha(1); Section No. II: HA(1); Section No. III: YA(1); Section No. IV: A; Section No. V: HA(3); Section No. VI: MA(3); Section No. VII: YA(3); Section No. VIII: D.

quantities that the faint bands disappeared in no time and could not be photographed. 0.01 ml of healthy leaf extract spotted on a separate chromatogram confirmed the presence of the above-mentioned amino acids in healthy leaves also though in a lesser quantity. Tyrosine (av. Rf 0.67; III) band was extremely deep in the "Yellow-Mosaic" leaves and its intensity decreased considerably in the "Completely Yellow" leaves although its concentration still remained more in comparison to that of the healthy leaves. Aspartic acid (av. Rf 0.45; VII; absence of glycine and serine established by running the chromatogram in phenol saturated with buffer of pH 12) also increases considerably in the "Yellow Mosaic" leaves but it does not show any variation as noted in tyrosine.

The amide asparagine (av. Rf 0.395; VIII) overlapped with the new band (IX) is a new formation in the "Yellow Mosaic" and the completely yellow leaves. The intensity of this band is more in the latter case. It appears that concomitant with the severity of infection, there is an increased formation of asparagine.

Other common amino acids present in alcoholic extracts were glutamic acid (av. Rf 0.51; threonine absent; VI), alanine (Rf 0.56; V), and one more having average Rf value 0.60 (IV) which is amino-butyric acid.

Metabolic processes, leading to the formation of asparagine, increase in leucine, isoleucine, phenylalanine, tyrosine, and aspartic acid in the "Yellow Mosaic" leaves and decrease in tyrosine from "Yellow-Mosaic" to "completely Yellow" leaves, are yet to be studied and explained. Only biochemical studies on "Yellow-Mosaic" virus of "Bhindi" (*Abelmoschus esculentus*) itself can reveal which of these amino acids are the constituents of virus protein and which of these remain simply as the changed metabolites of the host.

We are grateful to Prof. SHRI RANJAN for his kind encouragement and interest in our work. We thank SRI K. S. BILGRAMI and KUMARI RAJNI VERMA for their valuable help during this investigation.

GOVINDJEE, M. M. LALORAYA,
and T. RAJA RAO

Department of Botany, University of Allahabad, India,
December 16, 1955.

Zusammenfassung

Papierchromatographische Analysen der freien Aminosäuren und Amide in gesunden und mit «yellow mosaic»-Virus infizierten Blättern von *Abelmoschus esculentus* zeigen neben einer Zunahme von Leucin, Phenylalanin, Valin + Methionin und Asparaginsäure die Bildung einer neuen, ninhydrinpositiven Substanz und Asparagin in den infizierten Blättern. Es werden Anregungen für weitere Untersuchungen gemacht.

Die Bildung von Fusarinsäure durch *Fusarium lycopersici* in vivo

Fusarium lycopersici Sacc., der Erreger einer Welkekrankheit an Tomatenpflanzen, bildet in Reinkultur neben andern biologisch wirksamen Stoffwechselprodukten auch das Welketoxin *Fusarinsäure* (5-n-Butyl-picolinsäure)¹. Aus Kulturen einiger verwandter pflanzen-

¹ E. GÄUMANN, ST. NAEF-ROTH und H. KOBEL, *Phytopath. Z.* 20, 1 (1952). – PL. A. PLATTNER, W. KELLER und A. BOLLER, *Helv. chim. Acta* 37, 1379 (1954). – E. HARDEGGER und E. NIKLES, *Helv. chim. Acta* 39, 223 (1956).

parasitischer Pilze konnte ebenfalls Fusarinsäure isoliert werden². Das Toxin verursacht an Pflanzensprossen ähnliche Schädigungen (Blattnekrosen usw.), wie sie an infizierten Pflanzen auftreten; es darf deshalb vermutet werden, dass diese Pilze auch im Innern der Wirtspflanzen Fusarinsäure zu bilden vermögen.

Der direkte Nachweis der Fusarinsäure in infizierten Pflanzen stösst auf erhebliche methodische Schwierigkeiten. Es ist auf jeden Fall anzunehmen, dass die Fusarinsäure nur in sehr geringen Mengen gebildet und überdies in der Pflanze zum Teil in andere Verbindungen umgewandelt wird³. In jüngster Zeit wurde der Nachweis von Fusarinsäure in Baumwollpflanzen nach Infektion mit *Fusarium vasinfectum* Atk. mit Hilfe der Papierchromatographie des Fusarinsäure-Kupfer-Komplexes beschrieben⁴. Eine weitere Möglichkeit zur Überbrückung experimenteller Hindernisse bildet die Verwendung von radioaktiven Isotopen.

In früheren Versuchen war gezeigt worden, dass in Tomatenpflanzen bereits 36 h nach Infektion mit markiertem Myzel von *Fusarium lycopersici* radioaktive Stoffwechselprodukte nachweisbar sind⁵. Die Radioaktivität war in stark erkrankten Blättern höher als in den relativ wenig geschädigten; dies könnte darauf hinweisen, dass ein Teil der radioaktiven Stoffwechselprodukte für die Wirtspflanze giftig ist. Versuche, in diesen mit markiertem Myzel infizierten Pflanzen Fusarinsäure mit Hilfe der Isotopenverdünnungstechnik⁶ nachzuweisen, schlugen wegen der zu geringen Radioaktivität der Extrakte fehl; dagegen gelang die Anwendung dieser Methode bei Pflanzen, die nach der Infektion mit inaktivem Myzel von *Fusarium lycopersici* in eine Atmosphäre von radioaktivem Kohlendioxyd gebracht wurden.

Versuchsordnung. Junge Tomatenpflanzen der Sorte Tuckerswood wurden nach der üblichen Methode mit *Fusarium lycopersici* (Stamm R-5-6) infiziert und 48 bis 72 h später in einem geschlossenen Glasgefäss einer $C^{14}O_2$ -Atmosphäre (entwickelt aus $Na_2C^{14}O_3$ mit Salzsäure) ausgesetzt. Die Pflanzen erhielten in Abständen von zwei Tagen fünfmal rund 50 μC , im ganzen also rund 250 μC $C^{14}O_2$ vorgesetzt. Nach 10 Tagen zeigten die Pflanzen deutliche Krankheitssymptome (braune Stengelgefässe, Blattnekrosen); sie wurden nun mit Quarzsand fein zerrieben und mit 85prozentigem Äthanol (200 ml Lösungsmittel pro Gramm frischen Pflanzenmaterials) extrahiert. Der Extrakt wurde bei 40°C am Vakuum von Äthanol befreit und nach Entfernung der Farbstoffe mit Hilfe eines Seitz-Filters mit einer bestimmten, zwischen 30 und 50 mg liegenden Menge inaktiver Fusarinsäure versetzt. Hierauf erfolgte bei pH 8,0 im Küscher-Studel-Apparat mit Äther während 72 h die Entfernung von Fetten, Ölen usw. und anschliessend bei pH 4,0 ebenfalls mit Äther während 72 h die Extraktion der Fusarinsäure. Der Ätherextrakt wurde zur Trockne eingedampft und mit Petroläther-Ligroin 1:1 3 h am Rückfluss gekocht. Der unlösliche Rückstand wurde verworfen und der lösliche Anteil nach Eindampfen zur Trockne mit Hexan 2 h am Rückfluss gekocht. Nach Einengen dieser Lösung kristallisierte in der Kälte

die Fusarinsäure aus. Die weitere Reinigung geschah durch Umkristallisieren aus Hexan. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte durch Verbrennung zu Bariumkarbonat⁷; zur Zählung diente ein ELA-2-64-Zähler der Firma Landis & Gyr AG., Zug (Schweiz), mit einem EQB-1-Geiger-Müller-Zählrohr (Fensterdurchmesser 25 mm, Fensterdicke etwa 2 mg/cm²). Nach der vierten oder fünften Reinigung blieb die spezifische Radioaktivität der extrahierten Fusarinsäure meist konstant. Die Reinheit der Fusarinsäure konnte durch Radiochromatogramme⁸ bestätigt werden.

Ergebnisse. Infizierte und nichtinfizierte Tomatenpflanzen wurden einer $^{14}CO_2$ -Atmosphäre ausgesetzt. Die auf die beschriebene Weise aus Extrakten infizierter Pflanzen isolierte Fusarinsäure zeigte eine Radioaktivität von 88 bis 163 Impulsen/min und pro Milligramm. Die Werte sind relativ gering, aber deutlich gesichert. Kontrollversuche mit Extrakten aus nichtinfizierten Tomatenpflanzen ergaben keine gesicherte Radioaktivität. Es lässt sich vorläufig nicht entscheiden, ob die radioaktive Substanz Fusarinsäure selbst oder eine nahe verwandte Verbindung (zum Beispiel Dehydrofusarinsäure⁸) darstellt; doch darf aus diesen Versuchen geschlossen werden, dass der Pilz *Fusarium lycopersici* während seines parasitischen Lebens in der Pflanze Fusarinsäure oder eine mit ihr sehr nahe verwandte Verbindung zu bilden vermag. Weitere Untersuchungen über diese Frage sind im Gang.

Der Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz möchten wir für die Ermöglichung dieser Untersuchungen herzlich danken; den Herren Dr. E. HARDEGGER und E. NIKLES vom Organisch-chemischen Laboratorium unserer Hochschule danken wir für ihre freundliche Hilfe und besonders für die Herstellung der Fusarinsäure.

H. KERN und D. KLUEPFEL

Institut für spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, den 5. März 1956.

Summary

With the aid of isotope dilution methods, it has been possible to show that the fungus *Fusarium lycopersici* forms the wilt toxin, *fusaric acid* (or a closely related substance), not only in pure culture but also during its parasitic life in tomato plants.

⁷ D. D. VAN SLYKE, J. PLAZIN und J. R. WEISIGER, J. biol. Chem. 191, 299 (1951). – T. YABUTA, K. KAMBE und T. HAYASHI, J. Agric. chem. Soc. Japan 10, 1059 (1934). – CH. STOLL, Phytopath. Z. 22, 233 (1954).

⁸ CH. STOLL, Phytopath. Z. 22, 233 (1954).

Effects of Local Anesthetics on Resting Potential of Myelinated Nerve Fibres

The effects of local anesthetics on resting potential of nerve fibres are not yet clearly described. Most authors report a hyperpolarization (BISHOP¹, SHANES², BENNET and CHINBURG³, POSTERNAK⁴), TASAKI⁵ (using an in-

² E. GÄUMANN, St. NAEF-ROTH und H. KOBEL, Phytopath. Z. 20, 1 (1952). – T. YABUTA, K. KAMBE und T. HAYASHI, J. Agric. chem. Soc. Japan 10, 1059 (1934). – CH. STOLL, Phytopath. Z. 22, 233 (1954).

³ B. D. SANWAL, Phytopath. Z. 25, 333 (1956).

⁴ K. LAKSHMINARAYANAN und D. SUBRAMANIAN, Nature 176, 679 (1955).

⁵ H. KERN und B. D. SANWAL, Phytopath. Z. 22, 449 (1954).

⁶ Zum Beispiel: M. CALVIN, Ch. HEIDELBERGER, J. C. REID, B. M. TOLBERT und P. E. YANKWICH, *Isotopic Carbon* (J. Wiley & Sons, Inc., New York 1949).

¹ G. H. BISHOP, J. cell. comp. Physiol. 1, 177 (1932).

² A. M. SHANES, J. cell. comp. Physiol. 38, 17 (1951).

³ A. L. BENNET and K. G. CINBURG, J. Pharmacol. 88, 72 (1946).

⁴ J. POSTERNAK, Personal communication.

⁵ I. TASAKI, *Nervous Transmission* (Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, 1953), p. 92.