

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.

direct method) and HÖBER⁶ found no potential change, ZIPF⁷ observed a depolarization.

The whole subject was therefore studied again by using a new method for recording resting potential (STÄMPFLI⁸). This method has two advantages (i) that nearly the true value of resting potential changes is measured and (ii) that the exact time course of potential changes can be recorded by switching rapidly from one solution to the other.

The apparatus and experimental procedure have been previously described (STRAUB⁹). The method needs a constant flow of Ringer's, sucrose and test solutions. Changes in the rate of flow of these solutions may cause changes of the recorded potential. Special care was taken in these experiments to avoid irregularities of flow, as the measured potential changes were very small and within the limits of error of ordinary experiments. Changing of solutions was facilitated by using a new stop cock (KILB and STÄMPFLI¹⁰).

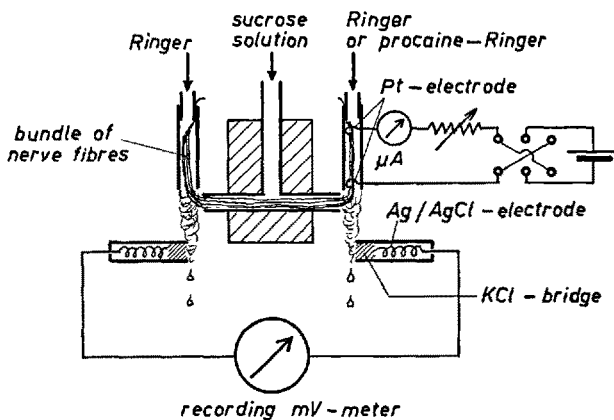


Fig. 1.—Arrangement of the apparatus for recording resting potential and electrotonus device.

Procaine hydrochloride¹¹ was added to normal Ringer solution and the resting potential in this solution compared with the resting potential in Ringer. During the same experiment solutions were changed several times and the arithmetical mean of the measured effect was used as final result.

Electrotonus. In some experiments fibres were influenced by anelectrotonus or catelectrotonus by flowing an extrapolar current across them with the arrangement shown in Figure 1. The potential change produced in this way was taken as true average resting potential change of the nodes in immediate vicinity of the sucrose gap. The current across the electrotonus-circuit did not change appreciably.

Effect of procaine on resting potential

Ringer containing 1 mM procaine produced rapidly a rise of resting potential. The means and standard errors of means of 7 experiments are summarized in Table I.

⁶ R. HÖBER, M. ANDERSCH, J. HÖBER, and B. NEBEL, *J. cell. comp. Physiol.* 13, 195 (1939).

⁷ K. ZIPF, *Arch. exper. Path. Pharmacol.* 149, 105 (1930).

⁸ R. STÄMPFLI, *Exper.* 10, 508 (1954).

⁹ R. STRAUB, *Helv. physiol. Acta* 14, 1 (1956).

¹⁰ K. KILB and R. STÄMPFLI, *Helv. physiol. Acta* 13, 191 (1955).

¹¹ Kindly provided by Specia, Paris.

In all experiments procaine caused a rise of resting potential, beginning at the moment, when the procaine solution came into contact with the nerve fibres and lasting about 60 s. Afterwards the resting potential remained on the new value as long as 10 or 15 min (4 experiments). After going back to Ringer and washing for 5 min the procaine effect was reproducible.

When going back to Ringer the resting potential did not change immediately but seemed to fall slowly towards the initial value.

Electrotonus experiments

Influence of catelectrotonus on the procaine-effect.—Nerve fibres in catelectrotonic state were depolarized by procaine. In 7 experiments a mean electrotonus of 13 mV was applied. After switching from Ringer to procaine-solution the recorded potential showed a slow decrease (Table II).

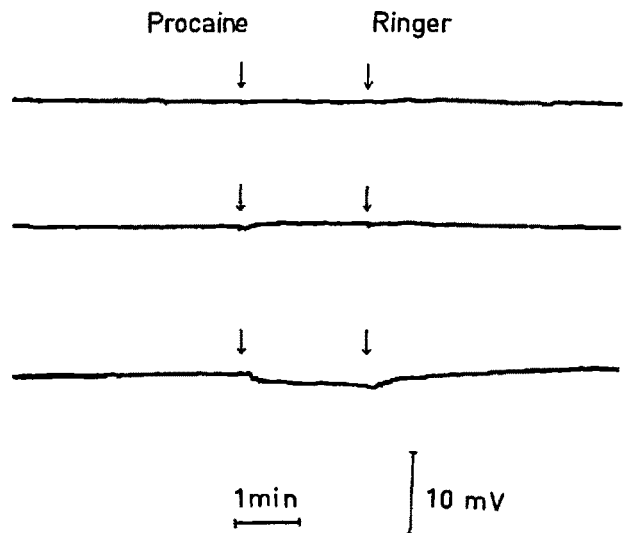


Fig. 2.—The influence of electrotonus on the procaine effect. The curves show resting potential recorded from nerve fibres which were either on normal potential level (middle curve), or brought in anelectrotonic (top curve) or catelectrotonic state (bottom curve). Procaine (1 mM) produces no potential change on fibres in anelectrotonic state, a small hyperpolarization on fibres on normal potential level and a depolarization on catelectrotonized fibres.

These potential variations were significantly different from the corresponding procaine induced resting potential changes without electrotonus ($P < 0.01$ for 15 s, < 0.001 for 30, 60, and 120 s).

Influence of anelectrotonus on the procaine-effect

Procaine produced no potential change on nerve fibres in anelectrotonic state (6 experiments). A mean electrotonus of 17 mV was applied and the procaine-effect studied as above (Table III).

Compared to the procaine-effect without electrotonus there is a significant difference ($P < 0.02$ for 15 s, < 0.01 for 30, 60, 120 s).

In a previous paper we came to the conclusion that procaine decreases K and Na permeability of nerve fibres (STRAUB¹²). Even knowing those permeability changes, we cannot foresee the procaine-effect on resting potential, because a decrease of K permeability would

¹² R. STRAUB, *Arch. int. Pharmacodyn.* (in the press).

Table I.—Procaine-effect on the resting potential.

Time after switching to procaine solution	15 s	30 s	60 s	120 s
Recorded potential change in mV (Mean $\pm$ S. E. of mean)	+ 0.19 $\pm$ 0.10	+ 0.34 $\pm$ 0.18	+ 0.56 $\pm$ 0.28	+ 0.55 $\pm$ 0.30
Range	+ 0.03 to 0.37	+ 0.03 to 0.53	+ 0.06 to 1.0	+ 0.03 to 1.0

Table II.—Procaine-effect on catelectrotonized fibres.

Time after switching to procaine solution	15 s	30 s	60 s	120 s
Recorded potential change in mV (Mean $\pm$ S. E. of mean)	- 0.22 $\pm$ 0.31	- 1.06 $\pm$ 0.41	- 1.49 $\pm$ 0.48	- 1.74 $\pm$ 0.66
Range	+ 0.07 to - 1.37	- 0.4 to - 1.52	- 1.0 to - 2.15	- 1.0 to 2.5

Table III.—Procaine-effect on anelectrotonized fibres.

Time after switching to procaine solution	15 s	30 s	60 s	120 s
Recorded potential change in mV (Mean $\pm$ S. E. of mean)	- 0.10 $\pm$ 0.23	0.005 $\pm$ 0.36	0.03 $\pm$ 0.66	- 0.20 $\pm$ 0.43
Range	+ 0.07 to - 0.35	+ 0.2 to - 0.3	+ 0.43 to - 0.33	+ 0.32 to - 0.70

lower, a decrease of Na permeability raise the resting potential. All depends therefore on the unknown relative magnitude of Na and K permeability. As procaine produced a hyperpolarization, we suppose that the decrease of Na permeability is more important than the lowered K permeability. This view is supported by observation of TASAKI¹³ that the resistance of the nodal membrane is practically unaffected by cocaine. HUXLEY and STÄMPFLI¹³ showed that the plasma membrane has normally a relatively high K-permeability. The K-permeability therefore cannot be expected to decrease much under the influence of local anesthetics without altering the membrane resistance. Hence the main effect of local anesthetics seems to be the decrease of Na-permeability. SCHOEFFLE and GRANT¹⁴ have come to the same conclusion. Another possibility to explain the hyperpolarization produced by procaine is to suppose that the internal K-concentration has in some way increased under the action of procaine. This can be excluded because the procaine hyperpolarization is observed in K-free solutions as well (STRAUB¹²).

Nerve fibres in catelectrotonic state were depolarized by procaine. This fact could be explained in the following way: Lowering the resting potential increases the K-permeability (HUXLEY and STÄMPFLI¹³) and brings the "Na carrying system" into a state of inactivation (HODGKIN and HUXLEY¹⁵). A further decrease of Na-permeability is then hardly possible, but a decrease of

¹³ A. F. HUXLEY and R. STÄMPFLI, J. Physiol. 112, 496 (1951).
¹⁴ G. M. SCHOEFFLE and J. M. GRANT, Amer. J. Physiol. 177, 187 (1954).
¹⁵ A. L. HODGKIN and A. F. HUXLEY, J. Physiol. 117, 500 (1952).

K-permeability would account for the observed depolarization.

The resting potential of nerve fibres in anelectrotonic state is not altered by procaine. Now the Na-permeability is again low (resting state of "Na carrying system") because of the high resting potential, but the K-permeability is reduced as well. Therefore local anesthetics may have no effect on nerve fibres in anelectrotonic state, because an additional reduction of Na- and K-permeability would, if it occurred, have little or no effect.

This work was carried out with the aid of the Swiss National Foundation for Scientific Research.

My thanks are due to Prof. STÄMPFLI, Homburg, for much valuable help and criticism.

R. STRAUB¹⁶
Physiological Institute of the Saar-University, Homburg, Saarland, December 21, 1955.

Zusammenfassung

Das Ruhepotential von markhaltigen Nervenfasern des Frosches wird mit einer neuen Methode fortlaufend registriert. 1 mM Procain in Ringer erhöht es rasch um 0,5 mV. Nervenfasern in katelektrotonischem Zustand werden durch die gleiche Procainlösung um 1,5 mV depolarisiert, unter Anelektrotonus wird ihr Ruhepotential hingegen durch Procain nicht verändert. Diese Resultate lassen sich unter der Annahme erklären, dass Procain vorwiegend auf das Na-Überträgersystem im Sinne einer Verminderung der Na-Permeabilität wirkt.

¹⁶ Present adress: National Institute for Medical Research, Mill Hill, London N.W. 7.