

Zusammenfassung

Es wird festgestellt, dass in jungen Erbsenkeimlingen, die ihrer Kotyledonen beraubt wurden, einige freie Aminosäuren fehlen. Wenn solche Keimlinge mit Pyridoxinlösung infiltriert werden, ist jedoch unter ihren freien Aminosäuren auch die sonst fehlende Glutaminsäure nachweisbar.

Utilization of iron from Ethylenediamine Tetraacetic Acid-Iron Chelate Complex in Culture Medium by *Fusarium*

The need for this investigation arose while the writers were engaged with the problem of the role of micronutrients in fungi, especially in the reduction of nitrates and sulphates by *Fusarium lycopersici* Sacc. (strain ETH 5414, kindly supplied to us by Dr. H. KERN of the Swiss Federal Institute of Technology, Zurich). When iron as $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ was added to the purified Richard's medium, it invariably led to the precipitation of the insoluble ferric phosphate even at pH 4.0. The only possibility that suggested itself was the use of some chelating agent in the artificial culture medium to check the formation of the precipitate. Some workers on microbial nutrition¹ have used hydroxycarboxylic acids as the chelating agents, but this procedure has been criticized² on the ground that such acids are regular participants in the fungal metabolism. SCHATZ and HUTNER³ have recommended the use of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) in this connection. EDTA forms soluble chelate complexes with many metallic ions, e.g., Fe^{++} , Ca^{++} and Mg^{++} etc.³. While EDTA has found excellent usage as a chelating agent for nutritional work with higher plants, algae⁴ etc., and seems to be biologically inert for them, no irrevocable proof of its inertness is available as regards the fungi. REISCHER⁵ has used EDTA as a chelating agent in his work on the inorganic nutrition of Saprolegniaceae without any adverse effects. FRIES⁶, however, finds EDTA toxic for some species of *Coprinus* in artificial culture, specially in pH ranges below 7. Before using the chelating agent, therefore, its effect on the growth of *Fusarium* had to be ascertained.

Fusarium lycopersici was grown in Richard's medium in 2 series of Erlenmeyer flasks of 150 ml capacity. Each flask contained a total of 20 ml of the nutrient solution. In one series of flasks 5 mg of iron per l as iron-EDTA complex was added (for preparation see ARNON *et al.*⁷) and in the other series an equivalent amount of iron as $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ was included. Apart from iron, all the flasks received an optimal quantity of a micronutrient solution⁷. Glass (Pyrex) redistilled water was used in making solutions and the latter were adjusted to a pH

of 4.0 before autoclaving. The flasks received a uniform amount of conidial suspension raised in rice cultures⁸. They were incubated in the dark at 25°C. After every second day of growth, replicate flasks from each series were taken, acidified with redistilled HCl to a pH of 2.0 (to dissolve any precipitated iron phosphate) and filtered through a weighed Whatman filter no. 40. The mycelium was washed with 50 ml of acidified redistilled water and the filter paper along with the mycelium was dried overnight at 60°C and finally at about 105°C for a further period of 3 h. These were then weighed in a balance. Total iron in the mycelium was determined by using the α - α' -dipyridyl reagent⁹. A weighed quantity of the mycelium was ashed in a crucible using a drop of iron-free HNO_3 towards the end. The residue was extracted with $\text{N} \cdot \text{HCl}$ solution and iron determined in this using a 10% solution of sodium sulphite to reduce the Fe^{+++} to Fe^{++} form. The pink colour was read off in a Spekker photoelectric colorimeter with the help of a green filter (maximal absorption near 520 μm) and the amount of iron estimated with the help of a standard curve.

Days	Total dry weight/ ml medium		$\mu\text{g Fe/mg mycelium}$ dry weight	
	with EDTA	without EDTA	with EDTA	without EDTA
	mg	mg		
3	3.5	3.3	0.046	0.036
5	5.0	3.5	0.027	0.030
7	7.0	7.0	0.030	0.034
9	8.0	7.3	0.042	0.039
11	9.1	9.0	—	—

The Table above summarizes the results of our investigation. It will be noticed that cultures with EDTA show a consistently better growth than those without the chelating agent. The total amount of iron in the mycelium, however, is nearly the same in both the series and within the range of experimental error. It is clear that EDTA in the amounts used here is not at all toxic to the fungus, and in fact it supports slightly better growth of the organism, perhaps because EDTA does not allow the iron ions to precipitate as the insoluble iron phosphate and thus maintains a constant supply of the micronutrients in the medium in a soluble form.

When *Fusarium lycopersici* is growing on nitrate as the sole source of nitrogen in the medium, the pH of the culture solution rises as the nitrate ions are assimilated¹⁰. When maximum growth has taken place on the Richard's medium, the pH reaches about 7.0. EDTA is undissociated or partly dissociated at pH values below 7 and the cause of its toxicity has been correlated⁶ to the undissociated EDTA in the medium used for culturing certain *Coprinus* species. In the organism which we have used for experimentation, however, such toxicity is not noted at pH values between 4.0 and 7.0. It is quite possible that different fungi behave differently with regard to the presence of EDTA. This is being further investigated in our laboratories.

We thank Prof. P. MAHESHWARI, Head of the Botany Department of Delhi University, for extending to us all the necessary laboratory

¹ H. S. REED and A. R. C. HAAS, Bot. Gaz. 77, 290 (1924).

² A. SCHATZ and S. H. HUTNER, Soc. Amer. Bacteriol., Abs. and Papers, 1949, 34.

³ G. SCHWARZENBACH and H. ACKERMANN, Helv. chim. Acta 31, 1029 (1948).

⁴ D. I. ARNON, P. S. ICHIOKA, G. WESSEL, A. FUJWARA, and J. T. WOOLEY, Physiol. Plant. 8, 538 (1955).

⁵ H. S. REISCHER, Mycologia 43, 142 (1951).

⁶ L. FRIES, Svensk bot. Tidskr. 50, 47 (1956).

⁷ The micronutrient solution per litre consisted of: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.069 mM; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.015 mM; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.004 mM; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.004 mM; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0003 mM; $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0004 mM; $\text{NaVO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.0004 mM.

⁸ H. KERN, Phytopath. Z. 19, 351 (1952).

⁹ F. D. SNELL and C. T. SNELL, Colorimetric methods of analysis, 3rd ed. (Van Nostran, New York, 1948).

¹⁰ B. D. SANWAL, Phytopath. Z. 25, 333 (1956). — G. LUTZ, Phytopath. Z. 7, 585 (1934).

facilities and permitting one of us (R.S.S.) to work in the Botany laboratories.

B. D. SANWAL and R. S. SANDHU

Department of Botany, University of Delhi, India,
June 14, 1956.

Zusammenfassung

In der für Kulturen von *Fusarium lycopersici* verwendeten Richard-Nährlösung kann die Bildung von unlöslichem Eisenphosphat durch Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA, Komplexon III) verhindert werden. Das Myzelwachstum des Pilzes ist bei Zugabe des Komplexbildners eher besser; der Eisengehalt des Myzels bleibt ungefähr gleich. Im Unterschied zu Versuchen mit andern Pilzen wirkt also Komplexon III hier nicht toxisch.

Sullo sviluppo delle uova di *Phallusia mamillata* in condizioni di anaerobiosi

Nelle uova di Ascidie è stata descritta una precoce e ristretta segregazione dell'indofenolossidasi (RIES¹, REVERBERI e PITOTTI²). L'enzima, messo in evidenza con la Nadi-reazione, viene segregato dopo la fecondazione in corrispondenza della semiluna gialla di Conklin e va ad accumularsi nell'ulteriore sviluppo esclusivamente nei blastomeri della linea muscolare. L'enzima, legato ai mitocondri (REVERBERI³) viene inattivato dall'azide sodico ed è pertanto da identificarsi con la citocromossidasi (REVERBERI⁴). Il fatto, piuttosto eccezionale di questa segregazione enzimatica e mitocondriale precoce nei mioblasti sottoponeva all'attenzione il problema del suo eventuale significato; l'argomento è stato di recente affrontato da REVERBERI⁴ nell'uovo di *Phallusia mamillata* con l'azide sodico, inibitore specifico della citocromossidasi. I dati di queste esperienze rendono manifeste alterazioni localizzate unicamente nella coda delle larve. Poichè le anomalie venivano riferite causalmente, sia pure in modo indiretto, al blocco della citocromossidasi è stato ritenuto utile indagare l'andamento dello sviluppo delle stesse uova di *Phallusia* in condizioni di anaerobiosi. In queste condizioni l'enzima non viene chimicamente alterato, ma semplicemente reso afunzionale. Da ricordare è un recente lavoro di NIEUWKOOP⁵ che studiando l'influenza di diverse tensioni di O₂ sul meccanismo di azione del LiCl durante lo sviluppo di uova di *Ascidia malaca*, osserva anomalie caudali con basse tensioni di O₂.

Le esperienze da me effettuate sono state condotte su uova di *Phallusia mamillata*. Furono compiuti due ordini di esperimento: 1° trattamento delle uova con diverse percentuali di O₂; 2° trattamento delle uova con diverse percentuali di O₂ e contemporaneamente con azide sodico.

1° Le uova allo stadio di 8,32 blastomeri e di blastula venivano poste in piccole beute contenenti acqua di mare in cui si facevano gorgogliare miscele gassose di azoto

purificato e O₂ per ca. 3' determinandosi così nella beuta un'atmosfera stabile nella quale veniva fatto compiere lo sviluppo. Sono state prese in considerazione solamente quelle esperienze i cui controlli dettero almeno il 90% di larve perfettamente normali. Le miscele gassose erano formate da 20 parti di aria e 80 parti di azoto; 50 parti di aria e 50 parti di azoto; 80 parti di aria e 20 parti di azoto. Alcune prove sono state effettuate saturando le beute con azoto puro. Dopo ogni esperienza si effettuava sulle uova e nello stesso ambiente in cui era stato fatto compiere lo sviluppo la reazione di Nadi. I risultati mostrano che in atmosfera di azoto puro lo sviluppo si arresta. In atmosfere invece costituite nelle proporzioni di aria e di azoto suddescritte lo sviluppo embrionale è possibile e, a termine, si ottengono delle larve con anomalie caratteristiche solo a carico della coda che si presenta grossa, distorta ed incapace a provvedere ai normali movimenti di traslazione della larva. Le anomalie sono tanto più accentuate quanto più le miscele gassose contengono maggiori percentuali di azoto (figure 2, 3, 4). Le stesse larve presentano invece un tronco in cui le strutture sono normali: si nota un ottimo differenziamento dei tre palpi, la presenza della vescicola cerebrale e dei due organi sensoriali pigmentati. La reazione di Nadi effettuata negli embrioni fatti sviluppare nelle suddescritte condizioni è risultata sempre positiva.

2° Un secondo tipo di esperienze consistette nel trattare le uova contemporaneamente con azide sodico e anaerobiosi parziale. Fu usata una soluzione di NaN₃ M/1000 ed una miscela gassosa di 80 parti di aria e 20 parti di azoto. In tali condizioni le anomalie morfologiche della coda (figura 6) sono più evidenti che col semplice trattamento con azide M/1000 (figura 5) o col semplice trattamento con anaerobiosi (figura 2).

I risultati ottenuti portano un contributo affermativo all'ipotesi concernente l'azione esplicata dalla citocromossidasi nei processi morfogenetici dei mioblasti della larva. Infatti nelle condizioni sperimentali descritte, si notano nelle larve alterazioni localizzate unicamente nella coda, simili a quelle determinate con il trattamento con azide sodico. In questo caso la citocromossidasi risultò realmente bloccata poichè la reazione Nadi fu negativa, nel caso, invece, del trattamento in anaerobiosi, la Nadi risultò sempre positiva. Questo dato non è in contraddizione con i risultati ottenuti: può immaginarsi, infatti, una citocromossidasi non funzionante anche senza che in essa si sia verificato alcun blocco.

M. DE VINCENTIIS⁶

Istituto di Zoologia Università di Palermo e Stazione Zoologica di Napoli, il 13 aprile 1956.

Summary

The development of *Phallusia mamillata* in anaerobic conditions has been the subject of these studies. The anomalies of the larvae are caused by the muscular

¹ E. RIES, Pubbl. Staz. zool. Napoli 16, 363 (1937).

² G. REVERBERI e M. PITOTTI, Comment. pontif. Acad. Sci. 3, 469 (1939).

³ G. REVERBERI, Exper. 12, 55 (1956).

⁴ G. REVERBERI, Pubbl. Staz. zool. Napoli 29 (1956), (in stampa).

⁵ P. D. NIEUWKOOP, Pubbl. Staz. zool. Napoli 24, 101 (1953).

⁶ Le presenti indagini sono state effettuate usufruendo della borsa di studio «Gabriella Zuccari» dell'Università di Padova per l'Anno Accademico 1955-1956. – Desidero ringraziare vivamente il Prof. G. REVERBERI, Direttore dell'Istituto di Zoologia dell'Università di Palermo per l'affettuoso interessamento alla ricerca ed i Proff. R. e P. DOHRN, Direttori della Stazione Zoologica di Napoli per la gentile ospitalità offertami nel loro Istituto.