

Mikrobiologische und biochemische Untersuchungsergebnisse zur Wirkungsweise der *Peronospora*-Resistenz von Tabak III

Results of Microbiological and Biochemical Researches
Concerning the Resistance of *Peronospora* in Tobacco.

III

J. A. SCHMIDT

Landesanstalt für Tabakbau und Tabakforschung,
Forchheim bei Karlsruhe

(Z. Naturforsch. 26 b, 1197—1198 [1971]; eingegangen am 8. August 1971)

Peronospora tabacina Adam (PtA) — der Erreger der Blauschimmelkrankheit des Tabaks — seit 1885 in den USA und 1891 in Australien bekannt — trat 1959 zum ersten Mal in England, Holland und Nord-Deutschland auf. In den folgenden drei Jahren verbreitete sich diese Pilzkrankheit epidemisch über alle tabakanbauenden Länder Europas, Nordafrikas und Westasiens, deren Tabakanbaufläche ca. 620 000 ha beträgt. Allein in der Bundesrepublik Deutschland mit einer Anbaufläche von 6400 ha, vernichtete 1960 diese Krankheit mindestens 50% der Tabakernte, was einen Verlust von ca. 30 Millionen DM verursachte. Trotz Gegenmaßnahmen, wie Saatbeethygiene, Feldbeobachtungen, Befallsinformationen, regelmäßige Tabak-spritzungen mit Dithiocarbamaten und Züchtung PtA-resistenter Tabaksorten, wobei diese nicht immer den Qualitätsansprüchen der Tabakindustrie genügen, stellt die Peronosporakrankheit auch heute noch eine große Gefahr für den Tabakanbau in diesen Gebieten dar. 1971 tritt diese Krankheit wieder verstärkt auf, zumal der Anbau PtA-resistenter Tabaksorten nur zögernd aufgenommen wird.

Zur Testung der PtA-Resistenzigenschaften von Tabak-Neuzüchtungen wurden 1961 von IZARD, SCHILTZ und HITIER¹ der Kotyledonentest eingeführt. IZARD² beschrieb 1962 die Brauchbarkeit dieses Testes zur Prüfung chemischer Spritzmittel. Dieser Test wurde in Forchheim modifiziert und von 1963 bis 1970 im Rahmen der Resistenzzüchtung wie folgt angewandt: 100 Samenkörner, in 0,1-proz. Chlorkalklösung gebeizt, werden in eine normale mit Quarzsand gefüllte sterile Petri-Schale eingefüllt. Pro Schale werden in Form einer sterilen Nährlösung 5,58 mg K, 2,2 mg P₂O₅, 2,0 mg N, 0,5 mg MgO, 0,1 mg CaO, 2 γ B, 20 γ Fe, 5 γ Mn und 5 γ Mo verabreicht. Der pH-Wert dieser Lösung beträgt 5,5. Zur Keimung und Kotyledonenbildung (2-Keimblattstadium) — von dem der Test seinen Namen hat — werden die Petri-Schalen 6 Tage bei einer durchgehenden künstlichen Belichtung mittels Leuchtröhren von 2800 Lux bei 26 °C gehalten. Am 6. Tage erfolgt die Impfung mit einer Aufschwemmung von 50 000 PtA-Sporen pro Schale. Zur Keimung und Infektion verbleiben die Schalen im Wechsel 12 Std.

bei 17 °C ohne Licht und 12 Std. bei 26 °C mit Licht von 2800 Lux, alles bei relativen Luftfeuchtigkeiten über 95 Prozent. 9 Tage nach der Impfung wird der Versuch ausgewertet, wobei die Zahl der befallenen oder befallsfreien Sämlingen den Resistenzgrad der zu prüfenden Tabaksorte angibt. Interessant sind dabei die Tabaksorten, die keinen Befall aufweisen; denn diese geben die Sicherheit, daß eine neue Tabakzüchtung als vollständig blauschimmelresistent bezeichnet werden kann. PtA-hochanfällige Tabaksorten zeigen im Kotyledonentest einen 100-proz. PtA-Befall.

1969 und 1970 durchgeführte Untersuchungen an den PtA-hochanfälligen Anbausorten „Bad. Geudertheimer“ und „Bad. Burley E“ ergaben nach einer einmaligen Zugabe der in der 1. und 2. Mitteilung^{3,4} angeführten Substanzen vor der Sporenpfropfung über die Wurzeln zum Kotyledonentest, daß diese Kotyledonen völlig ohne PtA-Befall aufwuchsen. Darüber hinaus wurden diese Sämlinge in normale Saatbeeteerde pikiert und weitere 4 Wochen einem sehr hohen, in der Praxis nicht vorkommenden Sporendruck ausgesetzt. Diese so behandelten Pflanzen entwickeln sich unter PtA-günstigen Klima- und Lichtverhältnissen völlig normal und gesund. Eine Zunahme der die Resistenz auslösenden Substanzen, konnte nach Abbruch der Versuche, nach einer Versuchsdauer von 8 Wochen, mittels der in der 1. Mitteilung³ angeführten Untersuchungsmethoden festgestellt werden. — Wegen der Gefahr der Übertragung der Krankheit in die neue Vegetationsperiode, können derartige Versuche jedoch nicht über die gesamte Vegetationsdauer der Tabakpflanze, die ca. 5 Monate beträgt, ausgedehnt werden, zumal die PtA-Krankheit in Deutschland in den angeführten Jahren erst gegen Ende der normalen Tabak-Vegetationsperiode auftrat und PtA als obligater Tabakparasit nicht in Kultur genommen werden kann. Die beim Kotyledonentest zugegebenen Substanzen stammten sowohl von PtA-resistenten Tabakpflanzen bei Gegenwart von PtA, als auch von speziellen Hefeextrakt-Fraktionen, wie in der 1. Mitteilung³ beschrieben. Diese wurden in Sörensen-Phosphatpuffer von pH 8,0 (1/60 M) aufgenommen und in Mengen von ca. 10 mg pro Petri-Schale, also 100 Kotyledonen verabreicht.

Durch PtA erfolgt bei den resistenten Tabaksorten ebenfalls eine Infektion, was durch die sich bildenden Hypersensibilitäts-Flecken angezeigt wird. Biochemische Analysen ergaben, daß nach erfolgter Infektion sehr rasch die resistenzauslösenden Substanzen bei den resistenten Tabaksorten gebildet werden, welche das weitere Eindringen des Pilzes verhindern und diesen abtöten. Werden diese Substanzen oder analytisch gleichwertige, die aus Hefeextrakt stammen, den angeführten PtA-anfälligen Tabaksorten im Kotyledonentest über die Wurzeln gegeben, so induzieren sie bei diesen ebenfalls PtA-Resistenz.

Sonderdruckanforderungen an Dr. J. A. SCHMIDT, Landesanstalt für Tabakbau und Tabakforschung, D-7501 Forchheim, Bahnhof.

¹ C. IZARD, P. SCHILTZ u. H. HITIER, Ann. Inst. exp. Tabac, Bergerac 3, 669 [1961].

² C. IZARD, C. R. Acad. Agric., France 1962, 780.

³ J. A. SCHMIDT, Z. Naturforsch. 23 b, 1125 [1968].

⁴ J. A. SCHMIDT, Z. Naturforsch. 24 b, 1204 [1969].

Die eigenen an Tabak festgestellten Ergebnisse zeigen in vielen Punkten gute Übereinstimmung mit der von MÜLLER⁵ veröffentlichten Literaturzusammenfassung über die Phytoalexine bei anderen Kulturpflanzen. Durch die gleichwertige Wirkung der speziellen Hefeextrakt-Fraktion werden diese Ergebnisse jedoch stark erweitert und angezeigt, daß Phytoalexine nicht wirtsspezifisch sein müssen und auch von Mikroorganismen gebildet werden.

Derartigen Untersuchungsergebnissen kommen gerade heute im Zeitalter des Umweltschutzes und der

Höchstmengen-Verordnung-Pflanzenschutz, die am 1. Januar 1973 für Tabak in Kraft tritt, große Bedeutung zu, da bisher bei den angeführten Qualitätstabaksorten eine Verhinderung des PtA-Befalls nur durch wöchentliche, prophylaktische Spritzungen mittels Fungiziden auf Dithiocarbamat-Basis erreicht wurde, welche Spritzmittelrückstände bis zu 1000 ppm und höher hinterlassen.

In weiteren Arbeiten soll besonders der Auslösemechanismus für derartige pflanzeneigene Abwehrreaktionen untersucht und geprüft werden, inwieweit sich diese Ergebnisse auf weitere Tabakkrankheiten, auch virüsbedingte und solche anderer Nutzpflanzen übertragen lassen.

⁵ K. O. MÜLLER, Zbl. Bakteriologie, Abt. II, **123**, 259 [1969].

On the Nature of the Anti-Dextran Activity of the *Helix pomatia* „Anti-A“ Agglutinin

I. ISHIYAMA and G. UHLENBRUCK

Immunbiologische Abteilung der Medizinischen Universitätsklinik Köln-Lindenthal

(Z. Naturforsch. **26 b**, 1198—1199 [1971]; received August 19, 1971)

Recently we found that the *Helix* anti-A, which is fixed onto the Sephadex G-200 particle, can be released in the presence of low concentrations of *N*-acetyl-D-glucosamine and -galactosamine in a similar manner like in the case of immunoabsorbents¹. This result has led us to the assumption that the agglutinin molecule contains some sort of a combining site, which reacts with the dextran, i. e. the chief component of Sephadex. The reactivity of the agglutinin with Sephadex is not restricted to the *Helix* anti-A. SCHNITZLER et al.² have shown that the anti-A from *Cepaea nemoralis* and *Caucasotachea atrolabiata* are also absorbed specifically onto Sephadex particles, indicating that the anti-A agglutinins of the albumin gland from snails contain common combining sites for dextran — if not to say the anti-A combining sites. To clarify the anti-dextran activity of the *Helix* anti-A more precisely, we have investigated the effects of various kinds of sugars with respect to their elution capacities. The purified *Helix* anti-A was prepared according to the method of KÜHNEMUND nad KÖHLER³. 10 ml of the purified anti-A, containing 1000 hemagglutinin units, was mixed gently with 20 ml of the aliquot of Sephadex G-200 and incubated for one hour at room temperature (20 °C) and pH 7.4. Thereafter, the gels were washed three times with enough amount of phosphate buffered saline and resuspended to the original volume of the gel solution. The agglutinin elution test was per-

formed by incubating this gel aliquot with the same volume of each sugar solution for one hour at room temperature and measuring the agglutinin activity in the supernatant (batch test). The sugars used for this experiment were as follows; sucrose (Serva), lactose (E. Merck AG), maltose krist. (E. Merck AG), melibiose hydrat puriss. (Fluka) and raffinose puriss. (Fluka). Dextran 10 and 40 (Pharmacia) were used as the sources of D-glucose polymers. Hemagglutination was performed with a Takatsy microtitrator (Cooke Engineering Co., Alexandria, Va.) using 0.05 ml loops and 2% erythrocyte suspension. Hemagglutination was recorded after one hour incubation at room temperature. The results are shown in Fig. 1.

It is somewhat interesting to notice that raffinose and melibiose having terminal residues of galactose of (1 → 6) in α -form are 10 times more effective in comparing with lactose, which exhibits — as in the cases of maltose and sucrose — only the same potency as monosaccharides. Thus, the former sugars are expected to have a more suitable conformation concerning the elution and/or dissociation of the complex between Sephadex and *Helix* anti-A. It was also demonstrated that the dextrans in the concentration of 5% are strong enough to bring the complex into complete dissociation. This concentration is accordant fairly well with the amount of the dextran content in Sephadex G-200. As the gel aliquot of the fully swollen G-200 is of ca. 5% of dextran by usual weight per cent calculation, although the distributions and/or distribution patterns of the receptors against *Helix* anti-A on the particle are uncertain, it is reasonable to interpret the effects of the dextran as a competitive one. When the dextran solutions are expressed by molar concentration, they should be located in the ranges of 0.005 to 0.001 M, which are indeed lower levels in comparing with those

Requests for reprints should be sent to Prof. Dr. G. UHLENBRUCK, Med. Universitätsklinik Köln, Abt. für Immunbiologie, D-5000 Köln 41, Kerpener Str. 15.

¹ I. ISHIYAMA and G. UHLENBRUCK, Z. Immunforsch., exp. Therap., in press.

² S. SCHNITZLER, W. KRÜGER, D. FELIX, H. DAVID, J. UERLINGS, M. BÖTTGER, and W. KUHN, Z. klin. Chem., klin. Biochem. **9**, 304 [1971].

³ O. KÜHNEMUND and W. KÖHLER, Experientia [Basel] **25**, 1137 [1969].

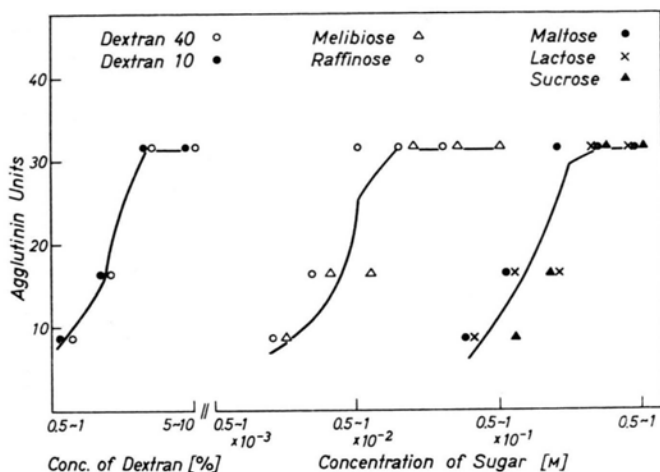


Fig. 1. Elution Patterns of Helix Anti-A from Sephadex G-200 (in Batch Method) by Various Kinds of Sugars. Ordinate: Agglutinin units, eluated by sugars. Abscissa: Concentration of sugar.

of raffinose and melibiose and a little higher or the same ones with those of *N*-acetyl-D-glucosamine and -galactosamine, suggesting that the oligosaccharide residues of the dextran chain, which consist of D-glucose polymers of (1 → 6) combination in α -form, behave themselves like *N*-acetylated aminosugars. The fact that the D-galactose residues in the same form of combination exhibit also the elution capacity indicate clearly that the combining sites for dextran are cross-

reacting with glucose and galactose, as in the cases of anti-A sites concerning the *N*-acetyl-D-glucosamine and -galactosamine. It is at present not so conclusive whether combining sites against several main sugars and their polymers are concentrated in the same locus. The work to confirm this point is going on.

Frau GUDRUN JANSEN danken wir für ihre ausgezeichnete Mitarbeit. Die Untersuchungen wurden durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft ermöglicht.

Fehlende Wirkung einer Teilhepatektomie auf die Überlebenszeit von Ratten mit Walker-Carcinosarkom

No Influence of Partial Hepatectomy on the Survival Rate of Rats Bearing Walker-Carcinosarcoma

M. VOLM und K. WAYSS

Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg, Institut für experimentelle Pathologie

(Direktor: Prof. Dr. KL. GOERTTLER)

(Z. Naturforsch. 26 b, 1199–1200 [1971]; eingegangen am 13. Juli 1971, revidiert am 28. Juli 1971)

Die Mechanismen, welche die Regeneration der Leber nach Teilhepatektomie auslösen und wieder zum Stillstand bringen, sind bis heute im wesentlichen ungeklärt. Erst in neuerer Zeit ist es gelungen, die Existenz eines für die Leberregeneration verantwortlichen

humoralen Faktors durch in vivo-Experimente mit einiger Wahrscheinlichkeit nachzuweisen¹⁻⁴. Auch in vitro-Versuche deuten auf einen humoralen Faktor hin: So wachsen Leberzellen und Leberexplantate im Serum teilhepatektomierter Tiere wesentlich besser als in den entsprechenden Normalseren⁵⁻⁷.

Interessanterweise bewirkt Serum teilhepatektomierter Tiere, das auf Leberzellen eine stoffwechselsteigernde Wirkung ausübt, auf den in vitro-Stoffwechsel (Inkorporation von markiertem Phosphat, Sauerstoffverbrauch, Milchsäurebildung) von Walker-Carcinosarkomen und Yoshida-Sarkomen eine deutliche Hemmwirkung^{8,9}. Dieser Effekt wurde von uns vor allem bei Ascites-Zellen des Walker-Carcinosarkoms untersucht¹⁰. Die auf Leber- und Tumorzellen differenten Wirkungen treten zur gleichen Zeit und im gleichen Ausmaß auf. Wir hatten daher zunächst angenommen, daß diese entgegengesetzten Wirkungen

Sonderdruckanforderungen an Dr. M. VOLM, Deutsches Krebsforschungszentrum, Institut für Experimentelle Pathologie, D-6900 Heidelberg 1, Berliner Str. 29.

¹ J. W. GRISHAM, G. F. LEONG, and B. V. HOLE, *Cancer Res.* **24**, 1474 [1964].

² M. VIROLAINEN, *Exp. Cell Res.* **31**, 457 [1963].

³ J. W. GRISHAM, G. F. LEONG, M. F. ALBRIGH, and J. D. EMERSON, *Cancer Res.* **26**, 1476 [1966].

⁴ F. L. MOOLTEN and N. L. R. BUCHER, *Science* [Washington] **158**, 272 [1967].

⁵ H. WRBA, H. RABES, M. RIPOLL-GOMEZ, and H. RANZ, *Exp. Cell Res.* **26**, 70 [1962].

⁶ F. J. MOYA, *Exp. Cell Res.* **31**, 457 [1963].

⁷ J. F. SCAIFE, *Experientia* [Basel] **26**, 1071 [1970].

⁸ H. WRBA and H. RABES, *Cancer Res.* **23**, 1116 [1963].

⁹ H. WRBA and M. VOLM, *Europ. J. Cancer* **3**, 143 [1967].

¹⁰ M. VOLM, H. HINDERER u. H. WRBA, *Z. Naturforsch.* **22 b**, 1150 [1967].

durch dieselben Faktoren ausgelöst sein könnten. Diese Vorstellung konnten wir jedoch nach weiteren Untersuchungen nicht aufrecht erhalten¹⁰. Wir haben uns danach gefragt, ob ein spezifischer Tumor-Hemmfaktor im Serum teilhepatektomierter Tiere vorliegt, da der Stoffwechsel von normalem Nierengewebe unter in vitro-Bedingungen nicht beeinflußt wurde⁵. Versuche an soliden Transplantationstumoren (Walker-Carcinosarkom 256) sollten nunmehr klären, ob sich die beschriebenen in vitro-Befunde auch in vivo nachweisen lassen.

Die Untersuchungen wurden an 160 g schweren, weiblichen Sprague-Dawley-Ratten (Fa. Mus-Rattus, Brunthal-München) durchgeführt, wobei wir die Tiere unter Standardbedingungen (21 °C, Makrolonkäfige, Altromin®-Standarddiät, Wasser ad lib.) hielten. Wir transplantierten Ascites-Zellen des Walker-Carcinosarkoms 256 in definierter Zellzahl subcutan (Rücken) auf 90 Tiere. Anschließend wurden die Tiere den einzelnen Versuchsgruppen mit Hilfe von Zufallszahlen streng zufällig zugeteilt. Am 1., 4. und 7. Tag nach Tumortransplantation führten wir jeweils bei einer Gruppe 2/3-Hepatektomien nach dem Standardverfahren von HIGGINS und ANDERSON¹¹ durch, während wir die Tiere der anderen Gruppe (Kontrolle) laparotomierten. Danach bestimmten wir die Überlebenszeit der Tiere und das Gewicht ihres Tumors beim Tode.

Bei dieser Versuchsanordnung zeigten laparotomierte und teilhepatektomierte Tiere keinen Unterschied in ihrer Überlebenszeit. Dabei war es gleichgültig, zu welchem Zeitpunkt die Tiere operiert wurden. Außerdem waren die Tumorgewichte beim Tode der Tiere in allen Versuchsgruppen gleich. Die experimentellen Daten wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% mit doppelter Kovarianzanalyse ausgewertet*. Den unterschiedlichen Verlauf der Kurven am dritten Operationszeitpunkt (7 Tag) führen wir auf den verschieden schweren operativen Eingriff an den ohnehin geschwächten Tieren zurück. Die teilhepatektomierten Tiere sterben zudem früher und nicht später, wie eigentlich erwartet wurde. Damit konnten wir mit unserer Versuchsanordnung keine Hemmwirkung einer Teilhepatektomie auf das in vivo-Wachstum von Tumoren des Walker-Carcinosarkoms feststellen. Dieser Befund stimmt mit unseren Ergebnissen aus anderen

in vivo-Experimenten am soliden Walker-Carcinosarkom der Ratte gut überein¹². Auch dort hatten wir weder beim Tumorgewicht noch bei der DNS-Syntheserate der Tumoren Unterschiede zwischen teilhepatektomierten und scheinoperierten Tieren feststellen können.

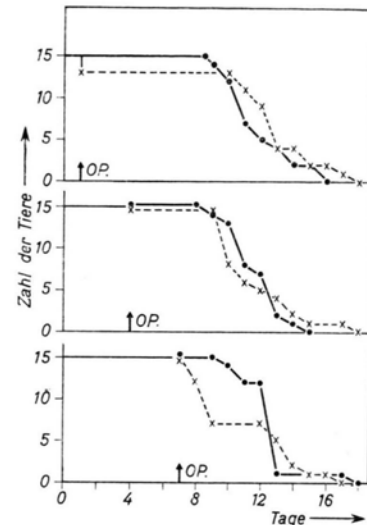


Abb. 1. Überlebenszeit von Sprague-Dawley-Ratten mit transplantiertem Walker-Carcinosarkom nach Laparotomie (·—·) bzw. 2/3-Hepatektomie (×—×). Operationszeitpunkt durch Pfeile (OP) markiert.

Diese Befunde sprechen gegen das Vorhandensein eines spezifischen Hemmfaktors für die Zellen des Walker-Carcinosarkoms im Serum teilhepatektomierter Tiere. Wir halten es daher für möglich, daß die in vitro gefundenen Hemmwirkungen^{9,10} auf ungünstigere nutritive Bedingungen im Serum teilhepatektomierter Ratten zurückzuführen sind.

Mit unseren Ergebnissen befinden wir uns im Einklang mit Angaben von GERSHBEIN¹³, jedoch im Widerspruch zu den Befunden von PASCHKIS und Mitarbb.¹⁴, die eine Steigerung des Wachstums von Walker-Carcinosarkomen bei teilhepatektomierten Tieren nachweisen konnten.

¹¹ G. M. HIGGINS and R. M. ANDERSON, Arch. Path. [Chicago] **12**, 186 [1931].

¹² K. WAYSS, N. ERTL u. M. VOLM, Arch. Geschwulstforsch., im Druck.

¹³ L. L. GERSHBEIN, J. nat. Cancer Inst. **31**, 521 [1963].

¹⁴ K. E. PASCHKIS, A. CANTAROW, J. STASNEY, and J. H. HOOPS, Cancer Res. **15**, 579 [1955].

* Für die wertvolle Hilfe bei der statistischen Analyse danken wir Herrn Prof. Dr. IMMICH, Institut für Dokumentation und Statistik, DKFZ Heidelberg, auch an dieser Stelle recht herzlich.