

Tabelle II. Elution des A₂-Asia- und A₂-HK-SW-Stammes von verschiedenen Erythrozyten^a

		Hämagglutinationstiter des Überstandes					
		Nach Adsorption	Elution 1 h	Elution 2 h	Elution 5 h	Elution 8 h	Elution 24 h
A ₂ -Asia 1:512	Huhn	< 2	32	64	128	128	128
	Esel	< 2	128	128	128	128	128
	Rind	< 2	128	128	128	128	128
	Ziege	4	64	64	128	128	128
	Stachelmaus ^b	16	128	128	128	128	256
	Pferd	< 2	4	8	16	32	32
A ₂ -HK 1:256	Huhn	< 2	4	16	64	128	128
	Esel	< 2	16	32	64	64	64
	Rind ^b	8	64	64	128	128	128
	Ziege	4	32	32	64	64	64
	Stachelmaus ^b	32	64	64	64	128	128
	Pferd ^b	8	32	32	64	64	64

^a Die Zahlen geben den reziproken Wert der Virusendtitel an. ^b Erythrozyten, die bei Zimmertemperatur mit den entsprechenden Viren nicht agglutinieren.

Ist nun die schnellere Elution nach erfolgter Adsorption dafür verantwortlich, dass manche Viren bei Zimmertemperatur dieselben Erythrozyten nicht zu agglutinieren vermögen, die sie bei 4 °C, wenn auch in niedrigen Titern, agglutinieren? Um diese Frage für das A₂-HK-Virus zu klären, wurde die Elution des A₂-Asia- und A₂-HK-SW-Stammes von verschiedenen Erythrozytenarten geprüft.

Tabelle II zeigt folgendes: 1. Die Elutionsfähigkeit des A₂-HK-SW-Virus ist geringer als die des A₂-Asia bei den Erythrozyten des Huhnes und des Esels. 2. Sie ist von derselben Grössenordnung bei den Erythrozyten des Rindes, der Ziege und der Stachelmaus. 3. Sie ist grösser für A₂-HK bei den Erythrozyten des Pferdes.

Diskussion. Wir nehmen folgende Arbeitshypothese an: Die Adsorption der Viren an die Erythrozyten ist temperaturunabhängig. Die Elutionsgeschwindigkeit hingegen ist bei Zimmertemperatur grösser als bei 4 °C⁴. Sie kann so gross werden, dass trotz erfolgter Adsorption keine Agglutination mehr stattfindet.

Die Elutionsgeschwindigkeit von A₂-Asia ist offensichtlich nicht gross genug, um eine Agglutination der Erythrozyten durch das Virus zu verhindern, da das A₂-Asia-Virus auch bei Zimmertemperatur alle untersuchten Erythrozyten agglutiniert. Bei denjenigen Erythrozyten, die bei Zimmertemperatur durch das A₂-HK-Virus agglutiniert werden, sollte die Elutionsgeschwindigkeit des A₂-HK gleich gross oder kleiner sein als die des A₂-Asia. Das ist der Fall für die Erythrozyten des Huhnes, des Esels und der Ziege.

Die Elutionsgeschwindigkeit des A₂-HK-Virus von denjenigen Erythrozyten, die bei Zimmertemperatur nicht

agglutiniert werden, sollte grösser sein als die des A₂-Asia-Virus. Das stimmt nur für die Erythrozyten des Pferdes. Die Erythrozyten des Rindes werden bei Zimmertemperatur von den A₂-HK-SW-Viren nicht agglutiniert, obwohl diese keine grössere Elutionsgeschwindigkeit von diesen Erythrozyten zeigen als die A₂-Asia-Viren, die diese Erythrozyten auch bei Zimmertemperatur zu agglutinieren vermögen.

Für die Erythrozyten des Huhnes, des Esels, der Ziege und des Pferdes könnte die Grösse der Elutionsgeschwindigkeit also den Ausschlag geben, ob bei Zimmertemperatur eine Agglutination durch das A₂-HK-SW-Virus stattfindet oder nicht. Für die Erythrozyten des Rindes müsste eine andere Erklärung gefunden werden.

Summary. A₂-Hongkong influenza virus does not agglutinate the erythrocytes of the cow, the calf, the horse, the pony and the spiny mouse at room temperature, while the A₂-Asia influenza virus causes agglutination. At a temperature of 4 °C A₂-Hongkong was able to agglutinate the erythrocytes of all species examined except those of the spiny mouse. Whether the A₂-Hongkong virus does or does not agglutinate the erythrocytes of the chicken, the donkey, the goat, the spiny mouse and the horse at room temperature could depend on the speed of elution.

W. R. FREY

Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Universität Basel, CH-4051 Basel (Schweiz), 23. Juli 1970.

Zur Massenkultur des insektenpathogenen Pilzes *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

Von den insektenpathogenen Pilzen wird für Versuche zur biologischen Bekämpfung von Schadinsekten *Beauveria bassiana* am häufigsten benutzt¹. Solche Anwendung wird sich um so leichter realisieren und intensivieren lassen, je einfacher, billiger und ergiebiger die Massenkultur des Pilzes und die Gewinnung seiner Konidien ist. Kulturen sind auf festen oder flüssigen Nährmedien möglich und führen relativ langsam zu den ziemlich widerstandsfähigen Konidien; oder sie erfolgen submers in geeigneter

Nährlösung und liefern schnell grosse Mengen von Blastosporen, die aber weniger widerstandsfähig sind. Auch Kombinationen von Submerskultur und nachfolgender Oberflächenkultur (durchwachsene Kulturflüssigkeit in

¹ E. MÜLLER-KÖGLER, *Pilzkrankheiten bei Insekten* (P. Parey, Berlin und Hamburg 1965).

flachen Schalen) sind bekannt. Literatur zu diesen Fragen und Methoden vergleiche².

Uns interessierte, ob die Prager Methode der Submerskultur von *B. bassiana*^{3,4} sich besonders einfach mit einer Oberflächenkultur verbinden lasse, indem die Nährlösung mit den in ihr nach 3 Tagen gebildeten Blastosporen (etwa 6×10^8 /ml) zur reichlichen Beimpfung von Weizenkleie benutzt wird. Die Submerskultur könnte so schnell und laufend reichlich Impfmateriale liefern, die Weizenkleie das Auskeimen der Blastosporen und Konidienbildung ermöglichen. Weizenkleie schien uns wegen ihrer Saugfähigkeit für das hoch dosierte Inoculum besonders geeignet, zumal sie als Kultursubstrat für den Pilz bekannt ist¹ und bei der Aufbereitung des Materials (wie Zerkleinern, Absieben) nicht stören dürfte.

Die Kleie wurde unsteril benutzt, da bei der hohen Einsaatmenge des Pilzes ein unterdrückender Effekt auf die natürliche Mikroflora der Kleie zu erwarten war. Das Resultat bestätigte unsere Annahme: Fremdpilze erschienen nicht. Soll das fertige Produkt aus hygienischen Gründen keinerlei Fremdkeime enthalten, lässt sich natürlich auch zuvor sterilisierte Kleie verwenden.

Ein Beispiel möge die Brauchbarkeit der Methode belegen. Unsterile Kleie wurde mit 3 Tage alter, Blastosporen-durchsetzter Submerskultur im Verhältnis 1:1 (Gew./Vol.) gemischt. Die erhaltene Paste wurde in Petrischalen ausgestrichen, die bei 20°C im Labor oder bei 28°C im Brutschrank aufgestellt wurden. Nach 48 Stunden wurden die Deckel der Schalen gelüftet. 14 Tage nach Ansetzen der Kulturen hatte sich auf der bei 20°C gehaltenen Kleie reichlich Mycel entwickelt, die Sporulation war aber gering. Sie zeigte sich aber sehr stark auf der bei 28°C gehaltenen Kleie. 1 cm³ Material (Kleie plus fruktifizierter Pilz) aus 20°C enthielt $8,3 \times 10^9$, aus 28°C dagegen $4,8 \times 10^{10}$ Konidien.

Man wird die Methode den jeweils vorhandenen Möglichkeiten und dem Pilzstamm anpassen, indem z.B. Lagerung der beimpften Kleie – ausgestrichen oder, bei Zusatz einer geringeren Menge Impfflüssigkeit, locker geschüttet –, Temperatur, Belüftung und Kulturdauer variiert werden. Uns kam es hier nur darauf an, auf ein für Massenkulturen mögliches Prinzip hinzuweisen, das sich ausser für *B. bassiana* auch für andere insektenpathogene Pilze eignen dürfte.

Summary. After incubation for 3 days, a submerged culture containing blastospores of *Beauveria bassiana* was mixed with unsterile wheat bran at the ratio of 1:1 (v/w). The paste was then spread to form a thin layer and stored for 2 weeks at 28°C. This combination of culture methods resulted in a rich production of the relatively resistant conidia (4.8×10^{10} /cm³ paste medium) which are very suitable in experiments for biological control of insect pests.

E. MÜLLER-KÖGLER und A. SAMŠIŇÁKOVÁ

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für biologische Schädlingsbekämpfung, D-61 Darmstadt (Deutschland), und Entomologický ústav ČSAV, Pathologie hmyzu, Praha 6 (CSSR), 8. Juli 1970.

² E. MÜLLER-KÖGLER und A. SAMŠIŇÁKOVÁ, *Entomophaga* 14, 369 (1969).

³ A. SAMŠIŇÁKOVÁ, *Naturwissenschaften* 51, 121 (1964).

⁴ A. SAMŠIŇÁKOVÁ, *J. Invertebr. Path.* 8, 395 (1966).

Two Cell-Free Systems for the Assay of Virus-Specific Polymerase

In the early stage of replication of RNA viruses virus specific polymerase (RNA-dependent RNA nucleotidyl transferase) is synthesized. This enzyme is coded by viral genome and it catalyzes the synthesis of viral RNA. The synthesis occurs in the presence of four nucleosidetriphosphates (ATP, GTP, UTP, CTP), ATP-regenerating system, Mg²⁺ and SH-containing compounds.

In cells infected with Arboviruses^{1,2} and Picornaviruses^{3,4} virus specific polymerase is associated with the mitochondrial-microsomal (MM) fraction of the cells, that is sedimented at 12,000–15,000 g. The reaction reaches a plateau within 30–45 min and the main product synthesized is a double-stranded RNA.

We attempted to prolong the time-course of polymerase reaction and compared two polymerase systems for this purpose.

Experiments were conducted with the SPF strain of Venezuelan equine encephalomyelitis (VEE) virus propagated in chick embryo fibroblast monolayers⁵. The cells ($1-2 \times 10^6$ cells/ml) were infected with the virus (50–100 PFU/cell) and incubated in medium 199 with actinomycin D (2 µg/ml) and 5% bovine serum at 37°C for various intervals. Thereafter they were cooled, scraped from the glass, allowed to swell for 15 min in a hypotonic buffer (*Tris* HCl 0.01 M pH 7.2, EDTA 10^{-3} M) and disrupted in a Dounce homogenizer. The nuclei and cell debris were removed by centrifugation at 800 g for 10 min, the MM fraction was sedimented at 15,000 g for 20 min, resuspended in TMM buffer (*Tris* HCl 0.01 M

pH 7.5; MgCl 0.001 M; 2 mercaptoethanol 0.01 M) at the concentration of 5 mg/ml of protein and stored at –20°.

Two polymerase systems were used:

1. Nucleoside-triphosphate medium: 1 ml of polymerase preparation was resuspended in 3 ml (final volume) of incubation mixture which contained 20 µmole *Tris* HCl pH 8.0; 2 µmole MgCl₂; 6 µg actinomycin D; 7 µmole 2-mercaptoethanol; 0.5 µmole phosphoenolpyruvate; 0.01 mg pyruvate kinase; 0.5 µmole ATP, CTP, UTP each; 25 µCi ³H-GTP (specific activity 0.6 mCi/m mole). The mixture was incubated at 37°C, aliquots (0.3 ml) were taken at various intervals and reaction was stopped by addition of ice-cooled HClO₄ 0.5 N and Na₂P₂O₇ 0.1 M. 0.1% casein and 10% trichloroacetic acid (TCA) was added, TCA precipitable material was sedimented on Millipore filters, washed with 5% TCA, dried with alcohol and the filters were placed into vials with toluene (PPO + POPOP) scintillator for counting radioactivity in a Packard-Tricarb liquid scintillation counter.

¹ E. M. MARTIN and I. A. SONNABEND, *J. Virol.* 1, 97 (1967).

² T. SREEVALSAN and F. H. YIN, *J. Virol.* 3, 599 (1969).

³ D. BALTIMORE, H. J. EGGERS, R. M. FRANKLIN and I. TAMM, *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 49, 343 (1963).

⁴ L. DALGRANO and E. M. MARTIN, *Virology* 26, 450 (1965).

⁵ V. M. ZHDANOV, F. I. YERSHOV and L. V. URYVAYEV, *Virology* 38, 355 (1969).