

(Aus dem Botanischen Institut für Virusforschung Celle der Biologischen Zentralanstalt des Nordwestdeutschen Gebietes.)

Betrachtungen und Versuche zum Problem der „erworbenen Immunität“ gegen Virusinfektionen bei Pflanzen.

Von ERICH KÖHLER und IRMGARD HAUSCHILD.

Mit 4 Textabbildungen.

Durch voneinander unabhängige Untersuchungen verschiedener Autoren (THUNG 1931 u. 1935, SALAMAN 1933, KÖHLER 1934) wurde bei einer Reihe von Mosaikviren als eine Regel von weitreichender Gültigkeit erkannt, daß Pflanzen, die bereits mit einem Virus infiziert sind, sich nicht noch zusätzlich mit einem zweiten infizieren lassen, wenn dieses zweite mit dem ersten nah verwandt ist, und wenn man — eine Einschränkung, die in ihrer Bedeutung zunächst nicht erkannt wurde — das zweite Virus auf die vom ersten durchsetzten Blätter in bestimmter Weise verimpft. Die Blätter erweisen sich dann als „abwehrfähig“. Sind die beiden Viren jedoch nicht miteinander verwandt, so kommt eine solche Abwehr nicht zustande; dann vermehrt sich das zweite Virus in dem geimpften Blatt und dringt von da aus auch in die anderen Teile der Pflanze vor, so daß es in den Zuwachsteilen zu regulären Mischinfektionen kommt.

Der Mechanismus, der zuerst von KUNKEL (1934) als cross immunity, neuerdings von QUANJER (1942) als Prämunität bezeichneten Erscheinung gilt noch immer als unaufgeklärt. Gewiß, und allseitig anerkannt ist indessen, daß die Abwehrfähigkeit streng auf solche Stellen des Blattes lokalisiert ist, die von dem ersten Virus hinreichend durchsetzt sind. Sie erstreckt sich nicht auf virusfrei gebliebene Teile des Blattes, geschweige denn auf die ganze Pflanze oder deren Teile, selbst wenn das Virus in diesen das Höchstmaß der Ausbreitung und Durchdringung schon längere Zeit erreicht haben sollte. Dies zeigt sich besonders deutlich, wenn man Teile von älteren Pflanzen zusammenpfropft, von denen jede im Jugendstadium mit nur einem der beiden Viren infiziert worden war und deren Blätter gegen das andere „abwehrfähig“ geworden sind. Dann kommt es an der Pfropfstelle zu einem wechselseitigen Übertritt der beiden Viren von einem Pfropfpartner in den anderen mit der Folge, daß in deren Zuwachsteilen später beide Viren im Gemisch auftreten und sich vermehren (KÖHLER 1935, SALAMAN 1938). KÖHLER deutete seinerzeit (1935) dieses Verhalten wie folgt:

„Es scheint demnach, daß die Schutzwirkung aufgehoben ist, wenn dem zweiten Virus Gelegenheit zum unmittelbaren Eintritt ins Phloem gegeben wird. Im Phloem wird es mitgerissen und gelangt in die wachsenden Organe der Sproßspitze, wo es sich dann in Konkurrenz mit den gleichzeitig dort eintreffenden Teilchen des ersten Virus vermehren kann.“

An der Richtigkeit dieser Deutung kann heute nicht mehr gezweifelt werden, nachdem das Phloem eindeutig als der Transportweg erkannt ist, auf dem das

Virus (mit dem Assimilatestrom) rasch auf weite Strecken, insbesondere nach der wachsenden Sproßspitze verfrachtet wird (C.W. BENNET u.a.). Einmal auf irgendeine Weise ins Phloem gelangt ist das Virus befähigt, generalisierende Infektionen zu verursachen. „Bei der Blatteinreibemethode hingegen, bei der die Schutzwirkung beobachtet wird, ist dem Virus ein Vordringen in das Phloem augenscheinlich nicht möglich“ (K. ebenda). Der Abwehrmechanismus muß also gleichzeitig als Lokalisierungsmechanismus wirksam sein.

Man kann die Abwehrscheinung mit der Annahme erklären (KÖHLER 1934), daß durch die Vermehrung des ersten Virus („e. V.“) eine Erschöpfung des Substrats an notwendigen Baustoffen des Virus eintritt, auf die das zweite („z. V.“) ebenso angewiesen ist wie das e. V. Andere Autoren ziehen die Annahme vor, daß durch die Infektion mit dem e. V. die Reaktionsweise der Pflanze eine spezifische Veränderung im Sinne einer Immunisierung erfährt, wodurch die Vermehrung bzw. Ausbreitung des z. V. verhindert wird. So naheliegend diese letztere Annahme in Analogie mit gewissen Abwehrscheinungen bei Mensch und Tier auch erscheinen mag, so wird man sie doch kaum als gesichert ansehen dürfen. Die Vorstellung etwa, daß durch das e. V. spezifische Abwehrstoffe in den Blättern gebildet würden, die das z. V. inaktivieren, hat wenig Wahrscheinlichkeit für sich. Gegen sie spricht schon die Tatsache, daß das e. V. in hochaktiver Form und anscheinend völlig ungeschwächt in den „abwehrfähigen“ Blättern erhalten bleibt. Es ist nicht recht einzusehen, wieso das „Antigen“ selbst gegen die gebildeten Abwehrstoffe sich so gänzlich indifferent verhalten und nur das z. V. ihrem Angriff unterliegen sollte. Es müßte also doch wohl ein andersartiger, seinem Wesen nach völlig unbekannter Abwehrvorgang in Betracht kommen. Unter diesen Umständen mag es erlaubt sein, auf der Grundlage unserer oben zitierten älteren Vorstellungen eine Arbeitshypothese zu entwickeln, die wir als Minimumhypothese bezeichnen wollen und wie folgt formulieren können:

Das Virusmolekül setzt sich aus einer Anzahl von Grundbaustoffen, „Bausteinen“¹, zusammen, die es in der Wirtszelle vorfindet und ihr zu seinem Aufbau entnimmt. Wenn aktives Virus in die Zelle gelangt, so vermehrt es sich darin nach Maßgabe des im Minimum vorhandenen oder doch greifbaren Grundbau-

¹ Kleineren Molekülen bzw. Radikalen, etwa im Sinne der von P. JORDAN, Naturwiss. 1941, 29 (S. 93) entwickelten Vorstellungen.

stoffes. Ist dieser aufgebraucht, so kommt die Virusvermehrung zum Stillstand. Gelangt nun noch ein anderes Virus in die Zelle, in der die Vermehrung des ersten Virus wegen Erschöpfung eines Baustoffes bereits zum Stillstand gekommen ist, so sind zwei Möglichkeiten denkbar. Entweder ist das z. V. auf denselben Inhaltsstoff angewiesen, der vom e. V. bereits aufgebraucht wurde: dann ist seine Vermehrung in der Zelle unmöglich; es wird scheinbar abgewehrt. Oder aber es ist nicht auf ihn angewiesen: dann vermehrt es sich solange, bis ein anderer für dieses Virus im Minimum vorhandener Zellinhaltsstoff erschöpft ist; die Superinfektion kommt zustande. Nach dieser Theorie ist also die Infektionsabwehr dem Umstand zuzuschreiben, daß nah verwandte Viren in ihrem Aufbau weitgehend übereinstimmen, daß insbesondere für sie derselbe Grundbaustein in der Zelle im Minimum vorhanden ist. Andererseits ließe sich die Tatsache, daß die Superinfektion eines Virus leicht möglich ist, wenn dieses mit dem im Gewebe bereits vorhandenen nicht verwandt ist, auf die sehr unterschiedlichen Substratansprüche der in ihrem Aufbau weitgehend verschiedenen Viren zurückführen, womit es zusammenhängt, daß für die eine Virusart dieser, für die andere jener Zellinhaltsstoff den Begrenzungsfaktor vorstellt.

Diese Betrachtungsweise geht von der Annahme aus, daß das zusätzlich verimpfte z. V. in den Zellen, in die es eingedrungen ist, nicht inaktiviert wird, sondern daß es in derselben Form darin persistiert wie das e. V. Daß dem höchstwahrscheinlich so ist, zeigt der folgende

Versuch 1.

Als Versuchsviren dienten zwei Stämme des X-Virus, von denen der eine (Bm) beim Einreiben auf gesunde Tabakblätter keine oder jedenfalls keine nekrotischen Infektionsflecken verursacht, wogegen der andere (Cs 44) stark nekrotische Einzelherde hervorruft. Eine im Jugendstadium mit Bm infizierte Tabakpflanze (Sorte Samsun), die herangewachsen war, wurde an 4 oberen ausgewachsenen Blättern, die auf ihrer gesamten Fläche lückenlos die charakteristischen Symptome der Bm-Infektion erkennen ließen, durch Einreiben mit dem Glasspatel zusätzlich mit dem Stamm Cs 44 beimpft. Um dabei der Epidermis möglichst große Mengen Virus einzuverleiben, wurde feinstes Karborundpuder verwendet, der vor dem Einreiben auf die Blätter gestreut wurde. Um alles äußerlich anhaftende Virus zu entfernen, wurden die Blätter nach dem Impfen mit Wasser gründlich abgespült. Außerdem wurde von der Impfung bis zur weiteren Verarbeitung 4 Tage gewartet. So war damit zu rechnen, daß alles nicht in die Oberfläche eingedrungene Virus inaktiviert war, da das X-Virus Austrocknen bekanntlich nicht verträgt. Nach vier Tagen wurden die behandelten Blätter im Porzellanmörser manuell ausgepreßt und der Saft unverdünnt und in den Verdünnungen 1 : 10, 1 : 50, 1 : 100 und 1 : 500 auf 3 Blätter an je 3 Tabakpflanzen ohne Karborund verimpft. Die Zahl der nekrotischen Einzelherde, die auf den eingeriebenen Blättern erschienen, war überraschend hoch (Tab. 1). Es müssen also recht beträchtliche Mengen aktiven Cs 44-Virus die vier Tage im Blatt überdauert haben. Dabei kann als wahrscheinlich angenommen werden, daß der größte Teil im Zellinnern selbst ausdauerte;

Tabelle 1. Anzahl nekrotischer Flecken (Cs 44-Infektionen).

Pflanze Nr.	Blatt Nr.	Unverdünnter Saft	1 : 10	1 : 50	1 : 100	1 : 500
1	1	18	31	2	1	—
	2	27	14	7	1	—
	3	11	9	10	1	—
2	1	21	6	4	2	—
	2	79	28	6	1	1
	3	13	23	3	—	—
3	1	18	27	4	2	—
	2	7	28	12	7	—
	3	4	2	8	—	—
		198	168	56	15	1

denn die bei der Impfung in den Zellwänden stecken gebliebenen Viruspartikel dürften bei der Preßsaftgewinnung weniger leicht in den Saft gelangt sein, als die im Zell-Lumen befindlichen.

Wenn nun also das zweite Virus neben dem ersten zweifellos in der Zelle persistiert, wie ist dann zu verstehen, daß es nicht ebenso wie aufgeimpftes, nicht mit dem e. V. verwandtes Virus ins Phloem vordringt und von dort aus generalisierende Infektionen verursacht? Der Unterschied ist augenscheinlich darin begründet, daß sich das nicht verwandte Virus im Infektionsherd stark vermehrt, daß also die Chancen für das Abwandern einzelner Partikel ins Phloem bei diesem Virus ungleich viel bessere sein werden als bei dem sich nicht vermehrenden, verwandten Virus.

Erst recht keine Aussichten, ins Problem zu gelangen, hätte das Virus dann, wenn eine Translokation seiner Teilchen durch die dahin führenden Plasmaverbindungen — durch Diffusion oder Plasmaströmung — überhaupt nicht möglich wäre und wenn die Hypothese zutreffen sollte, daß das Virus die Plasmaverbindungen im Blattparenchym nur durch Hindurchwachsen passiert. Die Unmöglichkeit für das z. V., die Plasmaverbindungen zu durchwachsen, würde darauf beruhen, daß in diesen nicht anders als wie im Zell-Lumen eine Erschöpfung des Substrates eingetreten ist. So wäre die Lokalisierung des z. V., seine Blockierung auf die geimpfte Zelle verständlich.

Der nächste Versuch soll zeigen, in welchem Maße nicht miteinander verwandte Viren in ihren Substratansprüchen voneinander unabhängig sein können.

Versuch 2.

Es wurden 3 Tabakpflanzen (Samsun), die im Jugendstadium (am 23. Juli) mit dem milden Stamm Cs/n des X-Virus infiziert worden waren, 13 Wochen später (am 27. Oktober) an dreien ihrer obersten ausgewachsenen Blätter, von denen anzunehmen war, daß in ihnen das X-Virus seine Vermehrungshöchstgrenze erreicht hatte, mit Rohsaft des TM-Virus durch Einreiben unter Anwendung von Karborundpuder beimpft (B). Zur Kontrolle wurden vergleichbare Blätter gesunder Tabakpflanzen in derselben Weise mit diesem Virus beimpft (A).

Am 27. Oktober (unmittelbar nach der Verimpfung), sowie am 30. Oktober und am 2. November wurden mit den zusammengekommenen Säften von den drei behandelten Blättern je einer A- und einer B-Pflanze Verimpfungen zu *Nicotiana glutinosa* als Testpflanze ausgeführt. Dazu wurden A- und B-Säfte nebeneinander auf die Hälften von 2 Blättern an 3 *glutinosa*-Pflanzen verrieben. Die einige Tage später

erschienenen nekrotischen TM-Infektionsherde auf den Blatthälften wurden gezählt (s. Tab. 2).

Tabelle 2. Zunahme des TM-Virus in vom X-Virus (Stamm Cs/n) durchsetzten Samsunpflanzen (B) und in den gesunden Kontrollen (A).

Anzahl Einzelherde je Blatthälfte (*Nicotiana glutinosa*)

1. Abimpfung	Pflanze Nr.	Blatt Nr.	A-Hälfte	B-Hälfte	
unmittelbar nach der Ver- impfung am 27. 10.	1	1	19	18	
		2	34	26	
	2	1	32	34	
		2	32	25	
	3	1	33	21	
		2	35	42	
	Mittel:			30,8	27,7

mittlere Differenz $A-B = 3,2 \pm 2,9$ $t = 1,1$ $p = 0,33$
nicht gesichert¹.

2. Abimpfung	Pflanze Nr.	Blatt Nr.	A-Hälfte	B-Hälfte	
nach 3 Tagen am 30. 10.	1	1	31	27	
		2	43	28	
	2	1	22	24	
		2	20	5	
	3	1	35	28	
		2	27	37	
	Mittel:			29,7	24,8

mittlere Differenz $A-B = 4,8 \pm 4$ $t = 1,2$ $p = 0,28$
nicht gesichert.

3. Abimpfung	Pflanze Nr.	Blatt Nr.	A-Hälfte	B-Hälfte	
nach 6 Tagen am 2. 11.	1	1	134	112	
		2	137	139	
	2	1	159	153	
		2	160	131	
	3	1	98	210	
		2	120	129	
	Mittel:			134,7	145,7

mittlere Differenz $A-B = -11 \pm 21$ $t = 0,52$ $p = 0,62$
nicht gesichert.

Mittlere Differenz aus den 3 Abimpfungen:

$$A-B = -1 \pm 7$$

$$t = 0,14$$

$$p = 0,89$$

also keine Unterschiede zwischen den A- und B-Preßsäften.

Die vergleichenden Abimpfungen mit den Preßsäften aus den A- und B-Blättern zu *Nicotiana glutinosa* als Testpflanze zeigten, daß sich das TM-Virus bis zum sechsten Tag (ein späterer Termin wurde nicht geprüft) in beiderlei Blättern mit offenbar übereinstimmender Intensität stark vermehrt hatte. Die Vermehrung des TM-Virus war also durch die Gegenwart des X-Virus in keiner Weise beeinträchtigt worden.

Auch bei *Datura Stramonium* liegen die Dinge offenbar nicht anders, was sich zeigt, wenn man das TM-Virus auf Blätter aufreibt, die vom X-Virus durchsetzt sind. Die dann auftretenden nekrotischen Infektionsherde unterscheiden sich nur anfänglich in der Färbung schwach von denjenigen, die gleichzeitig auf den gesunden Kontrollblättern erscheinen. Im übrigen ist die Übereinstimmung von Anfang an vollkommen und die beiderlei Herde vergrößern sich mit der gleichen Geschwindigkeit, woraus gefolgert werden darf, daß die Vermehrung und Ausbreitung des superinfizierten Virus nicht beeinträchtigt ist (Abb. 1).

Daß die Vermehrung des superinfizierten Virus nicht etwa unter Ausnutzung des im Blatt schon vorhandenen Virus erfolgt, wurde früher schon in einer größeren Versuchsreihe dargetan (KÖHLER 1934 I).

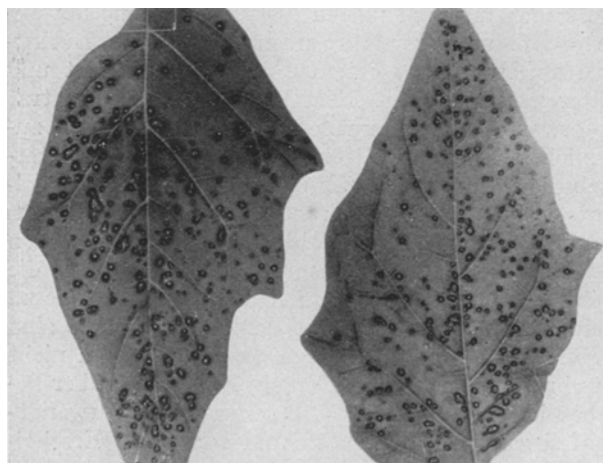


Abb. 1. *Datura Stramonium*. Links gesundes Blatt. Rechts mosaikkranke Blatt einer mit dem X-Virus (Stamm Bm) vorinfizierten Pflanze. Nach dem Einreiben mit dem TM-Virus sind auf beiderlei Blättern nekrotische Flecken gleichen Aussehens erschienen.

Daß die Vermehrung des superinfizierten (artverschiedenen) Virus nicht immer unbehindert durch das erste erfolgen muß, scheinen neuere Versuche von O. BODE (1943) mit seinem „E. N.-Virus“ darzutun. Dieses Virus, das augenscheinlich eine Variante des Tabak-Nekrose-Virus ist, erzeugt beim Einreiben auf die Blätter von Tabakpflanzen ansehnliche nekrotische Infektionsherde. Wird es auf Blätter superinfiziert, die vom TM-Virus durchdrungen sind, so entwickeln sich wesentlich kleinere, gleichfalls nekrotische Herde, deren Wachstum frühzeitig zum Stillstand kommt. Die Vermehrungsfähigkeit des superinfizierten Virus ist durch das erste Virus offenbar stark beeinträchtigt. Augenscheinlich hat das erste Virus für das zweite ein Minimum geschaffen, das sonst nicht vorhanden ist. Man darf folgern, daß beiden Viren ein bestimmter Grundbaustoff gemeinsam ist. Dieser wird durch das TM-Virus nicht erschöpft; der vorhandene Rest genügt, um dem E. N.-Virus noch eine Entwicklung bis zu einer gewissen Höhe zu ermöglichen.

Daß auch nah verwandte Viren in ihren Ansprüchen an das Substrat verschieden sein können, zeigt der folgende Fall, über den KÖHLER und PÁNJAN (1944) früher schon kurz berichteten. Wenn man Pflanzen der türkischen Tabaksorte „Samsun“, die im Jugendstadium mit dem gewöhnlichen „grünen“ Tabakmosaikvirus („TM“) infiziert wurden, später an jüngeren, ausgewachsenen Blättern mit einem sogenannten Gelbstamm derselben Virusart beimpft, so beobachtet man völlige Abwehr. Eine Durchbrechung der cross immunity-Regel wurde dagegen beobachtet, wenn zur Erstinfektion der Samsunpflanzen statt des TM-Virus das Paratabakmosaikvirus (PTM), eine stärker abweichende Variante des TM-Virus, verwendet wurde. Bei zusätzlicher Beimpfung¹ mit verschiedenen „Gelbstämmen“ trat die erwartete Abwehr

¹ $t = \frac{\text{mittlere Differenz}}{\text{mittleren Fehler der Differenz.}}$

$p = \text{Wahrscheinlichkeit, daß die Differenz} = 0 \text{ wird.}$

¹ Die zum Einreiben verwandten, übrigens völlig ausgewachsenen Blätter, zeigten auf ihrer gesamten Fläche stets die lückenlose, deutliche Ausbildung der PTM-Symptome.

regelmäßig nicht ein; vielmehr erschienen nach einer hinreichenden Frist jedesmal deutliche Mischsymptome am Zuwachs, woraus zu schließen ist, daß sich die Gelbstämme neben dem in den Blättern vorhandenen PTM-Virus durchsetzen konnten und daß ihr Virus in beträchtlicher Menge in die Zuwachszone abwanderte. Wenn andererseits Samsun- oder White Burley-Pflanzen zuerst mit einem Gelbstamm infiziert und später zusätzlich mit PTM beimpft wurden, so trat die erwartete vollkommene Abwehr ein; an den zusätzlich beimpften Blättern von White Burley unterblieb die Bildung der auffälligen nekrotischen Einzelherde, wie sie dieses Virus an gesunden Blättern dieser Sorte in großer Zahl erzeugt, und bei den zusätzlich beimpften Samsunpflanzen unterblieb die Bildung von Mischsymptomen am Zuwachs. Die zu beantwortende Frage lautet demnach: weshalb sind die mit dem PTM infizierten Samsunpflanzen nicht abwehrfähig, obgleich doch kein Zweifel darüber bestehen kann, daß das PTM in den näheren Verwandtschaftskreis des TM gehört und somit die Erscheinung der cross immunity zu erwarten wäre?

Zum Beleg unserer obigen Ausführungen wird zunächst eine Übersicht über die Ergebnisse der in den Jahren 1942 und 1943 ausgeführten Abwehrversuche gegeben:

Versuchs-Datum	Tabak-Sorte	Erstes Virus	Zweites Virus		
			Gelbstamm Mü	Gelbstamm Gz	PTM
11. 12. 1943	Samsun	PTM	keine Abwehr	—	—
19. 6. 1943	Samsun	PTM	—	keine Abwehr	—
19. 6. 1943	Samsun	Gelbst. G 2	—	—	Abwehr
16. 7. 1943	Wh. Burl.	TM/w	—	—	Abwehr
22. 7. 1943	Wh. Burl.	TM/w	—	—	Abwehr

KÖHLER und PÁNJAN haben über die hier zutage getretene Regelwidrigkeit seinerzeit eine Deutung zu geben versucht, die dem Sinne nach wie folgt lautet: In der mit einem Grün- oder Gelbstamm des TM-Virus infizierten Tabakpflanze tritt durch die Infektion eine Erschöpfung an einem Grundbaustoff des Virusproteins ein, auf den das PTM nicht weniger angewiesen ist als die TM-Stämme; daher die Abwehr des PTM. In den mit PTM infizierten Samsunpflanzen andererseits gelangt ein Grundbaustoff ins Minimum, der für den Aufbau der TM-Stämme unwesentlich oder unnötig ist.

So können sich die letzteren neben dem bereits vorhandenen PTM vermehren und werden mit dem Assimilatestrom in die wachsende Sproßspitze geleitet; ihre „Abwehr“ kommt somit nicht zustande.

Es müßte sich dabei um einen für das PTM spezifischen Baustoff handeln, der von der Zelle nur in geringer Menge zur Verfügung gestellt werden kann und die Vermehrung dieses Virus begrenzt. Alle TM-Stämme, die diesen Baustein nicht nötig haben, könnten dann die vom PTM übrig gelassenen Baustoffe zu ihrer Vermehrung verwenden. Wenn dem so ist, so muß sich nachweisen lassen, daß

1. das PTM-Virus in den Blättern des Samsuntabaks nicht dieselbe hohe Konzentration erreicht wie das TM-Virus und daß

2. die Viruskonzentration in den Blättern der von dem PTM-Virus durchsetzten Pflanzen um einen entsprechenden Betrag ansteigt, wenn man diese Pflanzen mit einem gewöhnlichen Grün- oder Gelbstamm des TM-Virus zusätzlich infiziert.

Der nachstehend mitgeteilte Versuch zeigt, daß die erste Voraussetzung zutrifft. Die zweite Voraussetzung unterliegt z. Zt. noch der experimentellen Prüfung.

Versuch 3.

Von je 20 jungen Tabakpflanzen (Samsun) wurden am 31. Mai je 10 mit TM und PTM infiziert. Von den herangewachsenen Pflanzen wurden am 21. Juni je 5 an einem ihrer oberen ausgewachsenen Blätter, die auf der gesamten Fläche die typischen Mosaiksymptome entwickelt hatten, durch Einreiben mit dem Stamm Mü, einem typischen, von STELZNER 1943 in Münchenberg isolierten „Aucubastamm“ beimpft. Von den 10 übrigen Pflanzen (je 5 PTM und TM) wurden gleichzeitig entsprechende Blätter ausgepreßt und die beiderlei Sammelsäfte nebeneinander auf Hälften von *Nicotiana glutinosa*-Blättern durch Einreiben verimpft, um die Viruskonzentrationen mit der Einzelherdmethode zu vergleichen. Die Zählung der auf den *glutinosa*-Blatthälften entstandenen Einzelherde ergab die auf Tabelle 3 verzeichneten Werte.

Tabelle 3. Anzahl Einzelherde auf Hälften von *N. glutinosa*-Blättern.

1. Hintere Blatthälften mit PTM, vordere mit TM infiziert.

Pflanze Nr.	Blatt Nr.	PTM-Saft	TM-Saft
1	1	58	123
	2	44	96
2	1	50	71
	2	46	77
3	1	34	51
	2	30	48
4	1	60	115
	2	59	88
5	1	49	118
	2	58	90
		488	877
= 1 : 1,8.			

2. Vordere Blatthälften mit PTM, hintere mit TM infiziert.

Pflanze Nr.	Blatt Nr.	PTM-Saft	TM-Saft
1	1	43	108
	2	44	117
2	1	65	82
	2	55	91
3	1	36	107
	2	51	101
4	1	50	85
	2	32	91
5	1	65	132
	2	54	126
		495	1040
= 1 : 2,1.			

Somit Konzentration-Verhältnis PTM : TM im Mittel = 1 : 1,95.

Demnach erreichte das PTM-Virus im Samsunblatt augenscheinlich etwa nur die halbe Konzentration des TM-Virus. Wir können in diesem Befund eine Stütze unserer eben entwickelten Annahme erblicken.

Das Ergebnis der gleichzeitig ausgeführten zusätzlichen Verimpfungen war wieder dasselbe wie bei den früheren diesbezüglichen Versuchen: an den TM-

Pflanzen trat völlige Abwehr ein, an den PTM-Pflanzen erschienen schon am übernächsten Blatt (ein Blatt wurde „überschlagen“) einwandfreie Mischsymptome.

Eine Wiederholung dieses Versuches im Sommer 1946 führte zu demselben Ergebnis. Am 3. 8. wurden 8 Tabakpflanzen mit dem TM- und weitere 8 Pflanzen mit dem PTM-Virus infiziert. Von den mit gleichmäßigen Mosaiksymptomen ausgestatteten Pflanzen wurde am 5. 10. je ein ausgewachsenes Blatt abgenommen und der durch Glaswolle filtrierte, 1 : 30 verdünnte Sammelsaft der PTM-Pflanzen mit dem der TM-Pflanzen auf Blatthälften von *Nicotiana glutinosa* verglichen. Und zwar wurden 20 Blätter auf der linken Hälfte mit PTM-, auf der rechten mit TM-Saft beimpft, und weitere 20 Blätter umgekehrt auf der linken Hälfte mit TM- und auf der rechten mit PTM-Saft. Die Blätter wurden von den Pflanzen abgetrennt und bis zur Ausbildung der Symptome in feuchten Petrischalen belassen. Die erhaltenen Nekrosenzahlen sind in Tab. 4 zusammengestellt. Auch in

Tabelle 4. Nekrosenzahlen von TM- und PTM-Saft (Verdünnung 1 : 30) auf Blatthälften von *Nicotiana glutinosa*.

Pflanze Nr.	Blatt Nr.	linke Hälfte PTM-Saft	rechte Hälfte TM-Saft	Blatt Nr.	linke Hälfte TM-Saft	rechte Hälfte PTM-Saft
I	I	5	13	2	13	4
	3	1	12	4	14	3
II	I	28	37	2	14	13
	3	20	36	4	50	20
III	I	25	37	2	19	12
	3	9	43	4	21	18
IV	I	5	16	2	7	1
	3	9	27	4	5	0
V	I	8	23	2	16	12
	3	8	14	4	12	11
VI	I	18	27	2	49	17
	3	8	28	4	14	14
VII	I	5	13	2	22	15
	3	7	8	4	16	14
VIII	I	5	13	2	6	5
	3	4	3	4	18	3
IX	I	5	21	2	7	5
	3	4	12	4	10	5
X	I	7	8	2	11	1
	3	7	6	4	14	14
		188	397		338	187

PTM: Summe 375, Mittel: $9,4 \pm 1,1$

TM: Summe 735, Mittel: $18,4 \pm 1,9$

TM-PTM: 360 $9 \pm 1,4$

Differenz sehr gut gesichert ($p^1 \ll 0,0002$).

diesem Versuch traten beim TM-Virus bedeutend mehr Nekrosen auf, nämlich das 1,96fache der PTM-Nekrosenzahl.

Versuch 4.

Um den möglichen Einwand zu entkräften, daß die Unterschiede in den Nekrosenzahlen nicht durch Konzentrationsunterschiede zwischen beiden Viren, sondern durch verschieden starke Aggregation ihrer Partikel bedingt sein könnten, wurde am 28. 6. 1946 eine Ver-

dünnungsreihe 1 : 10 : 50 : 100 : 500 : 1000 : 5000 : 10000 hergestellt und die entsprechenden Konzentrationen des TM- bzw. PTM-Saftes auf Blatthälften von *N. glutinosa* verimpft, wobei für jede Verdünnung 20 Blätter zur Verfügung standen. Die Abhängigkeit der Nekrosenzahlen von der Viruskonzentration ist in Abb. 2 graphisch dargestellt. Die Differenzen zwischen den TM- und den PTM-Säften sind bei den Verdünnungen zwischen 1 : 10 und 1 : 100 sehr gut gesichert¹ ($p \leq 0,0027$). Die Kurven lassen sich durch Parallelverschiebung, und zwar durch Verschiebung der PTM-Kurve um $0,29 = \log 1,96$ nach rechts, weitgehend

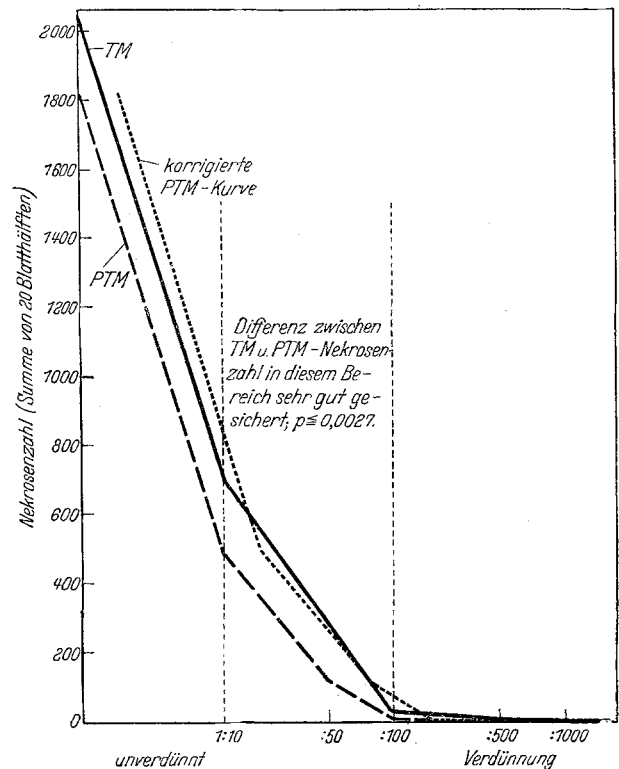


Abb. 2. Nekrosenzahlen des TM- und PTM-Virus auf *N. glutinosa* bei verschiedenen Verdünnungen.

zur Deckung bringen. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit dem Ergebnis von Versuch III, wonach die TM-Konzentration 1,95–1,96 mal der PTM-Konzentration ist. Die Aggregationsneigung ist über die ganze Verdünnungsskala hinweg bei beiden Viren gleich.

Weiter war festzustellen, ob etwa die mangelhafte Abwehrfähigkeit der PTM-Blätter gegen das TM-Virus auf eine niedrigere Vermehrungsgeschwindigkeit des PTM-Virus zurückgeführt werden könnte. Zur Klärung dieser Frage wurde der nachstehende

Versuch 5

angestellt:

Am 8. 8. 1946 wurden 60 junge Samsunpflanzen an je einem Blatt mit Virus infiziert, und zwar die Hälfte der Pflanzen mit TM-, der Rest mit PTM-Saft. Gleich nach dem Einreiben, ferner nach 4, 8, 12, 20 und 28 Tagen wurden von je 5 Pflanzen Sammelsäfte der beimpften Blätter hergestellt und in der Verdünnung 1 : 25 auf Blatthälften von *N. glutinosa* getestet. Die Zunahme der Viruskonzentration in den ersten 12 Tagen nach der Beimpfung ist in Abb. 3 graphisch

¹ Vgl. Fußnote S. 99.

¹ Vgl. Fußnote S. 99.

dargestellt. Die Ergebnisse der späteren Abimpfungen sind nicht verwertbar, weil die eingeriebenen Blätter schon anfangen abzusterben. Bis zum

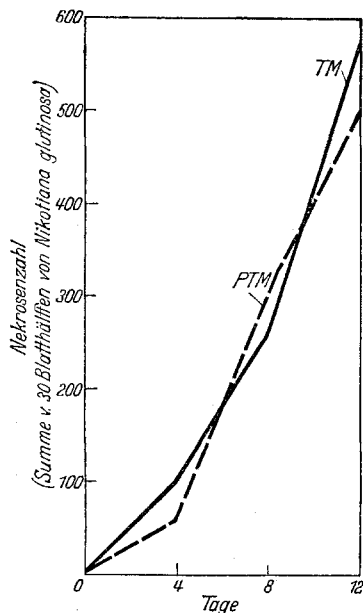


Abb. 3. Zunahme des TM- bzw. PTM-Virus im eingeriebenen Blatt beim Samsuntabak innerhalb der ersten 12 Tage nach der Beimpfung.

12. Tage nach dem Einreiben waren keine gesicherten Unterschiede zwischen den Vermehrungsgeschwindigkeiten beider Viren im Samsunblatt festzustellen.

Sammelsäfte aus je 5 jüngeren, vergleichbaren PTM- bzw. TM-Blättern, die 28 Tage nach der Infektion der Samsunpflanzen hergestellt wurden, ergaben ein Konzentrationsverhältnis $PTM : TM = 1 : 1,7$, wobei die Differenz zwischen beiden Virussäften sehr gut gesichert war ($p < 0,0002$).

Beim Vergleich der Viruskonzentrationen in den eingeriebenen Blättern innerhalb der ersten 12 Tage nach der Beimpfung traten starke Streuungen auf. Durch die Herstellung der Sammelsäfte aus je 5 Blättern waren die Unterschiede zwischen den verschiedenen Pflanzen, deren Blätter als ganze mit einem Virus eingerieben waren, noch nicht hinreichend ausgeglichen. Deshalb wurden noch weitere Versuche angesetzt zum Vergleich der TM- bzw. PTM-Viruszunahme auf den beiden Hälften eines Samsunblattes, mit dem Ziel, die Vermehrungskurve bis zum Vermehrungsstillstand zu registrieren, der nach den obigen Ergebnissen für beide Viren in verschiedener Konzentrationshöhe liegen muß. Diese Untersuchungen sind noch nicht abgeschlossen.

Unsere Minimumhypothese gestattet nun auch eine Anwendung auf eine andere, viel diskutierte Erscheinung, der besonders W. C. PRICE seine Aufmerksamkeit geschenkt hat. Es handelt sich um die sogenannte erworbene Immunität, die besonders beim Tabak-ring spot-Virus eingehender studiert worden ist. Wenn man Tabakpflanzen mit diesem Virus infiziert, so bilden sich an den Blättern, in die das Virus einströmt, sehr schwere Krankheitssymptome. Dabei bleibt es aber nicht. An den später sich entfaltenden Blättern treten die Symptome mehr und mehr zurück, bis schließlich Blätter gebildet werden, die einen nahezu völlig gesunden Eindruck machen. Untersucht man diese gesund aussehenden Blätter auf ihren Virusgehalt, so findet man (PRICE 1936, STANLEY 1939), daß sie zwar noch Virus enthalten, aber nur noch etwa ein Sechstel der in älteren, stark kranken Blättern gebildeten Menge. Stellt man von den gesunden Sproßteilen Stecklinge her, so entwickeln sich auch diese gesund und lassen sich durch Neuimpfung mit demselben oder einem nahe verwandten Virus nicht

wieder krank machen. Trotz verminderten Virusgehalts bleibt die Beimpfung erfolglos, die Pflanzen bleiben gesund und erweisen sich somit als „abwehrfähig“.

Der Symptombelauf an den nacheinander sich entwickelnden Blättern eines infizierten Sprosses läßt mit Sicherheit darauf schließen, daß der die „Immunität“ bewirkende Mechanismus nur im sehr jugendlichen Gewebe Platz greift und zwar automatisch mit dem Eindringen des Virus. Nur Blätter und Blatteile, in die das Virus auf einem sehr frühen Entwicklungsstadium eingetreten ist, erweisen sich später als „geheilt“, während alle Blätter und Blatteile, in die das Virus in einem fortgeschrittenen Stadium der Gewebeerkrankung einströmt, stark erkranken. Offenbar ist also das in der Differenzierung weiter fortgeschrittene Gewebe dem Hemmungsmechanismus entwichen, der die Vermehrung des Virus abbremst und die Symptome unterdrückt oder doch stark mildert. Das eigentliche Problem liegt in der Frage nach dem Wesen dieses Hemmungsmechanismus.

Zweifelloos ist der Viruseintritt selbst die Ursache der festgestellten Veränderung und man kann ohne Bedenken von einer induzierten Resistenz oder Immunität sprechen. Welches ist nun aber der Mechanismus der Induktion? Mit Hilfe der Minimumtheorie ergibt sich eine einfache Lösung. Man braucht nur anzunehmen, daß die Infektion dazu führt, daß die Erzeugung eines für den Virusaufbau unentbehrlichen Grundstoffes gehemmt wird, so wird ohne weiteres verständlich, warum der Virusgehalt herabgesetzt wird und warum dieser trotzdem durch Neuimpfung nicht erhöht und die Pflanze nicht wieder krank gemacht werden kann. Genauer gesprochen hätte man sich die Induktion so vorzustellen, daß durch das Einströmen des Virus in das sehr jugendliche Blattgewebe die Stoffwechselvorgänge in diesem in solche Bahnen gelenkt würden, daß ein bestimmter für den Virusaufbau unentbehrlicher Zellinhaltsstoff (Molekül, Radikal) in geringerer Menge erzeugt wird als dies im unbeeinflussten Blatt der Fall ist. Dieser Grundbaustoff würde also in dem beeinflussten Gewebe sich schneller erschöpfen als im unbeeinflussten, die vorzeitige Beendigung der Virusvermehrung wäre die notwendige Folge. Diese Annahme dürfte auch der Nachprüfung mit chemischen Methoden zugänglich sein.

Im Anschluß an unseren Versuch 3 wurden weitere Ermittlungen über das Vordringen des TM-Virus in der PTM-infizierten Tabakpflanze (Samsun) angestellt. An den mit dem Gelbstamm „Mü“ zusätzlich beimpften PTM-Samsunpflanzen war es auffällig, daß zunächst zwar deutliche Mischsymptome auftraten, daß aber die Symptome an den oberen, neu entwickelten Blättern sich mehr und mehr den Symptomen der nur mit dem Mü-Stamm infizierten Pflanzen angleichen, bis schließlich überhaupt kein Unterschied mehr zwischen den reinen Mü-Pflanzen und den Gemischpflanzen zu erkennen war. Man erhielt den Eindruck, als ob das PTM-Virus in den oberen Blättern der Gemischpflanzen von dem Mü-Virus gänzlich verdrängt sei. Wie die Dinge in Wirklichkeit lagen, ergibt sich aus dem

Versuch 6,

der wie folgt angelegt war. Eine Serie junger Samsunpflanzen wurde am 31. Mai mit dem PTM-Virus be-

impft. Zwei von diesen (A und B) wurden am 21. Juni mit dem Stamm Mü an zwei durchweg erkrankten Blättern zusätzlich beimpft, am 7. August wurden darüber Blätter verschiedener Höhe ausgepreßt und die Säfte auf Blätter von 4 White Burley-Pflanzen und 4 *Nicotiana glutinosa*-Pflanzen vergleichsweise durch Einreiben verimpft. Von jeder der beiden Pflanzen A und B kamen drei Säfte zur Verimpfung:

- Sammelsaft aus 2 Blättern der Spitzenregion,
- Sammelsaft aus 2 etwas älteren Blättern (zwischen a und c)
- Sammelsaft aus 2 Blättern, die die ersten Mischsymptome zeigten (nicht von den beiden eingegebenen).

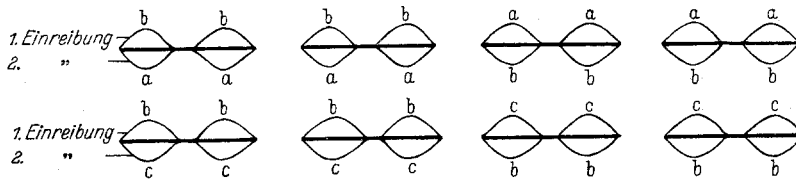


Abb. 4. Verimpfung der Säfte a, b und c zu den Blatthälften an 8 Testpflanzen.

Wie aus einem Sonderversuch mit der Blatthälftenmethode bekannt war, stimmen das PTM-Virus und das Mü-Virus darin vollkommen überein, daß sie an *Nicotiana glutinosa* nekrotische Infektionsflecke gleichen Aussehens hervorrufen, während an dem White Burley-Tabak nur das PTM-Virus nekrotische Flecken erzeugt, das Mü-Virus aber keine solchen. Die Säfte konnten also an *N. glutinosa* bezüglich ihres Gehalts an b e i d e n Viren, an Wh. Burley nur bezüglich ihres Gehalts an PTM-Virus verglichen werden. Die Verimpfungen geschahen mit der Blatthälftenmethode nach dem Schema (Abb. 4). Das Ergebnis ist auf Tab. 5 zusammengefaßt; die Einzelwerte sind aus Tab. 6 ersichtlich.

Tabelle 5. Anzahl nekrotischer Einzelherde.

1. Abimpfung von Pflanze A

zu Wh. Burley				zu <i>Nic. glutinosa</i>			
Säfte: a	b	a : b		a	b	a : b	
1121	866	129 : 100		807	498	162 : 100	
mittlere Differenz:							
a—b = 36,4 ± 12,3				a—b = 38,6 ± 7,7			
t = 5; p = 0,0015				t = 3; p = 0,02			
Säfte: c	b	c : b		c	b	c : b	
748	837	89 : 100		759	679	112 : 100	
mittlere Differenz:							
b—c = 14,8 ± 18,5				b—c = —10 ± 6,5			
t = 0,8; p = 0,46				t = 1,5; p = 0,17			

2. Abimpfung von Pflanze B

zu Wh. Burley				zu <i>Nic. glutinosa</i>			
Säfte: a	b	a : b		a	b	a : b	
1411	1113	127 : 100		550	393	140 : 100	
mittlere Differenz:							
a—b = 37,3 ± 6,2				a—b = 19,6 ± 5,2			
t = 6; p = 0,0005				t = 3,8; p = 0,07			
Säfte: c	b	c : b		c	b	c : b	
890	1541	58 : 100		465	432	108 : 100	
mittlere Differenz:							
b—c = 81,4 ± 21,2				b—c = 4,1 ± 5,8			
t = 3,8; p = 0,0065				t = 0,7; p = 0,5			

3. Von den Pflanzen A und B zusammengefaßte Werte

auf White Burley	auf <i>Nic. glutinosa</i>
mittlere Differenz:	
a—b = 37 ± 6,37	a—b = 29,1 ± 5,1
t = 58,	t = 5,7
p < 0,0002	p < 0,0002
mittlere Differenz:	
b—c = 53 ± 16,7	b—c = —7,1 ± 4,3
t = 3,2	t = 1,7
p = 0,007	p = 0,11

Tabelle 6.

Anzahl Infektionsherde bei der Übertragung von Preßsäften aus verschiedenen Blattregionen a (oben), b (Mitte) und c (unten) zu Blatthälften von *Nicotiana glutinosa* bzw. White Burley-Tabak.

1. von Pflanze A

	a-Hälfte	b-Hälfte	b-Hälfte	c-Hälfte
Nekrosenzahlen auf <i>Nicotiana glutinosa</i> (Gesamt-Virus-Konzentration)	100 71 132 125 59 82 115 123	55 36 83 53 54 54 58 105	91 80 79 88 91 87 82 81	66 107 98 78 117 104 89 100
Summe	807	498	679	759
Nekrosenzahlen auf White Burley-Tabak (PTM-Konzentration)	105 198 142 167 304 — ¹ 155 50	85 99 127 109 270 — ¹ 129 47	74 165 76 232 142 148 — ² — ²	55 97 81 197 206 112 — ² — ²
Summe	1121	866	837	748

2. von Pflanze B

	a-Hälfte	b-Hälfte	b-Hälfte	c-Hälfte
Nekrosenzahlen auf <i>Nicotiana glutinosa</i> (Gesamt-Virus-Konzentration)	65 76 36 36 37 39 164 97	43 48 23 23 30 30 112 84	28 50 46 86 35 37 88 62	39 47 88 76 31 37 88 59
Summe	550	393	432	465
Nekrosenzahlen auf White Burley-Tabak (PTM-Konzentration)	190 156 165 129 263 305 123 80	135 116 127 94 210 255 97 79	93 146 325 131 206 161 289 190	99 102 230 66 130 103 91 69
Summe	1411	1113	1541	890

¹ Infektionen zu dicht, daher Zählung unmöglich.

² Nicht auswertbar, da versehentlich nur eine Blatthälfte eingegeben.

Diese Zahlen lassen erkennen, daß das PTM-Virus in den oberen Blättern (a) noch in mindestens denselben, bei Pflanze B sogar in bedeutend höherer Konzentration vorhanden ist als in den mittleren (b). Allerdings weist die Gesamtkonzentration in den oberen Blättern einen noch größeren Anstieg auf, was auf eine noch stärkere Zunahme des Mü-Virus zurückgeführt werden muß, so daß das Verhältnis beider Viren sich in den oberen Blättern etwas zugunsten des Mü-Virus verschoben hat. Auffällig könnte die gefundene beträchtliche Abweichung zwischen den Werten b und c bei den beiden Verimpfungen zu Wh. Burley (im einen Fall 89%, im anderen 58% für c) erscheinen. Sie ist aber sehr erklärlich, da die c-Säfte aus Blättern gewonnen waren, die die ersten Mischsymptome erkennen ließen; die unteren Blätter von Pflanze B enthielten offenbar schon beträchtlich mehr Virus vom Stamm Mü als diejenigen von Pflanze A. Derartige Schwankungen sind bei Frühstadien der Mischinfektion nicht befremdend, es muß mit ihnen von vornherein gerechnet werden. Andererseits lehrt die annähernde Übereinstimmung zwischen den A- und B-Abimpfungen bezüglich des Verhältnisses a : b auf Wh. Burley, daß später ein Ausgleich erfolgt ist. Jedenfalls ergibt sich für beide Pflanzen aus den hohen Nekrosenzahlen auf White-Burley-Tabak, daß trotz der völligen Unterdrückung der PTM-Symptome eine Verdrängung des PTM-Virus auch in den oberen Blättern bei weitem noch nicht eingetreten ist. Dieses Ergebnis bedeutet eine nachdrückliche Warnung, bei Mischinfektionen aus dem Symptombild Schlüsse auf den jeweiligen Anteil der Gemischartner ziehen zu wollen.

Unser Befund, daß es bei Mischinfektionen nah verwandter Viren zu einer vollständigen Maskierung des einen Partners kommen kann und zwar selbst dann wenn dieser noch in sehr beträchtlicher Konzentration vorliegt, legt die Revision mancher Schlußfolgerung nahe. So dürften sich z. B. manche Schlüsse, die THUNG (1937—1939) aus seinen Versuchen bezüglich Virusantagonismus gezogen hat, als nicht stichhaltig erweisen und auch die Auffassung, die unlängst E. GÄUMANN (1944) im Anschluß an bestimmte Versuche von R. N. SALAMAN geäußert hat, dürfte sich kaum halten lassen. SALAMAN (1938) hatte differente Stämme des Kartoffel-X-Virus in verschiedenen Mischungsverhältnissen auf Tabakpflanzen (Wh. Burley) verimpft und fand, daß der im Impfgemisch benachteiligte Partner schon etwa bei einem Verhältnis 1 : 9 seinen Einfluß auf das „klinische Bild“ annähernd und bei etwa 1 : 15 so gut wie ganz verlor (Tab. 6 von SALAMAN). Er hat die Frage nicht geprüft, ob das Schwinden dieses Einflusses auf das Verschwinden des benachteiligten Partners zurückzuführen sei und spricht kurzweg von „Maskierung“. GÄUMANN gibt den wesentlichen Inhalt der SALAMANSchen Tabelle sehr anschaulich in Form einer Kurve wieder und führt sie als Beweismittel für die Auffassung an, daß die cross immunity durch aktive Immunisierung veranlaßt sei. Die Beweiskraft mangelt jedoch so lange, als nicht nachgewiesen ist, daß der schwindende Einfluß des einen Partners tatsächlich auf dessen Ausschließung beruht. Ob ein solcher Nachweis möglich ist, dürfte aber nach unseren oben mitgeteilten Erfahrungen fraglich sein;

nach unserem Dafürhalten verträgt sich das Ergebnis des SALAMANSchen Versuches mit der Minimumtheorie aufs beste.

Zusammenfassung.

Es wird die Vorstellung zu begründen versucht, daß die von englisch schreibenden Autoren als cross immunity bezeichnete Erscheinung dadurch verursacht ist, daß durch das erstverimpfte Virus eine Erschöpfung der Zelle an bestimmten greifbaren Grundbausteinen eintritt, auf die das zweitverimpfte nicht weniger angewiesen ist als das erste. Wenn also keine eigentliche Infektion durch das zweite Virus zustande kommt, so beruht dies vermutlich darauf, daß letzterem die Möglichkeit entzogen ist, sich zu vermehren und damit auch die Möglichkeit, in das Phloem vorzudringen.

Gegen die Annahme einer aktiven Abwehr des zweiten Virus spricht unser Befund beim X-Virus, daß das zweite nach seiner Verimpfung in die vom ersten Virus durchsetzten Blätter neben diesem geraume Zeit (mindestens 4 Tage) persistiert und seine Aktivität behält.

Ist das zusätzlich verimpfte Virus nicht mit dem ersten verwandt, so setzt es sich bekanntlich durch und infiziert die Pflanze. Dies wird damit erklärt, daß das zweite Virus in seinen Substratsprüchen vom ersten mehr oder weniger stark abweicht und sich demzufolge durch das erste mehr oder weniger unbehindert vermehrt, was durch Beispiele belegt wird.

Ein Fall der Durchbrechung der cross-immunity-Regel wird näher analysiert und wahrscheinlich gemacht, daß die Superinfektion hier deshalb möglich ist, weil das erste Virus (Paratabakmosaikvirus) in der betreffenden Wirtspflanze nur eine relativ niedrige Konzentration erreicht. Eine vergleichende Verdünnungsreihe vom Paratabakmosaik- und dem gewöhnlichen Tabakmosaikvirus stützt diesen Befund und spricht für gleiche Aggregationsneigung der beiden Viren bei den verschiedenen Viruskonzentrationen. Zwischen den Vermehrungsgeschwindigkeiten im beimpften Blatt waren während der ersten 12 Tage nach der Infektion keine Unterschiede zu verzeichnen.

Alle die genannten Konkurrenzerscheinungen zwischen zwei Viren lassen sich mit der Vorstellung in Einklang bringen, daß die Virusvermehrung durch den jeweils im Minimum vorhandenen oder doch in Konkurrenz mit den Wirtsansprüchen greifbaren Baustein begrenzt wird („Minimumtheorie“) — sofern nicht in Sonderfällen eine Komplizierung durch inaktivierende Einflüsse stattfindet.

Dieser Deutung fügt sich vielleicht auch die Erscheinung der sogenannten erworbenen Immunität, wie sie zuerst von PRICE am Tabak-Ringspot-Virus beobachtet und beschrieben wurde — was näher dargestellt wird.

Zum Schluß wird an einem Beispiel gezeigt, daß bei Mischinfektionen von zwei nahe verwandten Viren (aus der Gruppe des Tabakmosaiks) sich u. U. nur der eine Partner im Krankheitsbild durchsetzt, so daß es den Anschein hat, als ob der andere überhaupt nicht mehr vorhanden sei. Auf wahrscheinlich irrige, in Unkenntnis dieser Tatsache in der Literatur zur Deutung der cross immunity aufgestellte Schlußfolgerungen wird aufmerksam gemacht.

Literatur.

1. BODE, O.: seit 1943 im Druck. — 2. GÄUMANN, E.: Schweiz. Z. f. Path. u. Bakteriologie 7, 407 (1944). — 3. KÖHLER, E.: Phytopath. Z. 7, 1 (1934). — 4. KÖHLER, E.: Angew. Bot. 17, 60 (1935). — 5. KÖHLER, E.: Angew. Bot. 25, 313 (1943). — 6. KÖHLER, E. u. PÁNJA, M.: Ber. Deutsch. Bot. Ges. 61, 175 (1944). — 7. KUNKEL, L. O.: Phytopathology 24, 437 (1934). — 8. PRICE, W. C.: Contrib. Boyce Thompson Inst. 4, 359 (1932). — 9. PRICE, W. C.: Phytopathology 26, 503 (1936). — 10. PRICE, W. C., Quart. Rev. Biology 15, 338 (1940). — 11. QUAN-

JER, H. M.: Tijdschr. over Plantenziekten 48, 1 (1942). — 12. SALAMAN, R. N.: Nature 131, 468 (1933). — 13. SALAMAN, R. N.: Philos. Transact. Roy. Soc. London, Ser. B 229, 137 (1938). — 14. STANLEY, W. M.: J. Biolog. Chem. 129, 429 (1939). — 15. STELZNER, G.: Angew. Bot. 25, 359 (1943). — 16. THUNG, T. H.: Handling. VI. Nederl.-Ind. Naturw. Congr. Bandoeng, S. 450 (1913). — 17. THUNG, T. H.: Handling. VII. ebenda S. 496 (1935). — 18. THUNG, T. H.: Smetstof en plantencel etc. III—V (1937—1939). Tijdschr. over Plantenziekten, Jahrg. 43—45.

(Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Züchtungsforschung, Erwin-Baur-Institut, Voldagsen/Hann.)

Ein Serienverfahren zur Bestimmung des Alkaloidgehaltes in Süßlupinen.

Von P. SCHWARZE und FR. WOLLNER.

Die Züchtungsarbeiten an der *Süßlupine* sowie die Maßnahmen zur Reinerhaltung ihres Saatgutes erfordern neben den eigentlichen Auslesemethoden ein exaktes quantitatives Verfahren, mit dem der Alkaloidgehalt süßer Stämme genau ermittelt werden kann. Die Auslesemethoden der Süßlupinenzüchtung sind qualitative Methoden. Durch Quellenlassen oder Kochen mit Wasser stellt man nach von SENGBUSCH (1) Extrakte aus Lupinenkörnern her und ermittelt durch Zutropfen eines Alkaloidfällungsmittels, ob Alkaloid darin enthalten ist. Bei bitteren Körnern tritt ein kräftiger Niederschlag, bei alkaloidärmeren nur eine Trübung auf. Liegt der Alkaloidgehalt sehr niedrig oder ist überhaupt kein Alkaloid vorhanden, so bleibt die mit Reagenz versetzte Lösung völlig blank. Ein anderes von WUTTKE (2) angegebenes Verfahren besteht darin, die Körner mit Wasser zu kochen und anschließend in eine Jod-Jodkalilösung einzutauchen. Bittere Körner nehmen dabei eine dunkelbraune, alkaloidarme oder alkaloidfreie Körner nur eine schwach gelbe Färbung an. Noch einfacher gestaltet sich nach SCHWARZE (3) der Alkaloidnachweis in Grünmasse von gelben und blauen Lupinen. Man reißt von der zu prüfenden Pflanze ein Blatt so ab, daß ein Streifen der Stengelepidermis mit abgezogen wird. Die Reißstelle wird kurz in eine verdünnte Jod-Jodkalilösung eingetaucht und die äußerlich anhaftende Jodlösung mit Leitungswasser abgespült. Süßes Material behält seine ursprüngliche Farbe oder nimmt nur einen schwach gelblichen Ton an. Bei bitterem Material dagegen färbt sich die anfänglich farblose Epidermis dunkelbraun. Alle diese Methoden sind mit einfachen Mitteln in größtem Umfang durchzuführen. Diesem Umstand dankt die Süßlupinenzüchtung ihre bisherigen großen Erfolge, und für die zur Zeit laufenden und künftigen Arbeiten werden diese Methoden nicht zu entbehren sein. Wie bei den meisten qualitativen Reaktionen bedeutet aber auch hier das Ausbleiben der Reaktion, also der Fällung oder Färbung, nicht, daß der betreffende Stoff fehlt, sondern besagt nur, daß die vorhandene Menge unterhalb der Erfassungsgrenze der unter ganz bestimmten Bedingungen durchgeführten Reaktion liegt. Bei Kornuntersuchungen besteht bis zu einem gewissen Grad die Möglichkeit, die Reaktion empfindlicher zu gestalten. So kann man mehrere Körner an Stelle eines einzigen benutzen, man kann die Wassermenge, mit der die Körner gekocht werden, niedrig halten, um

eine möglichst hohe Alkaloidkonzentration zu erzielen, und schließlich läßt sich durch reichlichere Zugabe des Fällungsmittels die Empfindlichkeit der Reaktion etwas erhöhen.

Bei der quantitativen Untersuchung der mit qualitativen Methoden aufgefundenen süßen Formen hat man bisher immer gefunden, daß kein alkaloidfreies, sondern nur alkaloidarmes Material vorlag. Das trifft für alle in züchterischer Bearbeitung befindlichen Lupinenarten zu. Es liegt nun auf der Hand, daß von einer Reihe von Stämmen, die in ihren sonstigen Eigenschaften einander ebenbürtig sind, der mit dem niedrigsten Alkaloidgehalt den Vorzug verdient. Der Züchter hat deshalb größtes Interesse daran, den Alkaloidgehalt seiner süßen Stämme genau zu kennen. Im allgemeinen ist das ausgelesene süße Zuchtmaterial zahlenmäßig so begrenzt, daß eine quantitative Untersuchung im Bereich des Möglichen liegt. Es ist dafür eine Serienmethode, von der jedoch die Leistungsfähigkeit der qualitativen Verfahren nicht verlangt zu werden braucht, sehr erwünscht.

Für eine quantitative Serienmethode zur Alkaloidbestimmung in Süßlupinen interessiert sich aber nicht nur der Lupinenzüchter, auch die Saatgutprüfstelle, die für die Reinerhaltung des Saatgutes Sorge zu tragen hat, muß unbedingt eine solche Methode zur Verfügung haben. Der Saatgutprüfstelle fällt die Aufgabe zu, den Reinheitsgrad des Materials, der am zweckmäßigsten durch den %-Gehalt an bitteren Körnern ausgedrückt wird, zu ermitteln. Die gegebenen Methoden dafür scheinen die eingangs kurz beschriebenen Kornuntersuchungsverfahren zu sein. Bei ihrer Anwendung ergeben sich jedoch häufig Unklarheiten und andere Schwierigkeiten. So sind beim Nachweis der Alkaloide im Kochwasser, bei dessen Durchführung 400 Körner einzeln in Reagenzgläsern gekocht werden, die Ergebnisse nicht immer reproduzierbar, da die Kornzahl auch bei guter Durchmischung der Probe für einen wirklichen Durchschnitt zu klein ist. Eine Erhöhung der Körnerzahl, die diesen Mangel beheben würde, erschwert aber die Benutzung der Methode für Serienuntersuchungen ganz erheblich. Die Nachteile der zweiten Methode, bei der eine größere Anzahl von Körnern gemeinsam in einem Beutel gekocht und dann in eine Jod-Jodkalilösung getaucht wird, bestehen in dem nicht selten wenig ausgeprägten Färbungsunterschied von bitteren und süßen Körnern, der Irrtümer beim Auszählen der