

PROTEINE DER KARTOFFELKNOLLEN IN ABHÄNGIGKEIT VON SORTE UND VIROSEN (POLYACRYLAMID-ELEKTRO- PHORESE)

VOLKMAR LOESCHCKE und HERMANN STEGEMANN

Institut für Biochemie, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
D 351 Hann. Münden, Germany

(Eingegangen 4 Januar 1966)

Zusammenfassung—An 21 Kartoffelsorten (*Solanum tuberosum*) wurden die Proteine im Knollen-Press-Saft mittels Polyacrylamid-Elektrophorese untersucht. Durch 2 Läufe bei pH 8,2 und 8,9 liessen sich bis zu 25 anodisch und 2 kathodisch wandernde, mit Amidoschwarz färbbare Zonen differenzieren, dazu weitere enzymatisch aktive Zonen. Das Proteinmuster ist streng sortenabhängig und unbeeinflusst vom Standort bei normaler Düngung. Frisch geerntete Knollen unterscheiden sich im Pherogramm etwas von den Lagerkartoffeln. Virosen (Mosaik, Blattroll) üben keinen Einfluss auf die Verteilung der Proteine aus, bei Infektion mit Y-Virus scheinen in vielen Fällen 2 Zonen verändert zu sein.

Abstract—21 varieties of *Solanum tuberosum* have been investigated for their soluble proteins in the tuber by means of gel-electrophoresis on polyacrylamide. Two runs at pH 8.2 and 8.9 respectively showed up to 25 components migrating to the anode and 2 to the cathode after staining with Amido Black 10 B, and an additional number after testing for enzyme-activity. The protein pattern is strongly dependent on the variety, and is not influenced by ecological factors under normal conditions. Infection with mosaic- and leaf roll-virus does not change the pattern, whereas Y-virus seems to alter the intensity of two of the bands.

EINLEITUNG

Der Einfluss von genetischen, oekologischen und pathologischen Faktoren auf den Gesamtproteingehalt der Kartoffelknolle ist in zahlreichen Arbeiten behandelt worden.¹ Lange Zeit vermutete man ein einheitliches natives Kartoffelprotein, das Tuberin,² später differenzierte man das Tuberinin,³ bis durch verfeinerte Fällungs- oder Elektrophorese-Verfahren weitere Proteine bekannt wurden. Lindner⁴ unterscheidet nach der Fällbarkeit im *Press-Saft* globulinartige (=Tuberin, 76 Prozent) und albuminartige (4 Prozent) Proteine, die bei 40 bzw. 80% Ammonsulfat präzipitieren, nach der Extrahierbarkeit im unlöslichen *Press-Rückstand* Globulin II (1,4 Prozent, mit 5%igem Kaliumsulfat), Prolamin (1,8 Prozent, mit 70%igem Äthanol), Glutelin (5,5 Prozent, mit 0,2%iger Natronlauge in 60%igem Äthanol) und die nicht extrahierbaren, unlöslichen Skleroproteine (11 Prozent). Ein Teil des Proteins liegt in Kristallform im Cytoplasma der Peripherie- und Markzellen vor und wird als Reserveprotein angesehen.^{5,6} In welcher Fraktion dieses erfasst wird, ist nicht bekannt.

¹ K. SCHREIBER in *Die Kartoffel* (Herausgegeben von R. SCHICK und M. KLINKOWSKI), Bd. I, S. 217. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin (1961); N. W. PIRIE in *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* (Herausgegeben von K. PAECH und M. V. TRACEY), Bd. IV, S. 62. Springer Verlag, Berlin (1955); H. S. MCKEE in *Handbuch der Pflanzenphysiologie* (Herausgegeben von W. RUHLAND), Bd. VIII, S. 568. Springer Verlag, Berlin (1958).

² T. B. OSBORNE und G. F. CAMPBELL, *J. Am. Chem. Soc.* **18**, 575 (1896).

³ E. H. GROOT, L. W. JANSSEN, A. KENTIE, H. K. OOSTERHUIS und H. J. L. TRAP, *Biochim. Biophys. Acta* **1**, 410 (1947).

⁴ K. LINDNER, *Qualitas Plant. Mater. Vegetabilis* **7**, 289 (1960) und **10**, 221 (1963) nach *Chem. Abstr.* **55**, 8554g (1961) und *Chem. Abstr.* **60**, 4693a (1964).

⁵ F. COHN, *Jahresber. Schles. Ges. vaterländ. Kultur* **37**, 72 (1859) nach HÖLZL am angeführten Orte; J. HÖLZL und E. BANCHER, *Qualitas Plant. Mater. Vegetabilis* **8**, 1 (1961); *Oesterr. Botan. Z.* **105**, 385 (1960); *Die Bodenkultur* **10**, 110 (1959); *Protoplasma* **50**, 297, 303 (1958).

⁶ R. EICKE und E. KÖHLER, *Protoplasma* **18**, 64 (1943); L. REITER, *Protoplasma* **45**, 633 (1956).

Der im Press-Saft enthaltene Protein-Anteil konnte bisher in bis zu 8 Komponenten aufgetrennt werden. Hierbei kamen zur Anwendung: Fällungsverfahren aufgrund unterschiedlichen Verhaltens bei verschiedenen pH-Werten, bei Wärmebehandlung oder in Salzlösungen,^{3, 4, 7, 8} Tiselius- und Papier-Elektrophoresen (Literatur bei⁹) sowie Säulen-Chromatographie mit Austauscher-Cellulosen.¹⁰ Eine erheblich bessere Unterteilung in 15 bis 25 mit Amidoschwarz 10 B färbbare Banden erreichten wir mit der Elektrophorese in einem Gel-Medium, speziell in dem von Raymond¹² bzw. Ornstein und Davis¹³ eingeführten Polyacrylamid; unsere Befunde an verschiedenen Kartoffelsorten sowie an gesunden und viruskranken Knollen werden hier mitgeteilt.

ERGEBNISSE

Bedeutung der Methode zur Sattgewinnung für die Erfassung der Knollenproteine

Gefrier-Press-Saft, gewonnen durch partielles Auftauen tiefgefrorener Knollen und Auspressen unter hohem Druck¹¹ führte stets zu klaren zonenreichen Elektrophoreseanfärbungen. *Rebsaft*, bei dem mit Hilfe einer Fruchtsaft-Zentrifuge 2° kalte Knollen geraspelt und ausgeschleudert wurden, gab ebenso wenig ein klares Pherogramm wie ein *Homogenat* in Puffer pH 8,2 aus dem Starmix. Das Pherogramm hat diffuse Zonen und eine erhebliche Untergrundansfärbung. Diese war durch ein Nachzentrifugieren der Saftkonzentrate in der Ultrazentrifuge (1 Stde. bei 226000 g max) nicht zu beseitigen. Zentrifugierte man zuerst und konzentrierte dann, so blieb auch hier der Einfluss unerheblich.

Einfluss ökologischer Faktoren auf die Press-Saft-Proteine

Ein Einfluss der Provenienz ist nicht zu erkennen. Der Vergleich gesunder Knollen von unserem Feld mit Hochzucht-Saatkartoffeln aus Zuchtbetrieben der Lüneburger Heide und Bayerns (Wachstum 1964) ergab keine Unterschiede der Pherogramme von gleichen Sorten. Bei Kellerlagerung waren innerhalb eines Zeitraums von 3–7 Monaten nach der Ernte nennenswerte Abweichungen der Pherogramme von derselben Charge nicht festzustellen. Doch zeigte sich bei frischen unmittelbar nach der Ernte aufgearbeiteten Knollen eine geringere Intensität der langsam wandernden Zonen, ohne dass das Sorten-charakteristische Muster sehr gestört ist. Der anodische Bereich war meist durch die Zunahme eines diffus färbbaren Anteils und einiger Zonen von dem der Lagerknollen abweichend.

Einfluss genetischer Faktoren auf die Press-Saft-Proteine

Unsere Untersuchungen an 21 Kultursorten ergaben eine eindeutige Abhängigkeit der Amidoschwarz-färbbaren Proteine von der Sorte (Abb. 1, 2 und 5). Hierbei kann es einerseits zu erheblichen Verschiebungen der Intensitäts-Verhältnisse untereinander kommen, es können aber auch zusätzliche Proteinzonen auftreten bzw. fehlen. Einige Zonen wurden mehr oder weniger stark bei allen untersuchten Sorten gefunden und sind für pH 8,2 und

⁷ B. JIRGENSON, *J. Polymer Sci.* **1**, 484 (1946); J. LEWITT, *Plant Physiol.* **26**, 59 (1951); *Physiol. Plantarum* **5**, 470 (1952) nach *Chem. Abstr.* **47**, 5495i; A. NIEMANN, *Z. Physiol. Chem.* **306**, 205 (1957).

⁸ H. CHICK und E. B. SLACK, *Biochem. J.* **45**, 211 (1949).

⁹ V. LOESCHKE und H. STEGEMANN, *Z. Naturforsch.* **21B**, im Druck (1966).

¹⁰ H. STEGEMANN und V. LOESCHKE, *Landw. Forsch.* **14**, 259 (1961).

¹¹ H. STEGEMANN und V. LOESCHKE, *Z. Naturforsch.* **18B**, 195 (1963).

¹² S. RAYMOND und L. WEINTRAUB, *Science* **130**, 711 (1959); S. RAYMOND und YI-JU WANG, *Anal. Biochem.* **1**, 391 (1960); S. RAYMOND, *Clin. Chem.* **8**, 455 (1962).

¹³ L. ORNSTEIN und B. J. DAVIS, *Disc Electrophoresis*, Preprint by Distillation Products Industries (Eastman Kodak Co.), Rochester, N.Y. (1961).

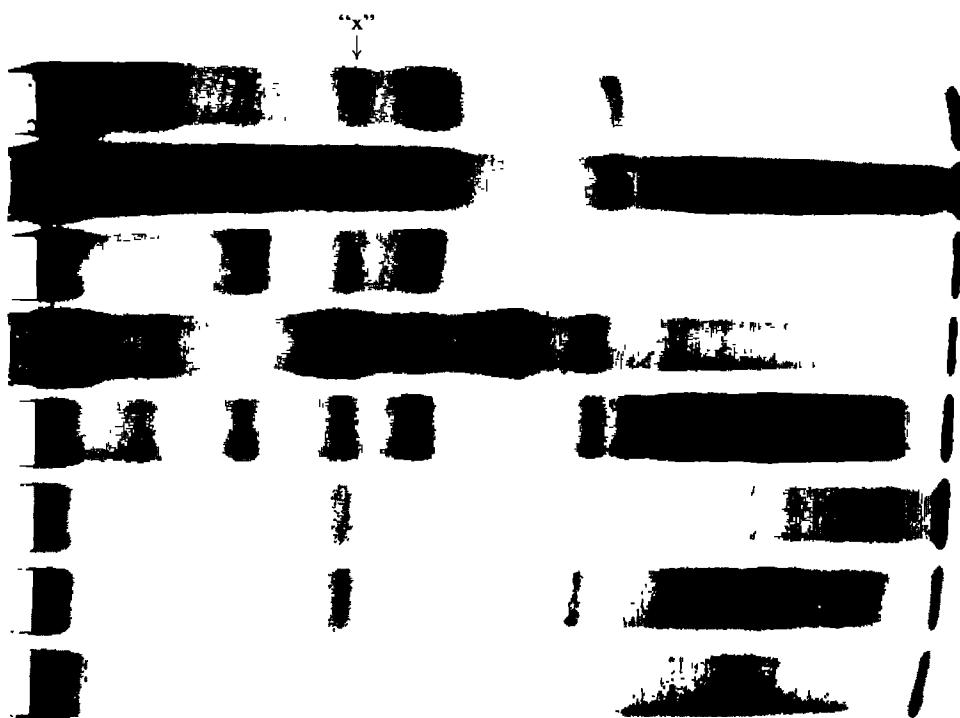


ABB. 1. POLYACRYLAMID-PHEROGRAMM VON KNOLENPROTEINEN VERSCHIEDENER SORten BEI pH 8,2.
Start links: positiver Pol rechts.—Von oben nach unten: 1 Augusta, 2 Erdgold, 3 Merkur, 4 Adelheid,
5 Böhms Mittelfrühe, 6 Rosa, 7 Sieglinde, 8 Ackersegen. Intensitätsvergleich innerhalb einer Sorte
zulässig.

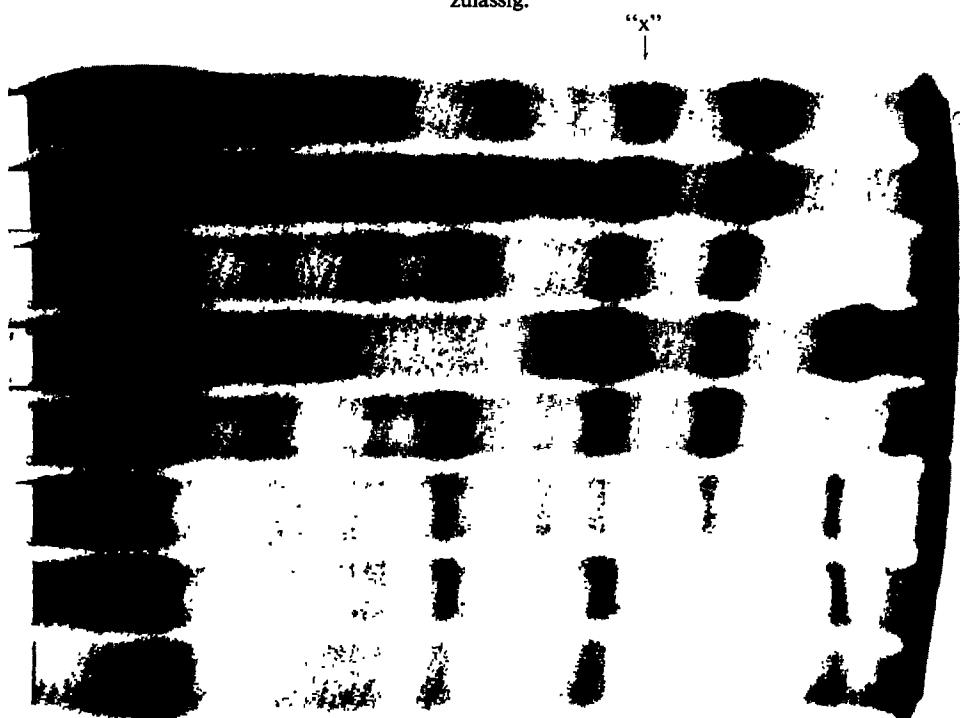


ABB. 2. WIE ABB. 1, JEDOCH BEI pH 8,9.

[facing page 986]

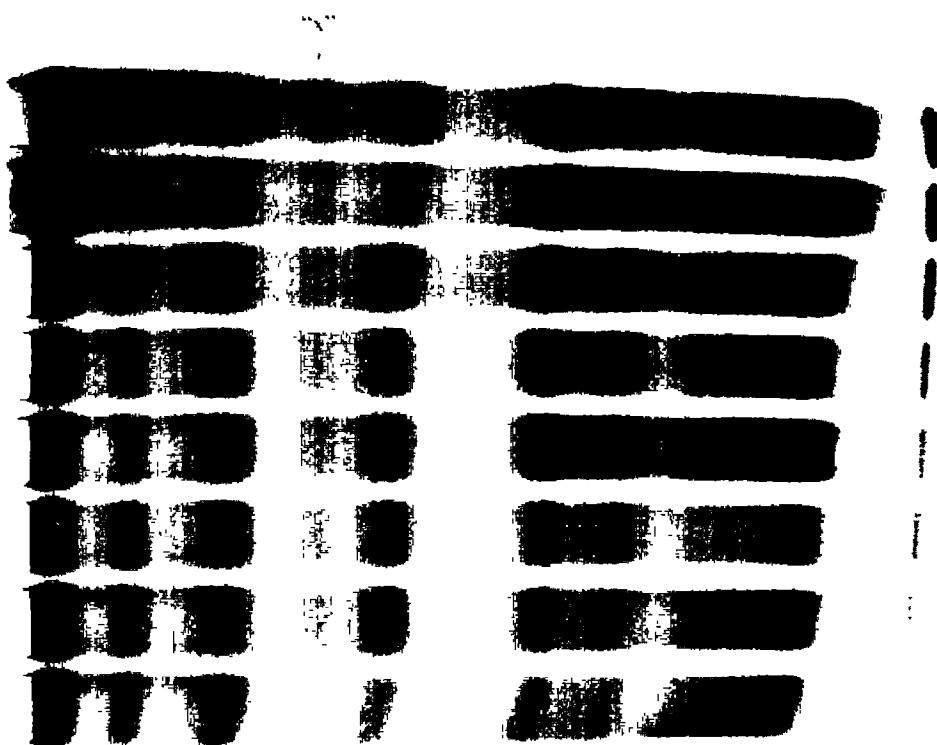


ABB. 3. PHEROGRAMM DER SORTE "BENEDETTA" MIT VERSCHIEDENEN VIROSEN BEI pH 8,2.
Von oben nach unten 1, 2 Blattrollvirus, 3, 4, 5 Mosaikvirus, 6, 7, 8 gesund.



ABB. 4. VERGLEICH VON AUF VERSCHIEDENE WEISE NICHTBAR GEMACHTEN ZONEN IM POLYACRYLAMID-PHEROGRAMM pH 8,2, KARTOFFEL-KNOLLENSAFT (SORGE MAGNA)
Oben: Proteinfarbung mit Amidoschwarz 10 B
Unten Farbreaktion mit Benzidin/H₂O₂ (Peroxydasetest).

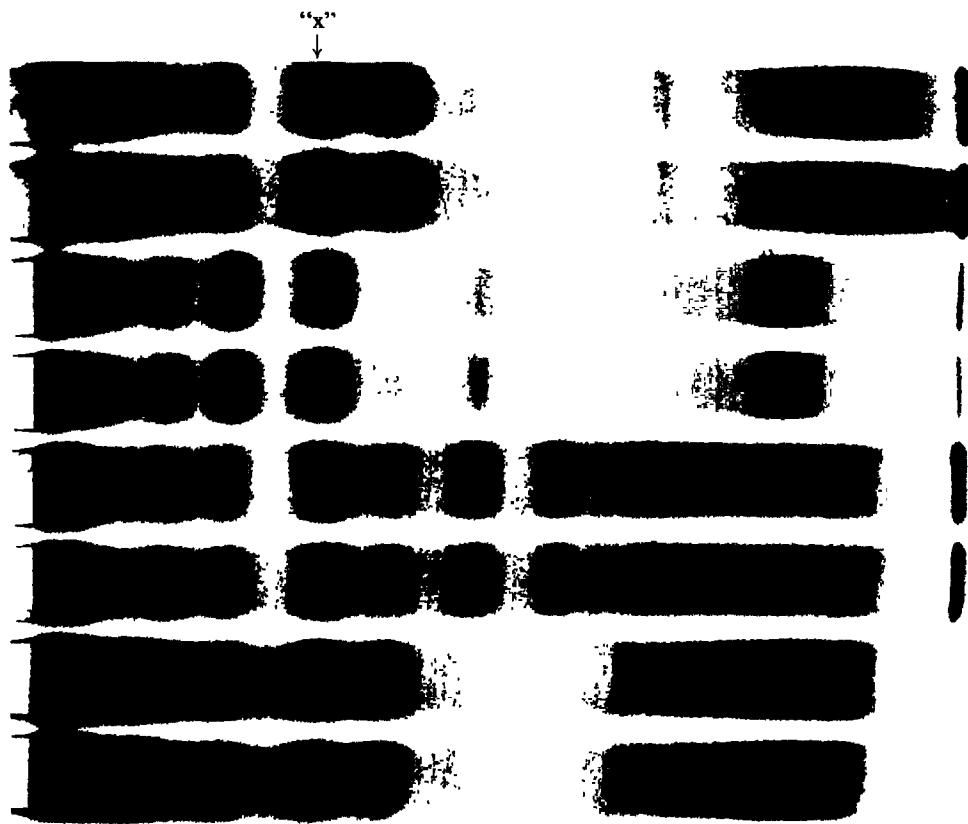


ABB. 5. REPRODUZIERBARKEIT VERSCHIEDENER AUFARBEITUNGEN.

Bedingungen wie Abb. 1. Sorten von oben nach unten: 1, 2 Forelle; 3, 4 Magna; 5, 6 Leona;
7, 8 Lori.

8,9 dargestellt. Eine bei beiden pH-Werten gut auszumessende und einheitliche Bande dient als Bezugspunkt für die Laufstrecke und ist mit "x" markiert. Die Elektrophorese bei pH 8,9 ist zur Beurteilung der startnahen Zonen günstig, während die stärker anodisch laufenden Proteine ungetrennt bleiben und bei pH 8,2 gut aufgeteilt werden. Hier gehen aber bereits einige startnahe Zonen durch kathodischen Lauf verloren.

Die tabellarische Übersicht fasst die Proteine aller Sorten nach der Wanderungsgeschwindigkeit bei pH 8,2 bzw. 8,9 und den visuell geschätzten Intensitäten zusammen (Tabellen 1 u. 2). Es ist bemerkenswert, dass die Abweichungen der relativen Laufstrecken der einzelnen Proteine (bezogen auf das Leitprotein "x") in mehreren Parallelversuchen selten mehr als $\pm 2,5\%$ betragen.

Einfluss von Virosen auf die Press-Saft-Proteine

Der Einfluss einer Viruserkrankung ist bei Mosaik- und Blattroll-Virus kaum zu erkennen (Abb. 3). Bei der Infektion mit dem Y-Virus sieht es bei den Elektrophoresen so aus, als wenn recht regelmäßig die 2. kathodennahe Zone geschwächt, die 3. verstärkt ist.

Vergleich der Lage Amidoschwarz-färbbarer und enzymatisch aktiver Zonen

Am Beispiel der Peroxydase zeigt Abb. 4 die Lage der durch Färbung mit Amidoschwarz 10 B gekennzeichneten Proteinzonen zu denen mit enzymatischer Aktivität. Durch Substratumssetzung (Benzidin/H₂O₂) entstanden wenigstens 10 Farbzonen, die mit den passiv gefärbten Zonen nicht oder eher zufällig übereinstimmen.

DISKUSSION

Die Wirkung verschiedener Faktoren auf den Protein-Haushalt der Kartoffel wird sich nur dann bemerkbar machen, wenn man den Einfluss auf das Einzelprotein oder auf eine Funktionseinheit erkennen kann. Erst unsere zonenreichen Elektrophoresen in PAA schaffen diese Voraussetzung. Wir sind uns bewusst, dass die Methode der Saftgewinnung nicht alle Proteine erfasst, aber im Vergleich zu anderen Verfahren (Saft durch Reiben, Homogenisieren bzw. Extrahieren) gab sie die besten Elektrophoresebilder.

Zunächst ist festzustellen, dass kein Protein die anderen in der Menge so überragt oder auch nur in jeder Sorte besonders bevorzugt auftritt, dass man von dem Tuberin, dem Tuberinin oder ähnlichem sprechen könnte.

Da in letzter Zeit in Zusammenhang mit Arbeiten über die Feinstruktur von Geweben als auch über die Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen des öfteren Beobachtungen über einen Einfluss durch Gefrieren und Tauen gemacht wurden,¹⁴ überzeugten wir uns davon, dass wiederholtes Einfrieren bei -20° oder -55° ohne Einfluss auf unsere Proteinzenen blieb.

Bevor wir auf Zahl, Lage und Intensität der Zonen näher eingehen, sollte man sich erinnern, dass bei einer Gel-Elektrophorese sowohl die Ladung als auch die Grösse des Moleküls eine Rolle spielen. Es könnte daher im Gegensatz zur Tiselius- oder Papier-Elektrophorese ein Protein, das im Gemisch mit Di- und Oligomeren vorliegt,¹⁵ in mehrere Zonen aufgetrennt werden, und auch verschiedene Proteine aber mit gleicher Ladung müssten an getrennten Stellen im Pherogramm erscheinen. Durch Veränderung des pH-Wertes und der Porengrösse

¹⁴ Vergleiche Sonderheft *Cryobiology, Federation Proc.* 24, No. 2, Part III (1965), speziell S. 55, 66, 259, 269.
¹⁵ F. J. REITHEL, *Adv. Protein Chem.* 18, 123 (1963).

des Gels besteht die Möglichkeit, diese Einflüsse abzugrenzen.¹⁶ Daher ist es voreilich, bei den im Saft erreichbaren Konzentrationen von beispielsweise 20 Amidoschwarz-färbbaren Proteinen in der Knolle zu sprechen.

Es ist auch unwahrscheinlich, dass eine Anzahl von Banden lediglich Polymere eines Grundproteins sind, denn die Oligomerenbildung dürfte nicht so sortenabhängig sein. Die Fingerprint-Technik an isolierten Proteinen wird diese Frage klären.

Beim Intensitätsvergleich der Zonen ist zu beachten, dass die Farbstärke kein absolutes Mass der Proteinmengen ist. Die Färbbarkeit kann von Protein zu Protein verschieden sein.

TABELLE I. WANDERUNG UND MENGE DER PROTEINE AUS KARTOFFELKNOLLEN VON 21 SORTEN IN 5%IGEM POLYACRYLAMID-GEL, BEZOGEN AUF EIN LEITPROTEIN "X" (SIEHE TEXT)

| Hauptlinien | "X" | | | | | | |
|--------------|-----|----|----|----|----|----|----|
| | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 |
| <i>Sorte</i> | | | | | | | |
| Ackersegen | ■ | ■ | ■ | □ | ■ | ■ | ■ |
| Adelheid | ■ | □ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Apta | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Aquila | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Augusta | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Benedetta | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Böhms Mfr. | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Erdgold | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Erdmannna | □ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Forelle | □ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Lerche | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Leona | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Lori | □ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Magna | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Maritta | ■ | ■ | ■ | □ | ■ | ■ | ■ |
| Merkur | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Robusta | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Rosa | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Sieglinde | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Vertufolia | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Voran | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |

Mittelwerte aus 3 oder mehr Aufarbeitungen. Bezeichnung der Intensität der amidoschwarzgefärbten Banden: ■ = stark; □ = normal; □ = wenig.

Markierung der häufiger auftretenden Banden am Kopf der Tabelle. Lauf bei pH 8.2.

denn sie wird bestimmt durch die Adsorptionsisotherme und zum Teil durch die Art der Denaturierung des Proteins im Gel. Quantitative Aussagen werden noch erarbeitet, für die qualitative Abschätzung genügen gleichbleibende Färbe- und Entfärbefindungen.

Für die Trennung in der senkrechten Anordnung erwiesen sich die pH-Werte 8.2 und 8.9 als besonders günstig, da bei ersterem keine Proteine in der Front wandern und bei 8.9 nur 2 (durch waagerechte Elektrophorese oder durch Umpolen bei der senkrechten Anordnung erkennbare) Proteine in der kathodischen Richtung im Pufferreservoir verloren gehen.

¹⁶ ST. HJERTÉN, *J. Chromatogr.*, **11**, 66 (1963); S. RAYMOND und M. NAKAMICHI, *Inhal. Biochem.*, **7**, 225 (1964); M. SOGAMI und J. F. FOSLER, *J. Biol. Chem.*, **237**, 2514 (1962).

Bei pH 8,2 einheitlich erscheinende Banden spalten bei pH 8,9 auf, umgekehrt ist das nur bei wenigen Nebenbanden zu beobachten.

Die in den 21 Sorten vorkommenden Hauptbanden sind in Tabelle 1 und 2 für pH 8,2 und 8,9 dargestellt und ihre gegenseitigen Beziehungen gekennzeichnet. Die mit "x" markierte Zone ist das in allen Sorten gefundene und als Bezugsgröße gewählte Protein; es ist auch auf den anderen Abbildungen durch "x" angedeutet. Am Kopf der Tabellen befindet sich ein generelles Schema für die Knollenproteine. Wenn auch Lagerung und Färbeverfahren eine gewisse Unsicherheit in der Beurteilung der Proteinmenge bedingen, so ist die Konstanz im Intensitätsverhältnis der Komponenten zueinander bei Lagerung im Zeitraum von 3 bis 7 Monaten nach der Ernte beachtlich und erlaubt zusammen mit dem Zonenmuster eine Sortendiagnose.

TABELLE 2

| Hauptlinien | ○ | □□ | □ | □ | □□ | □ | ■ | □ | □ |
|--------------|---|----|---|---|----|---|---|---|---|
| <i>Sorte</i> | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| Ackersegen | ■ | □ | ■ | □ | ■ | ■ | ■ | □ | ■ |
| Adelheid | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Apta | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | □ | ■ |
| Aquila | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Augusta | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | □ | ■ |
| Benedetta | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Böhms Mfr. | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Erdgold | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Erdmannia | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Forelle | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Lerche | □ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Leona | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | □ | ■ |
| Lori | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Magna | □ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Maritta | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | □ | ■ |
| Merkur | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Robusta | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Rosa | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Sieglinde | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | □ | ■ |
| Vertifolia | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Voran | □ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |

Wie Tabelle 1, Lauf bei pH 8,9.

Dieser Einfluss genetischer Faktoren ist besonders eindrucksvoll. Die Sortenverschiedenheit kann sich nicht nur in erheblichen Intensitätsverschiebungen (vergl. Abb. 1, 2 und 5) auswirken, sondern es können auch Proteinzonen ausfallen oder auftauchen, was wir nicht im einzelnen dargestellt haben. Solange noch keine Versuche nach genetischen Gesichtspunkten und vor allem keine Proteinmuster der eingekreuzten Wildrassen vorliegen, sind Aussagen z. B. über Verlustmutanten u. ä. nicht möglich.

Bei den dargestellten Zonen handelt es sich aber nur um die Hauptkomponenten. Denn zu diesen bis zu 25 mit Amidoschwarzfärbung erfassten Proteinen kommen noch solche geringerer Konzentration hinzu, was aus weiteren in Enzymtesten auftretenden Farbzonen hervorgeht. Das Beispiel der Zonen im Peroxydase-Test (Abb. 4) beweist, dass die zahlreichen enzymatisch aktiven Komponenten nicht mit den färbbaren Proteinen identisch zu sein

brauchen. Ob der Peroxydase-Test hier nur auf Enzyme anspricht, muss durch Extraktion noch geklärt werden. Eine Gegenprobe bei menschlichem Serum zeigte nur das übliche Bild.⁹ Bei anderen pflanzlichen Objekten wurden ebenfalls mehrere peroxydatisch aktive Komponenten beschrieben.

Pherogramme gleicher Sorten jedoch verschiedener Anbaugebiete waren nicht zu unterscheiden, das ist eine bemerkenswerte Unabhängigkeit von der Provenienz und damit von einigen oekologischen Faktoren. Einflüsse der Düngung auf den Stickstoff- und den Gesamtprotein-Gehalt sind jedoch zur Genüge bekannt.¹⁷ Es wäre daher zweifellos interessant, anhand der Pherogramme von Knollen einseitig oder extrem gedüngter Pflanzen zu untersuchen, ob nur die Gesamtmenge oder die Relation der Proteine untereinander verändert wird.

Frisch geerntete Knollen weisen ein weniger klares Proteinmuster auf. Vor allem im anodischen Teil sind die Zonen von einer diffusen Amidoschwarzansfärbung überlagert, einzelne Zonen öfter auch verstärkt. Offenbar handelt es sich um saure Proteine, und es wird vermutet, dass die Umbauprozesse im Zusammenhang mit der Assimilateleitung noch nicht zur Ruhe gekommen sind. In älteren Knollen waren dagegen kathodennahe Zonen etwas verstärkt. Über eine Abhängigkeit des unter bestimmten Bedingungen fällbaren Anteils der Knollensaft-Proteine von der Lagerung siehe.⁸ —Bei einigen pflanzlichen Viren wurde die Bildung anormaler Proteine als Folge der Infektion beobachtet.¹⁸ Außerdem ist bei Kartoffelknollen vor allem durch Blattrollvirus ein erhöhter Eiweissgehalt der Knolle bekannt.^{19, 20} Wir hatten daher ein besonderes Interesse an der Frage, ob sich Störungen im Proteinmuster, etwa durch Auftreten neuer Zonen oder in bevorzugter Anreicherung einzelner Proteine feststellen lassen. Ein besonders auffallender oder gar diagnostisch brauchbarer Effekt war jedoch nicht zu erkennen (Abb. 3). Intensitätssteigerungen waren, wenn überhaupt, dann bei vielen Zonen und vor allem im kathodischen und anodischen Bereich erkennbar (Blattroll und Mosaik). Häufiger war bei Y-Virus-kranken ein Intensitätswechsel von 2 startnahen Zonen. Es kam uns in erster Linie darauf an zu erfahren, ob überhaupt drastische Folgen von Viren im Pherogramm der Saftproteine auftreten. Die mit der Verwendung von Material, das nur anhand von Krankheitssymptomen gewonnen wurde, verbundene grosse Unsicherheit einer eindeutigen Virusdiagnose²¹ sowie die Unmöglichkeit, Misinfektionen auszuschliessen, blieb für uns deshalb ohne Belang. Die sehr umständliche eindeutige Charakterisierung^{21, 22} des verwendeten Materials wäre erst bei einem positiveren Befund notwendig geworden.

Erfolgversprechender sind enzymatische Untersuchungen, da hier vielfältige Beobachtungen durch Messung der Gesamtaktivitäten vorliegen.¹ Der mögliche Einfluss der Viren auf die Enzymogramme wird noch bearbeitet. Nach²³ sollte man im Enzymsystem der Pflanze Unterschiede gegenüber gesunden erkennen, was für einzelne Fermente bereits beobachtet und zusammenfassend bei¹⁹ diskutiert wurde.

¹⁷ F. LÜDDECKE und W. BORCHMANN, in *Die Kartoffel* (Herausgegeben von R. SCHICK und M. KLINKOWSKI), Bd. I, S. 683. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin (1961).

¹⁸ C. A. PORTER, *Virology*, 6, 75 (1959).

¹⁹ T. O. DIENER, *Ann. Rev. Phytopathol.*, 1, 197 (1963).

²⁰ E. F. TOPECHA, *Chem. Abstr.* 34, 4417 (1940); CH. W. MCANCELLY, M. G. PAYNE und J. L. FULTS, *Am. Potato J.* 33, 134 (1956); O. HENKE, *Zentr. Bakteriol.* II 110, 361 (1957).

²¹ M. KLINKOWSKI und H. KEGLER in *Die Kartoffel* (Herausgegeben von R. SCHICK und M. KLINKOWSKI), Bd. II, S. 1025. VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin (1962).

²² E. KÖHLER, *Allgemeine Viruspathologie der Pflanzen*, S. 117. Parey-Verlag, Berlin (1964).

²³ B. A. RUBIN und YE. V. ARTSIKHOVSKAYA, *Biochemistry and Physiology of Plant Immunity*, S. 150. Pergamon Press, Oxford (1963).

METHODIK

Material

Kartoffelknollen der Ernten 1964 und 1965; Hochzucht-Saatkartoffeln aus der Lüneburger Heide, aus Bayern und Nachzuchten von unserem Versuchsfeld in Hann.Münden. Selektion des viruskranken Materials nach Blattsymptomen durch wiederholte Feldbegehungen und durch mehrjährige Kontrolle im Nachbau.

Staudenweise Ernte der mit kolorierten Tonkinsplit-Stäben markierten Pflanzen, Aufbewahrung der Knollen in gelochten Polyäthylen-Beuteln bei +2 bis +8° im Keller.

Saftgewinnung

Gewaschene Knollen wurden ~24 Stdn. bei -18° durchgefroren, partiell aufgetaut und mit einer hydraulischen Presse entsaftet¹¹ (Tinkturenpresse von Mohr, Karlsruhe oder Hochdruckpresse URE 150 von Lauffer und Butscher, Mühlen bei Horb). 230 g ergaben z. B. 150 ml Saft = 65% (Sorte Magna; Dezember). Schon beim Auslaufen wurde der Saft mit einer neutralisierten 20%igen Natriumbisulfatlösung versetzt (0,1 ml pro 10 ml Saft entspr. 0,2% Sulfit) und nach guter Durchmischung von Vor-, Haupt- und Nachlauf 30 Min. bei 4° und 15000 g zentrifugiert (Eispirouette, Phywe AG, Göttingen). 10 ml des gelblichen Überstandes wurden entweder durch Gelfiltration mit einer Sephadex-G 25 med.-Säule 40 × 1,5 cm in hoch- und niedermolekulare Stoffe aufgetrennt (Einzelheiten siehe^{9,11}) und die Proteinfraktion anschliessend konzentriert. Das Einengen erfolgte im Dialysierschlauch gegen Polyäthylen-Glykol MG 20000 (Carbowax), wobei ein zu weitgehendes Trocknen wegen Krustenbildung zu vermeiden ist. Oder wir konzentrierten das Zentrifugat direkt und dialysierten anschliessend gegen den Elektrophoresepuffer.

Gelelektrophorese

Vertikalmethode nach Raymond¹² in der EC 470-Apparatur (E.C. Apparatus Corp., Philadelphia). Kontrolle kathodisch auswandernder Komponenten durch Lauf nach Umpolung oder in der waagerechten Anordnung nach.²⁴ Das Acrylamid (als Cyanogum 41 gebrauchsfertig versetzt mit 5% N,N'-Methylen-bis-acrylamid) wurde 5%ig in Puffer gelöst und in üblicher Weise mit Ammoniumpersulfat und Dimethylaminopropionitril als Katalysator polymerisiert.

Pufferlösung pH 8,2 (8,9): 30,25 (30,25) g TRIS; 3,9 (3,9) g EDTA-Na; 18,6 (2,3) g Borsäure für 1 Liter Stammlösung; zum Gebrauch mit 5 Vol. Teilen Wasser verdünnt. Die pH-Werte beziehen sich auf die mit der Glaselektrode eingestellte Stammlösung. Beschickung der 1 cm-Tröge der Apparatur mit 0,1 ml Proteinkonzentrat; Start mit 550 V/150 mA. Anfärbung mit Amidoschwarz 10 B.

Ausführlichere Beschreibung der Elektrophorese und methodische Varianten sowie die Dokumentation der gefärbten Gele vergl.⁹

Anerkennungen—Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Bad Godesberg) und Herrn Prof. Dr. Welte (Kalichemie, Hannover) für ihre Unterstützung, Fräulein H. Francksen für ihre interessierte, geschickte und selbständige Mitarbeit.

²⁴ H. STEGEMANN, R. HILLEBRECHT und W. RIEN, *Z. Physiol. Chem.* 340, 11 (1965).