

können, daß die simultanen Konfidenzintervalle mehr den Problemen der Forschung vorbehalten sind, STUDENTS *t* mehr der Qualitätskontrolle, die die routinemäßigen Sortenversuche ja darstellen, doch lassen sich hier natürlich keine festen Grenzen setzen. Es ist unbedingt nötig, sich stets die Frage nach der Behauptungsverbindung vorzulegen.

#### Literatur

1. BEHRENS, W. U.: Der Durchschnitt der Prüfmittelwerte als Bezugsgröße. *Z. Acker- und Pflanzenbau* 99, 397—402 (1955). — 2. BEHRENS, W. U.: Die Gültigkeit des *t*-Testes. *Z. Pflanzenzüchtung* 36, 214—227 (1956). — 3. DUNNETT, W. und M. SOBEL: A bivariate generalization of STUDENT'S *t*-distribution, with tables for certain special cases. *Biometrika* 41, 153—169 (1954). — 4. IHM,

P.: Ein Konfidenzbereich für den Erwartungswert eines Mittelwertepaares. *Z. ind. Abst. u. Vererbungsl.* 86, 54—60 (1954). — 5. IHM, P.: Anwendung von HOTELINGS verallgemeinertem *T*-Test zur Prüfung der Differenz zweier Mittelwertepaare. *Z. ind. Abst. u. Vererbungsl.* 86, 143—156 (1954). — 6. IHM, P.: Eine exakte Methode als Ersatz für die Varianzanalyse in bestimmten Fällen. *Züchter* 25, 365—368 (1955). — 7. MAY, J. M.: Extended and corrected tables of the upper percentage points of the 'Studentised' range. *Biometrika* 39, 192—194 (1952). — 8. PEARSON, E. S. und H. O. HARTLEY: *Biometrika Tables for Statisticians*. Band I, Cambridge University Press, London, 1954. — 9. PRIGGE, R.: Die Anwendung der „Mutungsbereiche“ in der Immunitätsforschung. *Arb. a. d. Paul-Ehrlich-Inst. usw.* 51, 29—44 (1954). — 10. STEIN, CH.: A two-sample test for a linear hypothesis whose power is independent of the variance. *Ann. Math. Statist.* 16, 243—258 (1945).

## Untersuchungen zur Frage der Immunität des Kartoffel-, U.S.D.A. Seedling 41956<sup>1</sup> gegen das X-Virus

Von ERICH KÖHLER (Braunschweig)

Mit 1 Textabbildung

### 1. Einleitung

Der amerikanische „Sämling“ U.S.D.A. 41956 (Klon) ist dafür bekannt, daß er sich unter natürlichen Infektionsbedingungen keine Infektionen mit dem Kartoffel-X-Virus zuzieht (SCHULTZ u. a., 1934). Man bezeichnet ihn deshalb als X-immun. Die Frage, ob sich das Virus nicht doch, wenn auch vielleicht nur kurzfristig und unter Beschränkung auf den Infektionsherd in ihm vermehren kann, ist umstritten. Wenn dies zuträfe, so würde keine eigentliche Immunität vorliegen, sondern ein extremer Grad von Abwehrresistenz; denn als immun gegen ein bestimmtes Virus können wir nur solche Formen bezeichnen, in denen dieses Virus nicht reproduktionsfähig ist. Zuletzt haben wohl HUTTON u. WARK (1952) aus ihren Infektionsversuchen an dem gleichfalls X-immunen Kreuzungsabkömmling „11/84“ des genannten Sämlings gefolgert, daß keine absolute Immunität vorliegen könne. Sie rieben Blätter dieser Sorte mit X-Virus ein und verimpften den Preßsaft aus solchen Blättern am 2., 5., 7., 9., 12. usw. bis zum 28. Tage post infectionem auf *Gomphrena globosa* als Indikator. Sie erhielten dabei am 2. und 5. Tag p. i. durchschnittlich 3,8 bzw. 0,2 Einzelherde an den Blättern der Testpflanze, keine mehr jedoch am 7. Tage oder später. Dadurch soll die anfängliche Vermehrung des Virus bewiesen sein. Wenn später kein Virus mehr nachweisbar war, so sei dies auf eine inaktivierende Gegenwirkung des Wirtes zurückzuführen.

Daß sich das X-Virus durch den Sämling 41956 in basaler Richtung hindurchleiten läßt, wenn man ihn als Zwischenpfropfling zwischen anfälligen Sorten verwendet, ist bekannt (CLINCH 1942). Daraus geht hervor daß die in den Leitbahnen des Zwischenpfropflings anzunehmenden inaktivierenden Gegenkräfte — falls solche wirksam sind — nicht ausreichen würden, um das Virus im Laufe seiner passiven Verfrachtung im Zwischenpfropfling seiner Aktivität völlig zu berauben. CLINCH kommt auf Grund ihrer Pfropfversuche zu der Folgerung, daß sich das Virus in 41956 nicht vermehrt.

In den Berichten der Scottish Plant breeding Station (1952) wird mitgeteilt, daß an Blättern der

Achselfrosse von als Pfropfunterlage dienenden immunen Sämlingen, denen X-infizierte Reiser aufgepfropft waren, kleine nekrotische Flecke auftraten. Zu einer systemischen nekrotischen Erkrankung kam es jedoch in keinem Fall, und auch die Knollen der Unterlage enthielten kein Virus. Das Erscheinen der nekrotischen Flecke läßt sich nach unserem Dafürhalten wohl am besten wie folgt deuten: Das X-Virus ist aus dem Reis in die Blätter (vermutlich noch in die Blattanlagen) der Achselfrosse der Unterlage vorgedrungen und hat dort lokale Überempfindlichkeitsreaktionen ausgelöst. Damit wäre aber nicht bewiesen, daß sich das Virus an diesen oder anderen Stellen der Unterlage selbst vermehrt hat, denn schon geringe Mengen des aus dem Reis herangeführten Virus könnten unter bestimmten Voraussetzungen zur Auslösung einer Empfindlichkeitsreaktion mit Fleckenbildung genügen. 41956 könnte also gegen X immun und außerdem noch überempfindlich sein.<sup>1</sup>

### 2. Eigene Untersuchungen

In einem Versuch (21. 6. 55) wurden 40 Blattfiedern mehrerer 41956-Pflanzen unter Verwendung von Karborundpuder mit dem X-Virus (Stamm H19) eingerieben und sofort unter der Wasserleitung abgespült. Sodann wurden sie in fünf Gruppen zu je 8 in feuchte Petrischalen gelegt. Die Schalen von Gruppe 1 (Nullzeit) kamen gleich anschließend in den Kühlraum (2° C), um die Virusvermehrung zu unterbinden. Die Schalen der übrigen Gruppen wurden zunächst in einem Raum mit Dauerlicht bei 22° aufgestellt, um dem Virus günstige Vermehrungsbedingungen zu bieten. Auch diese Gruppen kamen später in den Kühlraum und zwar Gruppe 2 nach 24 Std., Gruppe 3 nach zwei, Gruppe 4 nach vier und Gruppe 5 nach acht Tagen. Am 9. Tag p. i. wurden alle Proben 1/2 Min. in 1 %iger Kalilauge umgeschwenkt und anschließend in Wasser abgespült, um alles äußerlich anhaftende Virus zu entfernen. Von den Fiedern jeder Gruppe wurden alsdann

<sup>1</sup> Da 41956 durchweg mit dem S-Virus behaftet zu sein scheint, könnten die nekrotischen Flecke auch unter dessen Einwirkung zustande gekommen sein.

Sammelpreßsäfte hergestellt. Diese wurden 1:1 mit Wasser verdünnt und zum Testen auf je 8 Blätter von *Gomphrena globosa* verimpft.

Ergebnis: Nur bei den Verimpfungen der Gruppen 2 und 3 traten Einzelherde auf und zwar bei jeder Gruppe nur einer. Danach waren spätestens 4 Tage p. i. noch geringe Mengen Virus in den Blättern nachzuweisen. Im übrigen sind aber die Unterschiede zwischen den Tageswerten nicht signifikant.

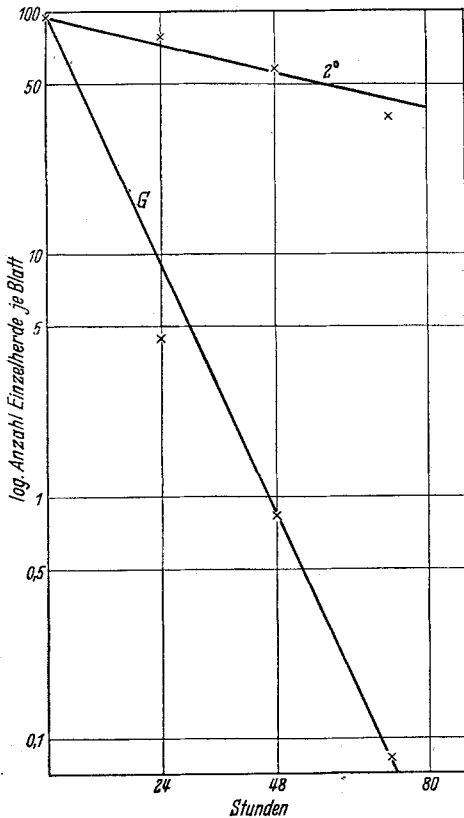


Abb. 1

Zu einem weiteren Versuch (11. 9. 56) wurde der X-Stamm M 23 (grob gereinigter, unverdünnter Saft von Samsuntabak) auf die Blätter von 4 erwachsenen Pflanzen 41956 unter Anwendung von Karborundpuder mit dem Glasspatel möglichst gleichmäßig verimpft. Von dem gesamten Blattmaterial von jeder der 4 Pflanzen sollten später zwei vergleichbare Säfte hergestellt werden, indem jeweils die rechten und die linken Blatthälften (ohne die Rippen und Stiele) zu Sammelsäften vereinigt wurden. Aus Pflanze 1 wurden die Saftpaare unmittelbar nach der Impfung hergestellt und anschließend mit Karborund auf je 12 Blattpaare von *Gomphrena globosa* zum Testen verimpft. Von dem geimpften Blattmaterial der übrigen 3 Pflanzen wurden die Hälften verschieden behandelt: die einen Hälften wurden an der Pflanze belassen, die anderen in Schalen bei 2° C im Kälteraum aufbewahrt. Zu den Terminen (24, 48 und 72 Std. p. i.) wurden jedesmal die beiderlei Hälften getrennt zu Sammelsäften verarbeitet und wie beim ersten Termin vergleichend auf *Gomphrena*-Blattpaare (a-Blätter: 2°, b-Blätter: Gewächshaus) verimpft.

Das Ergebnis der Testung ist aus Tab. 1 ersichtlich. Bei Übertragung in ein Koordinatensystem mit logarithmisch geteilter Ordinate erhält man obenstehendes Diagramm (Abb. 1). Die beiderlei Werte gruppieren sich um zwei absteigende Gerade, wie man sie

auch bei Inaktivierungsversuchen in vitro erhält (u. a. LAUFFER u. PRICE, 1940). Die Infektiosität der Säfte nimmt also bei beiden Behandlungsarten stetig ab, woraus zu schließen ist, daß das Virus im Blatt inaktiviert wird. An der Gewächshauspflanze geht die Inaktivierung schneller, sie erreicht ihr Ende schon nach etwa 70 Std., während das Virus in den Kühlraumblättern zur gleichen Zeit erst zu 60 % inaktiviert ist und seine vollständige Inaktivierung etwa 21 Tage er-

Tabelle 1. Anzahl Einzelherde nach Verimpfung der Saftproben auf je 12 Blattpaare von *Gomphrena globosa*. Verimpfung an aufeinanderfolgenden Tagen.

Blattpaare Nr.	0 Std.		24 Std.		48 Std.		72 Std.	
	a-Blätter	b-Blätter	a-Blätter 2°	b-Blätter Gew.-H.	a-Blätter 2°	b-Blätter Gew.-H.	a-Blätter 2°	b-Blätter Gew.-H.
1	85	117	69	4	59	0	38	0
2	27	33	70	3	75	1	37	0
3	83	109	40	2	43	1	38	0
4	82	140	62	4	53	2	63	1
5	42	63	52	4	28	0	30	0
6	125	122	124	7	? <sup>1</sup>	0	12	0
7	120	127	57	1	69	2	16	0
8	117	126	87	4	35	0	64	0
9	125	52	144	10	42	3	41	0
10	84	74	83	1	19	0	14	0
11	86	85	51	8	21	0	25	0
12	130	157	110	6	76	1	61	0
Summen: je Blatt	1106	1205	949	54	520	10	439	1
	92,2	100,4	79,1	4,5	57,8	0,83	36,6	0,084
	Mittelwert = 96,5							

<sup>1</sup> Zählung unsicher

fordert. Entscheidend für die Schnelligkeit der Inaktivierung ist offenbar die Temperatur. Von einer, wenn auch vorübergehenden, Viruszunahme ist nicht das geringste Anzeichen vorhanden.

In einem anderen Versuch (12. 3. 53) wurden Spitzenfiedern des Sämlings 41956 und des *Solanum demissum*-Bastards „A6“ mit demselben X-Saft ohne Verwendung von Karborund durch Einreiben geimpft. Es sollte der Verlauf der Infektiosität in einer immunen und einer anfälligen Sorte verglichen werden. Entsprechende Sammelsäfte wurden nach 0, 24, 48 und 72 Std. auf Blätter von *Nicotiana rustica* als Testpflanze mit folgendem Ergebnis verimpft (Tab. 2):

Tabelle 2. Anzahl Einzelherde je Blatt (Mittelwerte).

Nach Stunden	Säfte von 41956	Säfte von A6
0	6,8	2,5
24	0	0,83
48	0	3,0
72	0	9,0

Demnach zeigt die Infektiosität der beiderlei Säfte einen sehr unterschiedlichen Verlauf. Trotz einer relativ hohen Anfangsinfektiosität ist bei 41956 schon nach 24 Std. kein Virus mehr nachzuweisen. Auf „A6“ dagegen ist noch nach 24 Std. etwas Virus nachweisbar; darauf folgt ein Anstieg, wie er der Infektiositätskurve auf einem anfälligen Wirt entspricht, und der anzeigt, daß die Viruszunahme spätestens 24 Std. p. i. begonnen hat. Auf beiden Wirten kommt es also anfangs zu einer Inaktivierung. Die im ganzen relativ niedrigen Werte

sind darauf zurückzuführen, daß die Blätter vor dem Auspressen 5 Min. in Wasser gebadet wurden, was wie sich inzwischen gezeigt hat (u. a. DALE u. THORNBERRY 1956), nicht empfehlenswert ist.

Im folgenden Versuch wurde zur Kontrolle noch die Frage geprüft, ob der Blattsaft von 41956 infektiöshemmend wirkt. Wenn dem so wäre, so wären die erhaltenen Infektionswerte kein brauchbarer Maßstab des relativen Gehalts der Säfte an aktivem Virus:

Gleiche Mengen eines X-Impfsaftes (von groben Beimengungen befreiter Rohsaft aus Samsuntabak) wurden in einen Fall mit unterschiedlichen Mengen eines Blattsaftes aus 41956, im anderen mit ebensolchen Mengen eines Blattsaftes aus Samsuntabak (gesund) gemischt. Die Mischungsverhältnisse waren

1 Teil Impfsaft : 1 Teil Blattsaft  
1 Teil Impfsaft : 5 Teilen Blattsaft  
1 Teil Impfsaft : 10 Teilen Blattsaft.

Die einzelnen Gemische wurden durch Verimpfung auf die beiden Blätter von 16 Blattpaaren von *Gomphrena* nebeneinander vergleichbar getestet. Ergebnis auf Tabelle 3.

Tabelle 3. Anzahl Einzelherde je Blatt (Mittelwerte).

Blattsäfte aus	Mischungsverhältnis		
	1:1	1:5	1:10
41956	36,9	23,5	15,4
Samsuntabak	36,9	21,8	15,2

Demnach hatten die beiden Blattsäfte keine unterschiedliche Wirkung auf den Infektionserfolg; die geringen Abweichungen bei 1:5 und 1:10 sind nicht

signifikant. Da der Saft des Samsuntabaks keine infektiöshemmende Wirkung hat (KÖHLER, unveröff.), ist dies auch von dem 41956-Saft anzunehmen.

### 3. Zusammenfassung

Nach den mitgeteilten Untersuchungsergebnissen ist es höchst unwahrscheinlich, daß sich das X-Virus in den Blättern des immunen U.S.-Sämlings 41956, wenn auch nur zeitweise, vermehrt. Auf die Blätter verimpft verlor es seine Infektiosität in der Gewächshauspflanze sehr rasch (in etwa 72 Std.), im Kühlraum bei 2° C dagegen sehr langsam (in etwa 21 Tagen). In anderen Versuchen war das Virus an der Gewächshauspflanze noch 4 bis 5 Tage p. i. in geringer Menge nachweisbar. Die Unterschiede im Inaktivierungstempo sind vermutlich temperaturbedingt.

Der Blattsaft aus 41956 hat keine infektiöshemmende Wirkung bei Verimpfung zu *Gomphrena globosa*.

Die Frage, ob der Infektiositätsverlust in den Blättern von 41956 einer anderen Gesetzmäßigkeit folgt als in denen anderer Arten und Sorten, in denen das Virus nicht vermehrungsfähig ist, bleibt noch zu prüfen.

### Literatur

1. CLINCH, P. E. M.: Observations on a severe strain of potato virus X. *Sci. Proceed. Roy. Dublin Soc.* **23**, 273—299 (1944). — 2. HUTTON, E. M. u. WARK, D. C.: A relationship between immunity and localized reaction to virus X in the potato. *Austral. J. Sci. Res. — Ser. B.* **5**, 237—243 (1952). — 3. LAUFFER, M. A. u. PRICE, W. C.: Thermal denaturation of tobacco mosaic virus. *Journ. Biol. Chemistry* **133**, 1—15 (1940). — 4. SCHULTZ, E. S., CLARK, C. F., BONDE, R., RALEIGH, R. P. u. STEVENSON, F. J.: Resistance of potato to mosaic and other virus diseases. *Phytopath.* **24**, 116—132, 1934. — 5. Scottish Plant breeding Station. (1953) *Ann. Report*, Edinburgh.

(Aus dem Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität Göttingen)

## Eine vereinfachte Methode zur Prüfung von Steinklee-Individuen auf Cumarin

Von ALEXANDER MICKÉ

Mit 2 Textabbildungen

Erfolgreiche Mutationszüchtung hängt sehr wesentlich von dem Vorhandensein geeigneter Methoden zur Auslese der gesuchten Formen ab. Dies gilt insbesondere bei der Züchtung auf qualitative Leistungseigenschaften. Hierbei kommt es einerseits darauf an, zunächst mit Hilfe einer einfachen Serienmethode innerhalb kurzer Zeit ein umfangreiches Pflanzenmaterial zu testen, zum anderen dann durch eine zuverlässige Nachuntersuchung ein einwandfreies Zahlenmaterial für die ausgelesenen Individuen zu gewinnen.

Bei der Züchtung eines bitterstofffreien Steinklees sind zur genauen quantitativen Analyse verschiedene chemische und colorimetrische Methoden in Gebrauch (2), (3), (6), (7), (8), (12). Da sie in vieler Hinsicht nicht befriedigen, sind Arbeiten zu ihrer Verbesserung im Gange (1). Als Methode zur Massenauslese cumarinarmer Formen hat sich die 1934 von UFER eingeführte fluoreszenzoptische Prüfung bewährt (13). Sie wird sowohl in Deutschland als auch in Kanada und in den USA angewandt und beruht nach UFER (14) auf der gelbgrünen Fluoreszenz der Orthocumarsäure, die nach 2 $\frac{1}{2}$ stündigem Kochen der Blattproben „in

konzentrierteren Alkalien“ aus Cumarin entstanden sein soll. Durch Mischung mit der roten Fluoreszenz des Chlorophylls ist in Grenzen auch eine quantitative Abschätzung möglich. SLATENSEK und WASHBURN präzisierten die ziemlich subjektive Prüfung durch Verwendung eines Photofluorometers (11), (15). Wünschenswert blieb eine weitere Vereinfachung mit dem Ziel der Arbeits- und Kostenersparnis.

Im Rahmen unserer Versuche, bei *Melilotus albus* mit Hilfe von Röntgenstrahlen und Chemikalien Mutationen auszulösen (4), (5), (9), haben wir umfangreiches Steinkleematerial nach der Methode von UFER (14) auf Cumaringehalt getestet. Wir verwendeten dazu eine Hochleistungs-Mikroskopierleuchte der Fa. Zeiss mit dem Quecksilberhöchstdruckbrenner Osram HBO 74 und einem blauen Erregerfilter Schott BG 12, dessen Strahlendurchlässigkeit zwischen etwa 3500 und 5000 Å liegt (Abb. 1). Dieses Filter ist speziell für die Erregung von Fluoreszenzlicht im gelben und roten Bereich vorgesehen. Es erlaubt, die nach UFER durch 2 $\frac{1}{2}$ stündiges Kochen mit NaOH vorbereiteten Blattproben rasch und relativ sicher zu prüfen. Die Beobachtung erfolgt normaler-