

- chend-morphologische Studien an verschiedenen *Venturia*-Arten. *Gartenbauwiss.* 11, 183—207 (1938). — 6. HOLZ, W.: Eine Methode zur Feststellung des Befalls mit *Fusicladium dendriticum* vor dem Ausbruch der Schorfkrankheit bei *Pirus malus*. *Zbl. Bakteriol.* II 94, 459—461 (1935). — 7. HOLZ, W.: Zur Färbung des Myzels von *Fusicladium dendriticum* in Apfelblättern. *Zbl. Bakteriol.* II 94, 195 (1936). — 8. HOUGH, L. F.: A survey of the scab resistance of the foliage on seedlings in selected apple progenies. *Amer. Soc. Hort. Sci. Proc.* 44, 260—272 (1944). — 9. HOUGH, L. F., J. R. SHAY, and W. F. DAYTON: Apple scab resistance from *Malus floribunda* Sieb. *Americ. Soc. Hort. Sci. Proc.* 62, 341—347 (1953). — 10. JOHNSTONE, K. H.: Observations on the varietal resistance of the apple scab (*Venturia inaequalis* Aderh.) with special reference to its physiological aspects. *J. of Pomol.* 9, 30—52 und 195—227 (1931). — 11. KEITT, G. W., and M. H. LANGFORD: *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. I. A groundwork for genetic studies. *Americ. J. Bot.* 28, 805—820 (1941). — 12. KEITT, G. W., and M. H. LANGFORD: Inheritance of pathogenicity in *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *Americ. Naturalist* 86, 373—389 (1952). — 13. KEITT, G. W., and D. M. BOONE: Induction and inheritance of mutant characters in *Venturia inaequalis* in relation to its pathogenicity. *Phytopathology* 44, 362—370 (1954). — 14. KLINE, D. M., O. M. BOONE, and G. W. KEITT: Experimental control of pathogenicity of biochemical mutants of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 46, 17. (Abstr.) (1956). — 15. NUSBAUM, C., and G. W. KEITT: A cytological study of host-parasite relations of *Venturia inaequalis* on apple leaves. *J. Agric. Res.* 56, 595—618 (1938). — 16. PALMITER, D. H.: Variability in monoconidial cultures of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 24, 22—47 (1934). — 17. RAWLINS, T. E.: Phytopathological and botanical research methods. London 1933. — 18. ROEMER, Th., W. H. FUCHS und K. ISENBECK: Die Züchtung resisterter Rassen der Kulturpflanzen. Berlin 1938. — 19. RUDLOFF, C. F., und M. SCHMIDT: *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderh. II. Zur Züchtung schorfwiderstandsfähiger Apfelsorten. *Der Züchter* 6, 288—294 (1934). — 20. RUDLOFF, C. F., und M. SCHMIDT: *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderh. I. Der Einfluß des Nährbodens auf den Pilz und die Erhaltung seiner Pathogenität. *Gartenbauwiss.* 9, 65—91 (1935). — 21. RUDLOFF, C. F.: *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderhold. III. Zur Formenmannigfaltigkeit des Pilzes. *Gartenbauwiss.* 9, 105—119 (1935). — 22. RUDLOFF, C. F., und M. SCHMIDT: Der Erreger des Apfelschorfes, *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderhold. Grundlagen und Möglichkeiten für seine Bekämpfung auf züchterischem Wege. Der Züchter 7, 30—37 und 65—74 (1935). — 23. SCHMIDT, M.: *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderhold. IV. Weitere Beiträge zur Rassenfrage beim Erreger des Apfelschorfes. *Gartenbauwiss.* 9, 364—389 (1935). — 24. SCHMIDT, M.: *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderhold. V. Weitere Untersuchungen über die auf verschiedenen Bäumen lebenden Populationen des Apfelschorfpilzes. *Gartenbauwiss.* 10, 422—427 (1937). — 25. SCHMIDT, M.: *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderh. VI. Zur Frage nach dem Vorkommen physiologisch spezialisierter Rassen beim Erreger des Apfelschorfes. Erste Mitteilung. *Gartenbauwiss.* 10, 478—499 (1936). — 26. SCHMIDT, M.: *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderh. VII. Zur Morphologie und Physiologie der Widerstandsfähigkeit gegen den Erreger des Apfelschorfes. *Gartenbauwiss.* 11, 221—230 (1938a). — 27. SCHMIDT, M.: *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderh. VIII. Weitere Untersuchungen zur Züchtung schorfwiderstandsfähiger Apfelsorten. Der Züchter 10, 280—291 (1938b). — 28. SCHMIDT, M.: *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderh. IX. Fünfjährige Freilandbeobachtungen über den Schorfbefall von Apfelsorten. *Gartenbauwiss.* 13, 567—586 (1939). — 29. SCHMIDT, M.: *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderh. X. Zur Vererbung der morphologischen Merkmale auf künstlichem Substrat und der Aggressivität gegenüber bestimmten Wirten bei Einsporherkünften des Apfelschorfpilzes. *Gartenbauwiss.* 15, 118 (1941). — 30. SCHMIDT, M.: Erreichtes und Erstrebtes in der Obstzüchtung. Der Züchter 19, 135—153 (1948). — 31. SEMPIO, C.: Metabolic resistance to plant diseases. *Phytopathology* 40, 799—819 (1950). — 32. SHAY, J. R., and L. F. HOUGH: Evaluation of apple scab resistance in selections of malus. *Americ. J. Bot.* 39, 288—297 (1952). — 33. SHAY, J. R., D. F. DAYTON, and L. F. HOUGH: Apple scab resistance from a number of malus species. *Americ. Soc. Hort. Sci. Proc.* 62, 348—356 (1953). — 34. SHAY, J. R., D. F. DAYTON, L. F. HOUGH, E. B. WILLIAMS and J. JANICK: Apple scab resistance. 14th int. horticul. Congr. Scheveningen, 1, 735—739 (1955). — 35. SHAY, J. R., and E. B. WILLIAMS: Identification of three physiologic races of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 46, 190—193 (1956). — 36. SPANGELO, L. P. S., J. B. JULIEN, H. N. RACINOT and D. S. BLAIR: Breeding apples for resistance to scab. *Canadian Journ. of Agric. Sci.* 36, 329—338 (1956). — 37. TERMOHLEN, G. P.: Het kweken op schurftresistentie bij appel an peer. Meded. Dir. Tuinb. 16, 519—532 (1953). — 38. ZWINTZSCHER, M.: Über die Widerstandsfähigkeit von F_2 -Bastarden des Apfels gegenüber dem Schorferreger *Venturia inaequalis* (Cooke) Aderhold. *Gartenbauwiss.* 1 (19), 22—35 (1954).

Aus der Bundesanstalt für Tabakforschung, Forchheim

Die Aktivität der Polyphenoloxidase bei einer Y-Virus anfälligen Tabaksorte und ihrer resistenten Mutante

Von G. KOELLE und R. WAHL

Die Polyphenoloxidase wird in der Literatur häufig mit Fragen der Physiologie kranker und gesunder Pflanzen in Zusammenhang gebracht (ALLEN, 1959, KIRALY and FARKAS, 1959, ROHRINGER, 1959). Wir hatten 1959 eine für Y-Virus anfällige Tabaksorte und ihre resitive Mutante mit der ersten der im folgenden Abschnitt beschriebenen Methoden untersucht und konnten in diesen vorläufigen Tastversuchen feststellen, daß die Anfälligen eine stärkere Aktivität ihrer Polyphenoloxidase (PPO) aufwiesen als die Resistenter. Es war natürlich ein bestechender Gedanke, in der Aktivität der PPO eine gensteuerte direkte Ursache der Resistenz zu suchen.

Nun waren aber sämtliche der 1959 benutzten anfälligen Pflanzen von Y-Virus befallen, die resitive Mutante aber gesund, und es läßt sich damit nicht erkennen, ob die stärkere PPO-Aktivität die Ursache

oder nur die Wirkung der Infektion war, d. h. ob der Unterschied in der PPO-Aktivität ein genetisches oder nur phytopathologisches Problem ist. Es galt also, den Einfluß der Infektion als solcher von den genetisch bedingten Ursachen der Disposition zu trennen und in vergleichenden Untersuchungen auch gesund gebliebene Pflanzen der Anfälligen mit einzubeziehen.

Die Versuche sollten im Sommer 1960 fortgesetzt werden, was aber durch den frühen und starken Befall mit Y-Virus und *Peronospora tabacina* unmöglich wurde. Der Sommer 1961 war für diese Untersuchungspläne günstiger, da Y-Virus und auch *Peronospora* nicht in dem Maße auftraten wie 1960 und wir bis in den September hinein auch von der anfälligen Sorte genügend nicht befallene Pflanzen zur Verfügung hatten.

Material und Methode

Als Y-Virus Anfällige diente die Sorte Virgin A, von welcher sowohl befallene, d. h. kranke, als auch nicht befallene, d. h. gesunde Pflanzen zur Verfügung standen. Als Resistente diente die Virgin A-Mutante (KOELLE 1961), von der alle Pflanzen nicht befallen, d. h. gesund waren. Virgin A und Mutante waren auf verschiedenen Standorten über das ganze Versuchsfeld der Bundesanstalt verteilt. Zu vergleichenden Untersuchungen auf PPO-Aktivität wurden jeweils nur Pflanzen eines und desselben Standortes ausgewählt, die gleich hoch und im gleichen Entwicklungsstand waren.

Für die Voruntersuchungen von 1959 war folgende Methode angewandt worden: Ausschnitte aus den zu untersuchenden Blättern von etwa 5 g Frischgewicht werden mit Aceton im Mörser so lange homogenisiert, bis ein weißliches Blathomogenisat anfällt (siehe PENN, STEPHENS and WEYBREW, 1958). In diesem Pulver wurde nach der von MILLER u. a. beschriebenen Methode die Aktivität der PPO bestimmt, und zwar aus der Zeit, in der nach Vorschalten von Ascorbinsäure die Farbreaktion der Polyphenoloxidase mit Chinon bzw. Jod erfolgt (MILLER et al. 1944). Man erhält mit dieser Methode nur einen mehr oder weniger exakten Zeitwert als relatives Maß für die Stärke der Fermentaktivität.

1961 wurden die Blattausschnitte, und zwar Ausschnitte aus der Spitzenregion der zu untersuchenden Blätter, wie 1959 zuerst mit Aceton im Mörser mehrmals zerrieben und ausgewaschen. Die Fermentaktivität des zurückbleibenden weißen Pulvers wurde mit der von BRAESCH beschriebenen Methode im Stufenphotometer bestimmt (BRAESCH, 1954). In Abänderung der BRAESCHSchen Methode haben wir schon nach 10 Minuten gemessen. Man erhält mit dieser Methode genaue Meßwertzahlen (Extinktionswerte), die ein Maß für die relative Aktivität der PPO darstellen.

Wir hatten 1959 versucht, Blattausschnitte in der Kühltruhe bei -20° einige Monate bis zur Zeit der Verarbeitung aufzubewahren. Sie waren aber nach 3 Monaten für eine Untersuchung unbrauchbar geworden.

Ein Welkwerden der geernteten Blätter ebenso wie ein längeres Stehenlassen des chlorophyllfreien weißen Pulvers wirkte sich in einer Abnahme der PPO-Aktivität aus. Daraus ergab sich die Notwendigkeit, nur frisch geerntetes Blattmaterial sofort zu untersuchen. Die Höchstzahl derartig untersuchter Blätter war pro Tag etwa 27.

Ergebnisse

Die vergleichenden Untersuchungen auf PPO-Aktivität geschahen mit Blättern gleicher Insertionshöhe von je 3 verschiedenen Pflanzen: einer gesunden Virgin A, einer Y-Virus befallenen Virgin A und einer Mutante. Die Maßnahme, nur Blätter gleicher Blattstufe miteinander zu vergleichen, erwies sich als notwendig, da sich innerhalb einer Pflanze eine leichte Zunahme der Meßwerte von unten nach oben aneutete. Diese Tendenz macht sich vor allem an jungen noch wachsenden Pflanzen bemerkbar, siehe Tab. 1. Später, zur Zeit der Samenreife im September, war sie nicht mehr deutlich zu erkennen, siehe Tab. 2.

Vom 31. Juli bis 29. September wurden an 29 Versuchstagen etwas über 400 Einzelmessungen durch-

geführt, die sich auf die 3 Pflanzengruppen „Anfällig gesund“, „Anfällig krank“ und „Resistent gesund“ verteilen. Wir geben hier nur die Meßwerte von 2 Versuchstagen wieder. Es würde den Umfang dieser Arbeit zu sehr belasten, wollten wir sämtliche Meßwerte hier anführen; sie stehen aber zur Einsichtnahme jederzeit zur Verfügung.

Den Phytopathologen interessiert vor allem der Unterschied in der PPO-Aktivität zwischen gesundem und krankem Virgin A. In Spalte 1 und 2 der Tabellen ist diese Gegenüberstellung der Meßwerte verdeutlicht. Es standen für eine statistische Auswertung die Meßwerte von 126 Blattpaaren zur Verfügung. Die Blätter des befallenen Virgin A zeigten gegenüber denen des nicht befallenen Virgin A eine erhöhte PPO-Aktivität. Die Differenz ist signifikant und zwar sehr gut gesichert. (Der errechnete t-Wert von 6,85 überschreitet den Tabellenwert von t für $P = 0,01\%$.)

Genetisch bedeutsam ist die Tatsache, daß auch zwischen dem gesund gebliebenen Virgin A und der Mutante ein Unterschied besteht, und zwar ist die PPO-Aktivität der Mutante signifikant höher als die des gesund gebliebenen Virgin A (Spalte 1 und 3 der Tabelle). Hier standen 174 Vergleichspaare zur Auswertung zur Verfügung. (Der errechnete t-Wert von 7,4 überschreitet den Tabellenwert für $P = 0,01\%$, die Differenz ist sehr gut gesichert.)

Da die PPO-Aktivität sowohl der Resistenten als auch der kranken Anfälligen signifikant höher liegt als die der gesunden Anfälligen, ist aus einer Gegenüberstellung der Meßwerte der Resistenten zu denen der kranken Anfälligen (Spalte 2 zu Spalte 3) keine gesicherte Differenz zu erwarten, wie auch die Auswertung von 128 derartigen Blattpaaren bestätigte. (Der errechnete t-Wert von 1,38 erreicht hier nicht den Tabellenwert für $P = 5\%$.) Dies entspricht nicht den Beobachtungen von 1959, wo zwischen kranken Anfälligen und gesunden Resistenten ein Unterschied festgestellt wurde. Wir werden in der Diskussion noch darauf zurückkommen.

Daß für die Berechnung der Aktivitätsdifferenzen: Virgin A gesund — Virgin A krank, Virgin A gesund

Tabelle 1. Meßwerte der PPO-Aktivität vom 7. August 1961.

| | Virgin A anfällig nicht befallen | Virgin A anfällig befallen | Mutante resistent nicht befallen |
|----------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| 3. Blatt | 0,50 | 0,64 | 0,59 |
| 4. Blatt | 0,70 | 0,65 | 0,70 |
| 5. Blatt | 0,70 | 0,44 | 0,72 |
| 6. Blatt | 0,58 | 1,07 | 0,64 |
| 7. Blatt | 0,72 | 0,98 | 0,82 |
| 8. Blatt | 0,75 | 1,39 | 1,26 |
| 9. Blatt | 0,75 | 1,20 | 1,28 |

Tabelle 2. Meßwerte der PPO-Aktivität vom 22. September 1961.

| | Virgin A anfällig nicht befallen | Virgin A anfällig befallen | Mutante resistent nicht befallen |
|-----------|-------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| 7. Blatt | 0,78 | 0,67 | 0,84 |
| 8. Blatt | 0,66 | 0,68 | 0,83 |
| 9. Blatt | 0,45 | 0,72 | 0,61 |
| 10. Blatt | 0,85 | 0,81 | 0,75 |
| 11. Blatt | 0,52 | 0,79 | 0,83 |
| 12. Blatt | 0,74 | 0,85 | 0,95 |
| 13. Blatt | 0,69 | 0,68 | 0,93 |
| 14. Blatt | 0,67 | 0,81 | 0,61 |
| 15. Blatt | 0,77 | 0,78 | 0,84 |

— Mutante und Virgin A krank — Mutante jeweils eine verschiedene Anzahl von Meßwertpaaren zur Verfügung stand, röhrt daher, daß an einzelnen Standorten keine rippenkranken Pflanzen zu finden waren, so daß in einigen Serien nur gesund gebliebene Anfällige und Resistente verglichen werden konnten.

Diskussion

Die Versuchsergebnisse von 1961 stehen in einem gewissen Gegensatz zu den Ergebnissen der Voruntersuchungen von 1959. Damals war die PPO-Aktivität der Resistenten geringer, 1961 aber — über die ganze Vegetationszeit gesehen — ohne Unterschied zu der der kranken Anfälligen. Die Untersuchungen von 1959 geschahen aber nur probeweise im September an ein paar wenigen Blattpaaren mit einer weniger exakten Methode, so daß sie keinen ernstlichen Widerspruch zu den Ergebnissen von 1961 darstellen können. Außerdem ist ja auch ein Vergleich zwischen gesunden Resistenten und kranken Anfälligen, wie schon in der Einleitung dargelegt, ohne Belang. Wir führen die Voruntersuchungen von 1959 nur an, weil der damals festgestellte Unterschied in der PPO-Aktivität uns den Anstoß zu einem intensiveren Eingehen auf diese Fragen gab.

Jedenfalls zeigen die in größerem Umfange angestellten Untersuchungen von 1961, daß die kranken Virgin A wie auch die Mutanten eine signifikant höhere PPO-Aktivität haben als die gesund gebliebenen Virgin A. Die PPO scheint also nicht nur in der Physiologie der Erkrankung als solcher eine Rolle zu spielen. Der Unterschied zwischen der Resistenten und der gesunden Anfälligen läßt vielmehr die Frage auftreten, ob nicht gerade diese von vornherein höhere Fermentaktivität der Mutante in ursächlichem Zusammenhang mit ihrer Disposition für Resistenz stehe. Dazu seien folgende Überlegungen angeführt:

Der phänotypische Unterschied zwischen Virgin A und Mutante läßt sich auf den Unterschied in nur einem Genort zurückführen, wobei die Disposition der Mutante für Resistenz das rezessive Merkmal darstellt (KOELLE 1961). Die PPO-Aktivität der Mutante hat sich aber als signifikant höher erwiesen als die des Virgin A; das rezessive Merkmal der Resistenz kommt hier also zusammen mit einer stärkeren Fermentaktivität in der Pflanze vor. Damit schließt sich aber ein zumindest enger und direkter Zusammenhang zwischen dem Unterschied in der Aktivität dieses Fermentes und dem Unterschied in diesem einen Genort aus, und die PPO kann nicht die direkte ausschlaggebende Ursache der Resistenz sein. Bei der komplexen Natur der Resistenz bleibt aber die Frage nach der Rolle der PPO-Aktivität, d. h. als der eines beteiligten Faktors weiterhin offen.

In Untersuchungen mit rostanfälligen und resistenten Weizensorten fand KIRALY ähnliche Verhältnisse: Die gesunden Resistenten hatten auch hier eine höhere PPO-Aktivität als die gesunden Anfälligen (KIRALY, 1959). Leider werden aber dabei keine Dominanzverhältnisse der Disposition angegeben. In den Versuchen von KIRALY war sowohl bei Anfälligen als auch bei Resistenten nach der Infektion ein Anstieg ihrer PPO-Aktivität zu verzeichnen. Leider standen uns 1961 keine Y-Virus kranken Mutanten zur Verfügung. Eine Einbeziehung von befallenen

Resistenten könnte auf das Problem der Beziehung von PPO und Resistenz ein weiteres Licht werfen.

Zusammenfassung

Vergleichende Untersuchungen ergaben Unterschiede in der Aktivität der Polyphenoloxidase von Y-Virus anfälligen und resistenten Tabaken. Um den physiologischen Einfluß der Infektion als solcher vom genetisch bedingten Unterschied der Disposition zu trennen, wurden in mehreren Serien je eine gesund gebliebene anfällige, eine erkrankte anfällige und eine gesunde resistente Pflanze untersucht und die Meßwerte ihrer Blätter miteinander verglichen.

Die erkrankten Anfälligen sowohl wie auch die gesunden Resistenten haben eine signifikant höhere Polyphenoloxidase-Aktivität als die gesund gebliebenen Anfälligen. Der Unterschied in der Fermentaktivität zwischen den befallenen und nicht befallenen Pflanzen der anfälligen Sorte fällt in das rein phytopathologische Interessengebiet. Der Unterschied in der Fermentaktivität zwischen den Resistenten und den gesund gebliebenen Pflanzen der anfälligen Sorte dagegen muß auf einem genetischen Unterschied beruhen.

Es wird die Frage diskutiert, ob die Aktivität der Polyphenoloxidase in direktem Zusammenhang mit der genetischen Disposition für Resistenz stehen kann.

Summary

Trials about the activity of polyphenoloxidase showed a significant difference between Y-Virus susceptible and resistant tobacco plants. In order to separate the effect of virus infection from that of genetical disposition a series of non infected plants of the susceptible variety was compared with infected ones of the same variety and with resistant plants.

The polyphenoloxidase activity of infected plants of the susceptible variety as well as that of the non infected resistant plants proved to be higher than that of the non infected plants in the susceptible variety.

The difference in the polyphenoloxidase activity between infected and non infected plants of the susceptible variety shows the importance of this enzyme in the physiology of infection.

The difference between the non infected resistant and the non infected susceptible plants is a genetical problem. The question is discussed in how far the polyphenoloxidase may be associated with the genetical disposition for resistance.

Literatur

1. ALLEN, P. J.: Physiology and biochemistry of defense. In: J. G. Horsfall and A. E. Dimond, Plant Pathology. New York and London 1959, Vol. I, 435—458.
2. BRAESCH, S.: Colorimetrische Bestimmung von Phenoloxidasen. Bull. Soc. Chim. Biol., Paris, **36**, 711—713 (1954).
3. KIRALY, Z., and G. L. FARKAS: Biological trends in plant pathology. Phytopath. Z. **34**, 341—364 (1959).
4. KIRALY, Z.: On the role of phenoloxidase activity in the hypersensitive reaction of wheat varieties infected with stem rust. Phytopath. Z. **35**, 23—26 (1959).
5. KOELLE, G.: Genetische Analyse einer Y-Virus-(Rippenbräune-)resistenten Mutante der Tabaksorte Virgin A. Der Züchter **31**, 71—72 (1961).
6. MILLER, W. H., M. Fr. MALLETT, L. J. ROTH, and Ch. DAWSON: A new measurement of tyrosinase activity. J. Americ. Chem. Soc. **66**, 514—519 (1944).
7. PENN, P. T., R. L. STEPHENS, and J. A. WEYBREW: The in vitro synthesis of a „Cherry red“ pigment. Tobacco Science, II, 102—105 (1958).
8. ROHRINGER, R.: Allgemeine Pflanzenpathologie. Fortschritte der Botanik **22**, 394—405 (1959).