

Zur Mikrobiologie und Biochemie der Peronosporaresistenz*

von J. A. Schmidt

Landesanstalt für Tabakbau und Tabakforschung, Forchheim bei Karlsruhe

EINLEITUNG

Durch das epidemische Auftreten von *Peronospora tabacina* Adam (PtA), auch Blauschimmel und auf englisch "blue mould" genannt, seit 1960 in ganz Europa, Teilen Asiens und Afrikas traten Pflanzenschutzprobleme auf, die bis dahin in diesen Erdteilen im Tabakanbau nicht bestanden. In den USA und Australien, wo PtA seit 1885 bekannt ist, tritt diese Pilzkrankheit nur vereinzelt in den Anzuchtbeeten auf, stellt aber nach Lucas (1) wegen der dort herrschenden hohen Tages- und Nachttemperaturen keine Gefahr für die Feldentwicklung des Tabaks dar. In den 60er Jahren betrug die Tabakanbaufläche in dem von PtA neu erfaßten geographischen Raum einschließlich der UdSSR, jedoch ohne Irak und Iran, ca. 265 000 ha mit einem Jahresertrag von ca. 600 000 t. Bei Annahme eines Tabakkilopreises von nur 3 DM und unter Berücksichtigung eines nur 50⁰/oigen Verlustes durch PtA beträgt der Schaden, welcher durch diesen Pilz entstanden ist, über 900 Millionen DM. Hinzuzurechnen sind außerdem noch die Aufwendungen für die nun notwendigen Pflanzenschutzmaßnahmen.

PROBLEMSTELLUNG

Durch PtA werden alle im Anbau stehenden Tabaksorten befallen. Resistenzfaktoren gegenüber PtA besitzen nur die *Nicotiana* Wildarten *debneyi*, *exigua*, *gossei*, *megalosiphon* und *velutina*.

Kurzfristig wurden als Gegenmaßnahmen zur Bekämpfung dieser Pilzkrankheit wöchentliche Spritzungen der Tabakbestände mit Dithiocarbamaten (DTC) in Konzentrationen von 0,1 bis 0,2⁰/o eingeführt. Diese Fungizide erwiesen sich nach Voruntersuchungen als die geeignetsten Bekämpfungsmittel, welche allerdings nur prophylaktische Wirkung besitzen. Hierdurch entstand das Rückstandsproblem der Dithiocarbamate und ihrer Abbauprodukte (Mn, Zn, Metaboliten des Schwefels). Kurativ und systemisch wirkende Fungizide sind bis heute für die PtA-Bekämpfung nicht vorhanden.

Langfristig wurde die Züchtung PtA-resistenter Tabaksorten aufgenommen, wobei man allgemein auf amerikanische und z. T. australische Zuchthybriden auf *Nicotiana-debneyi*-Basis zurückgreifen konnte. Bereits ab 1965 kamen in verschiedenen Ländern Kreuzungen zwischen diesen und den anfälligen Landsorten versuchs-

weise zum Anbau. Die Qualität dieser Neuzüchtungen befriedigte Verarbeiter in Ländern mit freier Marktwirtschaft nicht. In den folgenden Jahren konnte durch weitere Rückkreuzungen mit der PtA-anfälligen Landsorte — besonders bei „Badischem Burley E“ — die Qualität dieser Resistenzzüchtungen weiter verbessert werden, jedoch befinden sich bis heute in der Bundesrepublik Deutschland diese Sorten nicht im Großanbau. In Ländern, in welchen großflächig diese resistenten Sorten angebaut werden (z. B. Frankreich und Italien), wurde das Auftreten eines aggressiveren Biotyps von PtA beobachtet, gegen welchen selbst *N. debneyi* keine Resistenz besitzt, wie aus dem „Rapport Général“ der CORESTA über die Blauschimmlepidemie bei Tabak 1971 (2) hervorgeht. Dieser aggressivere Biotyp von PtA ist bis Ende 1971 in der Bundesrepublik Deutschland nicht aufgetreten, wie eigene Untersuchungen ergaben.

Zur Testung der Resistenzeigenschaften von *Nicotiana*-Wildformen bzw. von Neuzüchtungen wurde von Izard, Schiltz und Hitier (3) der Kotyledonentest eingeführt. Izard (4) erweiterte diesen 1962 zur Prüfung von Fungiziden. Diese Tests werden heute überall, wo mit PtA gearbeitet wird, oft modifiziert durchgeführt. Der Kotyledonentest, wie er in der Landesanstalt in Forchheim jährlich im Rahmen der Züchtungsarbeiten durchgeführt wird, ist unter (9) veröffentlicht.

Magnesiummangel, welcher als Ursache der Verbreitung des aggressiveren Biotyps oft angenommen wurde, hat sich nach 1971 durchgeführten Untersuchungen der Landesanstalt auf italienischen Böden, auf denen deren eigene PtA-resistente Neuzüchtungen standen, welche an PtA erkrankt sind, nicht bestätigt. Der Mg-Gehalt dieser Böden betrug 6 mg in 100 g Boden (Bestimmung nach der Al-Methode), was noch als ausreichend anzusehen ist.

Die heute angewandten Fungizide auf Dithiocarbamatbasis hinterlassen Rückstände und Abbauprodukte auf dem Tabak, welche der Höchstmengenverordnung-Pflanzenschutz nach deren Inkrafttreten unterliegen werden. Darüber hinaus ist auch im Rahmen des Umweltschutzes zur Gesunderhaltung der Böden und hinsichtlich der Einwirkung von Rückständen auf die in der Fruchtfolge stehenden Nutzpflanzen das Rückstandsproblem von großer Bedeutung, wodurch diesen Arbeiten weitere Bedeutung zukommt.

Da alle biologischen Vorgänge, also auch das Resistenzverhalten, biochemischen Reaktionen unterliegen, war es interessant, diese Vorgänge bei PtA mit biologischen,

* Vortrag anlässlich des XIII. Tabak-Kolloquiums, Brüssel, 1971.

mikrobiologischen und biochemischen Methoden zu untersuchen, um damit zu einer dritten Bekämpfungsmöglichkeit zu kommen.

Als Arbeitsziel wurde hierbei angestrebt: Erhaltung der quantitativ und qualitativ hochstehenden Tabak-Landsorten durch biochemische Beeinflussung genetisch sicherlich vorhandener, bis heute jedoch ungenutzter Anlagen zur Resistenzauslösung, unter Vermeidung von chemischen für Boden und Verbraucher schädlichen Rückständen.

Arbeiten mit PtA werden zeitlich dadurch verzögert, daß dieser Pilz sich als obligater Tabakparasit nur auf lebendem Tabak entwickelt und vermehrt. Da noch keine sporendichten Versuchsräume in der Landesanstalt vorhanden sind, können derartige Arbeiten nur in der Zeit vom ersten natürlichen Auftreten des Pilzes in den Feldbeständen, was zumeist im Juli erfolgt, bis zum Jahresende durchgeführt werden. Darnach müssen alle lebenden Tabakbestände und damit PtA vernichtet und die Labors bzw. Gewächshäuser desinfiziert werden, um nicht den Pilz in die neue Tabakanzucht zu verschleppen.

Im folgenden handelt es sich um eine Zusammenfassung von fünf Mitteilungen, welche in der „Zeitschrift für Naturforschung“, Teil b, veröffentlicht wurden (5–9). Die vorliegende Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse entspricht dem Stand von Ende 1971. Die Entwicklungsverläufe werden in drei Abbildungen schematisch dargestellt und kommentiert und sind durch bisher noch nicht veröffentlichte Ergebnisse erweitert.

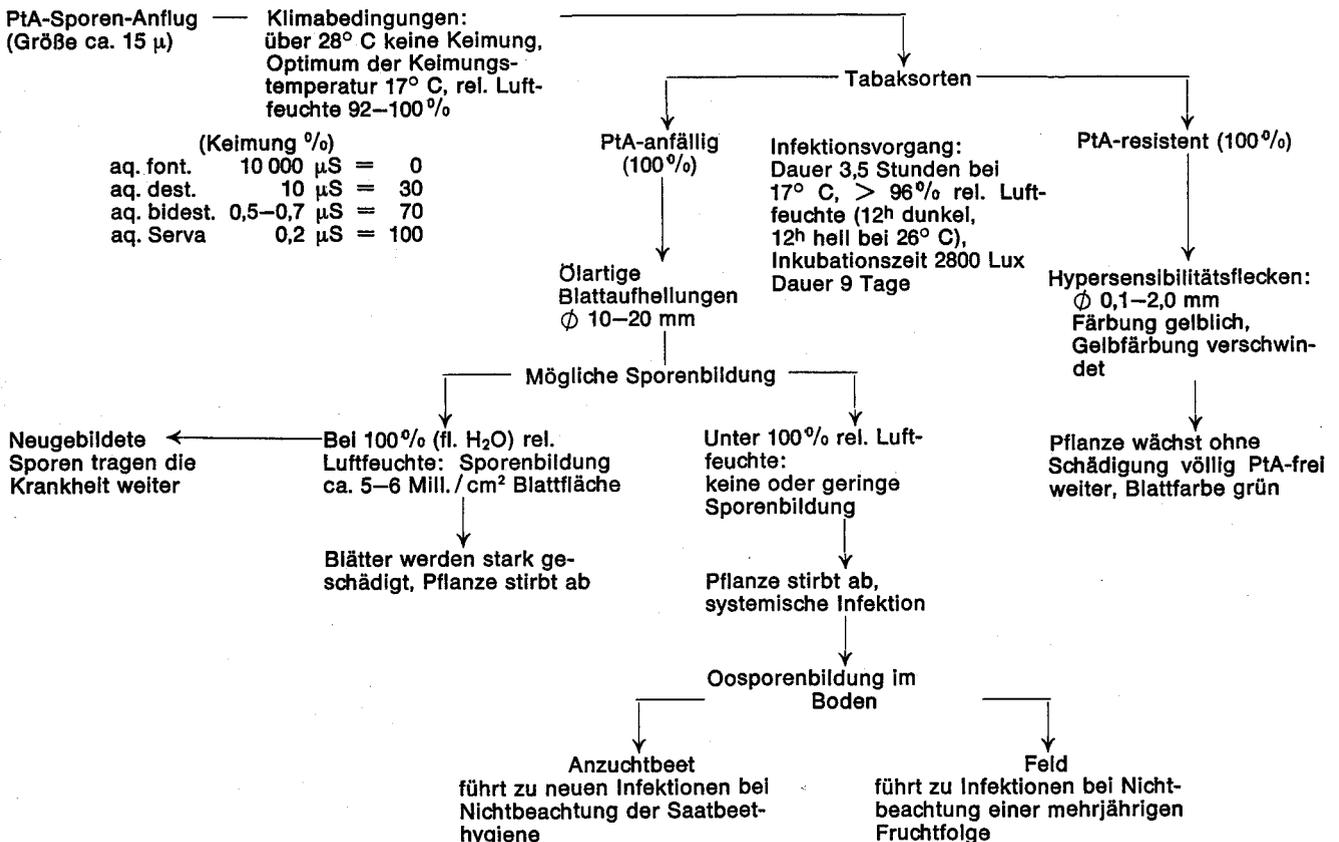
EXPERIMENTELLER TEIL

1. Beobachtungsergebnisse (Abb. 1)

In Abbildung 1 ist schematisch der Entwicklungsgang von PtA dargestellt. Wichtig für die Keimung der Sporen sind die Klimaangaben bezüglich des hierfür notwendigen Temperatur- und Feuchtigkeitsbedarfes und bei Versuchen mit Wasser dessen Reinheitsgrad. Der Reinheitsgrad des Wassers wurde durch eine elektrische Leitfähigkeitsmessung ermittelt; die Angaben erfolgen in Mikro-Siemens (μS). Nach diesen Messungen besitzt über Ionenaustauscher gereinigtes Wasser, sog. Serva-Wasser, die geringste Leitfähigkeit, was sich sehr günstig auf die PtA-Sporenkeimfähigkeit auswirkt. Auf Grund dieser Feststellung werden alle notwendigen Versuche mit diesem Wasser durchgeführt.

In weiteren Untersuchungen wurde der Temperaturbereich der PtA-Sporenkeimung labormäßig ermittelt und bei PtA-anfälligen Tabakpflanzen geprüft, inwieweit bei diesen unter Zugrundelegung der Laborergebnisse die PtA-Infektionen mit Sporulation eintreten. Außerdem wurden hierbei die Zeiten bestimmt, welche für die einzelnen Temperaturstufen bei Luftfeuchtigkeiten über 96% zur Manifestierung der Infektion notwendig sind. Darnach wurden die Pflanzen Temperaturen und Lichtbedingungen unterworfen, wie sie im Kotyledonentest der Landesanstalt angewandt werden. Nach 9 Tagen (Ende der Inkubationszeit) wurden die Pflanzen stark befeuchtet (100% rel. Luftfeuchtigkeit), um die Sporulation zu ermöglichen.

Abbildung 1. Entwicklungsgang von Peronospora tabacina Adam (PtA) bei Tabak
(makroskopische und mikroskopische Befunde).



Derartige Untersuchungsergebnisse sind notwendig zur Bestimmung der kurativen Wirkung einer neuen Pflanzenschutzmaßnahme und können darüber hinaus Bedeutung für elektronische PtA-Warngeräte erhalten.

Bereits bei 1° C konnte eine Sporenkeimung von 5% festgestellt werden. Keimhyphenwachstum wurde bei dieser Temperatur jedoch nicht beobachtet. Bei 5° C betrug die Keimrate von Peronosporasporen ca. 8–10%; aber hier ist bereits deutlich Keimhyphenbildung vorhanden. Bei 10° C lag die Keimung über 20%, und es wurden lange Keimhyphen gebildet. Die optimale Keimungstemperatur wurde mit 17° C ermittelt; die Sporenkeimung betrug hier bis 100%, wobei lange Keimhyphen gebildet wurden. Bei 26° C betrug die Keimung 15–20% unter Ausbildung von ebenfalls langen Keimhyphen. Bei Temperaturen von 28° C und höher konnte keine Keimung mehr festgestellt werden.

Die Prüfungen bei PtA-anfälligen Tabakpflanzen, welche genügend lange an die jeweilige Prüfungstemperatur vorher angepaßt worden waren, ergaben folgende Werte. Bei 5° C wurde nach einer Zeit von 4 Stunden nach erfolgter Impfung nach der Inkubationszeit von 9 Tagen keine PtA-Erkrankung festgestellt. Erst 7,5 Stunden nach der Impfung erkrankten die Pflanzen an PtA und zeigten nach der Inkubationszeit auch Sporenbildung. Bei 10° C blieben die Pflanzen ebenfalls nach 4 Stunden noch PtA-frei. Nach 7,5 Stunden wurden ein sehr starker PtA-Befall und Sporenbildung festgestellt. Bei 17° C, der optimalen Sporenkeimungstemperatur, traten bereits nach 3,5 Stunden die Peronosporaerkrankung und starke Sporulation auf. Bei 25° C wurden erst wieder nach 7,5 Stunden Erkrankung und Sporenbildung beobachtet.

Diese Ergebnisse, die im einzelnen noch weiter eingengt werden müssen, zeigten aber bereits sehr deutlich, daß gemessen an unseren klimatischen Verhältnissen (Nachttemperaturen und rel. Luftfeuchtigkeit) während der Tabakfeldvegetationszeit jederzeit die Temperaturen eine PtA-Infektion gestatten und die Zeitperioden der Luftfeuchtigkeit über 96% immer gegeben sind, wie Messungen 1971 ergaben. Die Erweiterung dieser Untersuchungsserien im Bereich der rel. Luftfeuchtigkeit auf 92% besitzt nur wissenschaftliches Interesse.

Die in Abbildung 1 dargestellten Infektionsbefunde bei PtA-anfälligen und PtA-resistenten Tabaksorten beziehen sich auf die optimale Keimungstemperatur von 17° C bei rel. Luftfeuchtheitswerten über 96%. Die Infektion wurde zu Beginn der Dunkelphase, die 12 Stunden dauert, vorgenommen. Die Lichtphase, die ebenfalls 12 Stunden dauert, wird durch künstliche Beleuchtung mittels Leuchtröhren (jeweils 2 × weiß, 1 × blau; Abstand 5 cm) bei 2800 Lux durchgeführt. Wie bereits eingangs erwähnt, können derartige Untersuchungen während der üblichen Tabakvegetationszeiten (Mai–Juli) nicht durchgeführt werden. Aus diesen Gründen wurden daher die angeführten Tag- und Nachtbedingungen, wie sie für den Kotyledonentest generell festgelegt wurden, ebenfalls angewandt.

Als Tabaksorten fanden hierbei Verwendung: Für PtA-anfällig, die im deutschen Anbau stehenden Hauptsorten

„Badischer Geudertheimer“, „Badischer Burley E“ und „Virgin SCR“; für PtA-resistent, die „U. S. Beltsville-61-Typen“ (Bel. Typen), meist Bel. 61–10.

Die Pflanzengröße betrug für diese Versuche meist 3 bis 5 cm. Es handelt sich also um relativ junge, noch nicht setzfähige Pflanzen. Die Infektion erfolgte mit einer dosierten PtA-Sporenanzahl, nachdem die Keimfähigkeit vorher bestimmt wurde. Interessant in Abb. 1 ist, daß auch bei den PtA-resistenten Tabaksorten Sporenkeimung und Infektion erfolgten, was durch die Ausbildung der sog. Hypersensibilitätsflecken angezeigt wird und demonstriert, daß im Stoffwechsel dieser Pflanzen eine Abwehrreaktion durch diese Infektionen ausgelöst wird, die der biochemischen Untersuchung zugänglich ist. Bei den anfälligen Tabaksorten finden sich noch abschließend Angaben über den Eintritt der sog. systemischen Infektion, welche zur Oosporenbildung führt, und Hinweise zur Beachtung der notwendigen Hygienemaßnahmen für Anzuchtbeet und Feld.

2. Biochemische Ergebnisse (Abb. 2)

Analog dem in Abbildung 1 dargestellten PtA-Entwicklungsgang finden sich in Abbildung 2 die dazu gehörenden biochemischen Befunde. Die eingangs dargestellten biochemischen Ergebnisse lassen erkennen, daß PtA-Sporen auswaschbare keimhemmende Substanzen (5) besitzen und daß die resistenten Tabaksorten, sofern sie unter PtA-Infektionsdruck stehen, in der Lage sind, zusätzlich verschiedene spezielle Mikroorganismen zu aktivieren. Weiter geht aus der Abbildung 2 hervor, daß die PtA-Sporenkeimung durch Zugabe von im ppm-Bereich liegenden Mengen von Lysozym (6) unterbunden wird, was anzeigt, daß außerdem eine sehr hohe Empfindlichkeit gegenüber biologisch aktiven Systemen besteht.

Das bei den Bel.-Sorten die PtA-Resistenz auslösende oder induzierende Prinzip (8) wurde als Nucleoprotein, z. T. auch frei vorliegend als Di- bzw. Tri-Phosphopyridin-Nucleotid (DPN-H) bzw. (TPN-H), als Flavin-Mononucleotid (FMN), Flavinadenosin-Dinucleotid (FAD) und als eine Alloxazin-Verbindung, die dem Vitamin B₂ nahesteht, bestimmt. Nach schwacher Hydrolyse konnten papierchromatographisch Pyridin-, Purin- und Pyrimidin-Verbindungen sowie 5-Ribose nachgewiesen werden, was den Nucleotid-Charakter bestätigt. Die Alloxazin-Verbindung, die elektrophoretisch (130 V, 1 cm/3h) kathodisch (7) wandert, wurde papierchromatographisch weiteruntersucht, und für die beiden Fließmittelkombinationen wurden die folgenden R_f-Werte bestimmt:

1. Fließmittel: Pyridin:Butanol:H₂O (1:1:1), R_f = 0,57;
2. Fließmittel: Butanol:Eisessig:H₂O (4:1:5), org. Phase = Partridge-Gemisch, R_f = 0,61.

Diese R_f-Werte charakterisieren die Alloxazin-Verbindung. Die Fließmittelkombination 1 ist für biologische Tests verträglich. Die Fließmittelkombination 2 wurde nach Vorprüfungen gewählt, um einen sicheren Unterschied im R_f-Wert von dem des Vitamins B₂ zu erhalten.

Bei Bel. 61–10 wurde neun Tage nach der Impfung und Keimung von PtA-Sporen ein maximaler Gehalt an

Abbildung 2. Entwicklungsgang von Peronospora tabacina Adam (PtA)
(biochemische Befunde).

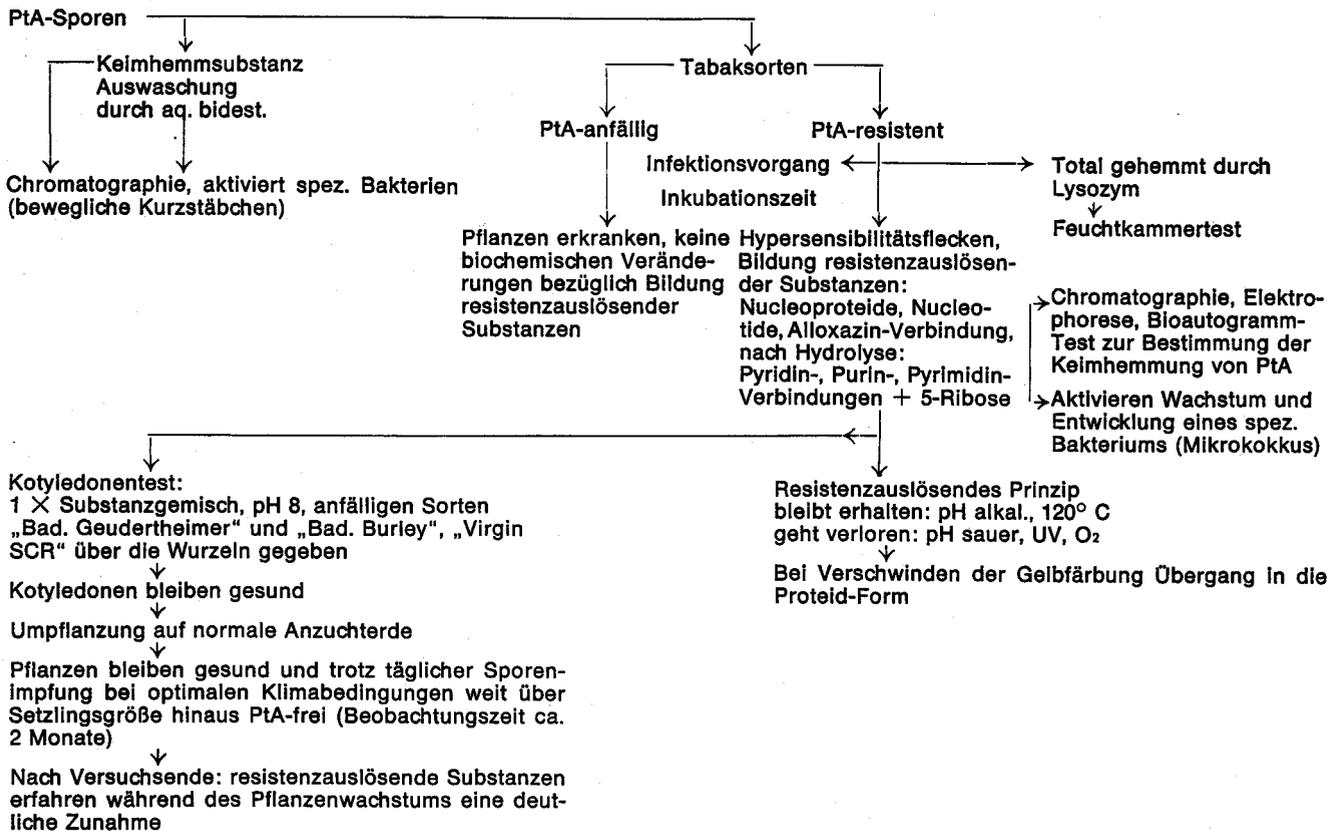
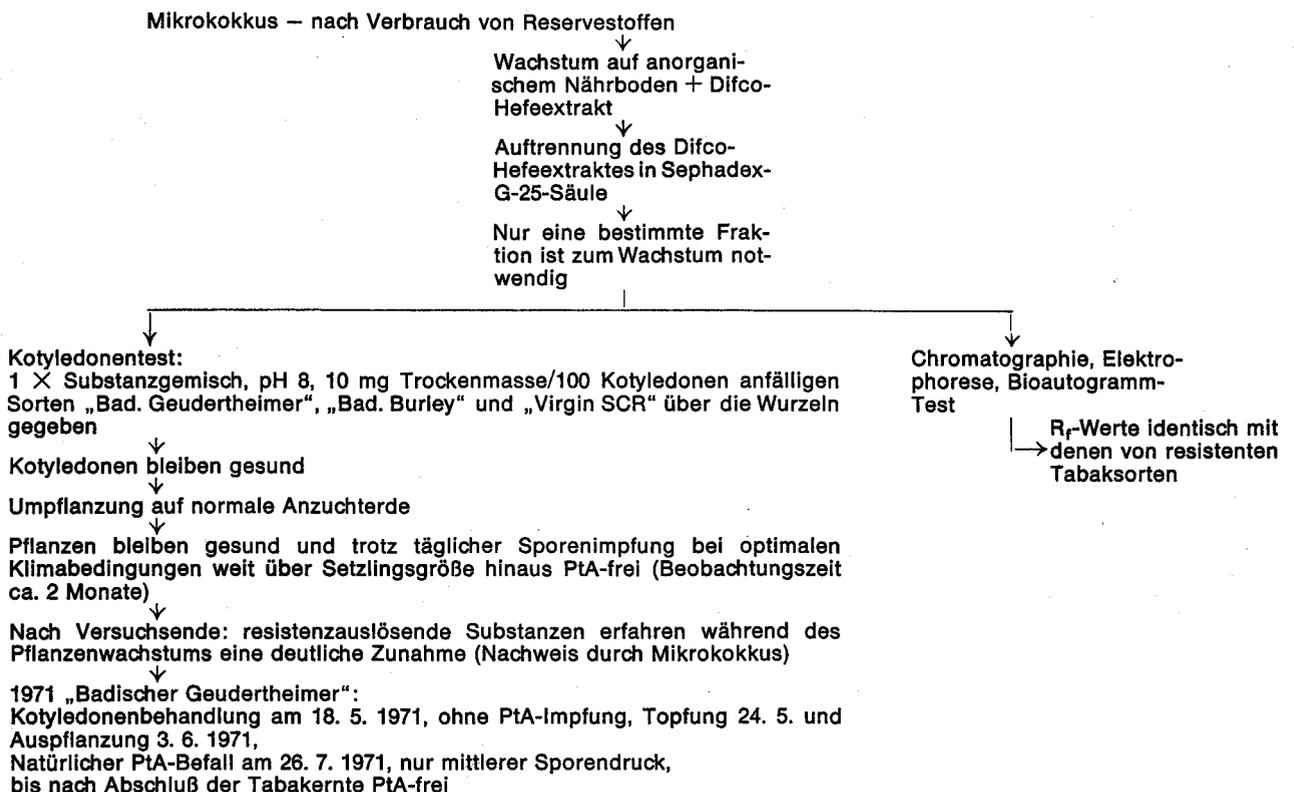


Abbildung 3. Spezielles Bakterium

(Mikrokokkus ermöglicht das Arbeiten während PtA-freier Zeiten und gestattet die Auffindung anderer, nicht von Tabak stammender Stoffe zur Prüfung auf PtA-Resistenz eigenschaften).



diesen Verbindungen nachgewiesen. Weitere Untersuchungen ergaben, daß bereits nach dem 15. Tag ein starker quantitativer Rückgang festzustellen ist und danach diese Verbindungen in Proteidform vorliegen und somit nicht ohne Hydrolyse zugänglich sind. Äußerlich wird dieser Vorgang dadurch gekennzeichnet, daß bei Bel. 61–10 sich wieder die normale grüne Blattfarbe einstellt.

Die keimhemmende Wirkung auf PtA-Sporen wurde im Bioautogrammtest mittels Fließmittelkombination 1 bzw. nach Eluation im Feuchtkammertest bestimmt.

Das keimhemmende Prinzip wird durch Erhitzung auf 120° C über eine volle Stunde (Übersterilisierung im Autoklaven) bei pH 8 nicht zerstört; es geht in schwach-saurem Milieu sowie durch UV- und O₂-Einwirkungen verloren.

Die nach erfolgter Infektion von PtA bei Bel. 61–10 gewonnenen und hier angeführten Substanzen wurden zur Gewinnung größerer Fraktionsmengen im „Spinco-Modell CP“ (kontinuierliches Elektrophorese-System) der Firma Beckmann bei pH 8 (Sörensen-Phosphatpuffer, 1/60 m) abgetrennt und in einer einmaligen Gabe den anfälligen deutschen Anbausorten im Kotyledonentest kurz vor der PtA-Infektion verabreicht.

Nach Abschluß des Kotyledonentests, der nach neun Tagen erfolgt (Auszählung), verließen sämtliche so behandelten Kotyledonen den Test Peronospora-frei. Diese Kotyledonen wurden darnach in normale Anzuchterde zur weiteren Entwicklung und Beobachtung pikiert. Trotz nun täglich weiter erfolgreicher Sporenimpfungen der unter optimalen Wachstums- und Pilzbedingungen stehenden Pflänzchen, was weit über das Setzlingsstadium hinaus durchgeführt wurde, blieben diese Pflanzen über eine Beobachtungszeit von zwei Monaten völlig PtA-frei.

3. Spezielles Bakterium (Abb. 3)

Im Verlaufe dieser mehrjährigen Untersuchungen konnte, wie bereits in Abb. 2 erwähnt, bei den resistenten Bel.-Tabaksorten ein spezielles Bakterium (Mikrokokkus) immer dann isoliert werden, wenn diese einem hohen PtA-Sporendruck (7) ausgesetzt waren und die beschriebenen rezistenzauslösenden Substanzen synthetisierten. In weiteren Untersuchungen, die in Abbildung 3 zusammengefaßt sind, wurde geprüft, inwieweit dieses Bakterium spezielle Nährstoffansprüche stellt, die in Zusammenhang mit den rezistenzauslösenden Substanzen stehen, was ermöglichen würde, ganzjährig die Wirkung des die PtA-Resistenz auslösenden Prinzips zu prüfen.

In mikrobiologischen Untersuchungen wurde festgestellt, daß nach Isolierung dieses Mikrokokkus spez. von PtA-infizierten Bel.-61-Typen jener sich auf rein anorganischem Nährboden nach Omelianski (10) normal weiterentwickelt. Nach mehrmaligen Überimpfungen auf diesem Nährboden blieb jedoch dieses Wachstum aus, was anzeigte, daß spezielle Reservestoffe aufgebraucht wurden und diese durch den Organismus aus dem definierten Nährboden nicht synthetisiert werden können.

Erst nach Zugabe von Difco-Hefeextrakt konnte wieder

ein normales Wachstum erreicht werden. Um zu prüfen, welche Verbindungen hierfür notwendig sind, wurde Difco-Hefeextrakt in Sephadex-G-25 säulenchromatographisch aufgetrennt, die einzelnen Fraktionen wurden sterilisiert und wieder mit dem an den notwendigen Reservestoffen verarmten Mikrokokkus beimpft. Hierbei zeigte sich sehr deutlich, daß die für die Weiterentwicklung notwendigen Stoffe nur in einer Fraktion (7) beinhaltet sind. — Die für das Wachstum notwendige Temperatur beträgt 37° C. Positive Befunde stellen sich bereits nach 18 Stunden ein. Die Ergebnisse sind deutlich makroskopisch sichtbar und können auf Grund einer spektralphotometrischen Trübungsmessung exakt bestimmt werden. — Nach Durchführung der oben angeführten Analysen wurde festgestellt, daß es sich hierbei um die gleichen Verbindungen wie die von den unter Sporendruck stehenden resistenten Bel.-Sorten isolierten Verbindungen handelt. Eine Überprüfung dieser Hefesubstanzen im Kotyledonentest der Landesanstalt (9) bei den 100⁰/oig PtA-anfälligen Tabaksorten „Badischer Geudertheimer“, „Badischer Burley E“ und „Virgin SCR“ erbrachte die gleiche rezistenzauslösende Wirkung wie die der aus den resistenten Bel.-Sorten isolierten Verbindungen. Zur Anwendung gelangten hierbei für 100 Kotyledonen — 100 Tabaksamen werden pro Testschale eingebracht — ca. 10 mg auf Trockenmasse berechnet, wodurch diese Substanzen gegenüber dem einzelnen Kotyledonenpflänzchen (ca. 0,15 mg Trockenmasse) Übergewicht vorliegen.

Weitere Untersuchungen in dieser Richtung lassen erkennen, daß darüber hinaus eine kurative Beeinflussung möglich ist, welche bis 48 Stunden nach erfolgter Infektion anhält; auch kann die Zugabe dieser Substanzen zum Kotyledonentest bereits nach der ersten Wurzelbildung, welche bei den angegebenen Testtemperaturen ca. 2 Tage nach Einlage der Samen erfolgt, mit gleichem Erfolg vorgenommen werden. In Erweiterung der in Abbildung 2 dargestellten erfolgreichen zweimonatigen Ergebnisse blieb bei einem ersten Feldversuch 1971 in Forchheim, der mit der Sorte „Badischer Geudertheimer“ unter optimalen Klimabedingungen für PtA (Waldnähe und Beregnung) durchgeführt wurde, wobei am 26. 7. natürliche Peronospora auftrat (Abb. 3), diese hochanfällige Tabaksorte bis über die Oberguternte hinaus völlig PtA-frei.

Die Entdeckung dieses Mikrokokkus spez. hat es ermöglicht, die Arbeiten zu beschleunigen, da nun für viele biochemische Untersuchungen PtA nicht mehr notwendig ist.

Difco-Hefeextrakt, welcher von der Firma „Difco Laboratories“, Detroit 1, Michigan, USA, unter der Nr. 0127–02 („Difco-Bacto-Yeast-Extract Certified“) hergestellt wird, stellt ein reines stark hygroskopisches Naturprodukt dar, welches speziellen Garantieprüfungen unterliegt. Trotz trockener und kühler Aufbewahrung findet ein langsamer Abbau vieler vorhandener Vitamine, Co-Vitamine, freier Aminosäuren und anderer biologisch wirksamer Verbindungen statt, so daß nach ca. 6 Monaten neue Präparate Verwendung finden müssen. Trotz garantierter Einhaltung der Qualitätsforderungen durch die Herstellerfirma wurden für den

eigenen speziellen Gebrauch Serienunterschiede festgestellt, welche in Veränderungen der Farbe und der innermolekularen Zusammensetzung auftreten, was natürlich zum Wechsel der für diese Arbeiten notwendigen Sephadex-Trennfractionen führt. Trotzdem konnten in der für die eigenen, hier beschriebenen Untersuchungen notwendigen Zeitperiode, die sich über mehrere Jahre erstreckt, aus allen Difco-Serien Fraktionen gefunden werden, die positive Befunde gegen PtA erbrachten, was von Hefeextrakten anderer Hersteller nicht gesagt werden kann.

Die chromatographische Voruntersuchung erlaubt es heute bereits, mittels der angeführten Untersuchungsmethoden, ohne biologische bzw. mikrobiologische Testung die PtA-resistenzauslösende Fraktion, auch wenn diese Eiweiß- oder Peptid-Charakter besitzt, sicher zu identifizieren.

Difco-Hefeextrakt stellt somit ein immer erhältliches Präparat dar, auf das jederzeit für derartige Untersuchungen und Applikationen zurückgegriffen werden kann, was für den zukünftigen Einsatz sehr wichtig erscheint.

Inwieweit nach Zugabe der die PtA-Resistenz auslösenden Fraktion zum Kotyledonentest fermentgesteuerte Hydrolysen oder Teilhydrolysen beteiligt sind, bedarf weiterer Untersuchung.

DISKUSSION

Die vorliegenden Ergebnisse, welche sich mit dem biochemischen Verhalten der PtA-resistenten Bel.-Tabaksorten befassen, zeigen sehr deutlich, daß man von immunbiologischen Vorgängen sprechen kann. Die mit dem Parasiten noch nicht in Kontakt gekommene Wirtszelle befindet sich in einem immunbiologisch indifferenten Zustand. Erst mit der Infektion entscheidet es sich, ob die Pflanze mit der bekannten, genetisch kontrollierten Hypersensibilitätsreaktion den Angriff des Parasiten aufzuhalten vermag. Im Laufe der Interaktion zwischen Parasit und resistentem Wirt entsteht eine biochemisch wirksame Verbindung, welche auf den Erreger eine wachstumshemmende Wirkung ausübt. Diese Hemmstoffe werden im pflanzlichen Bereich allgemein als Phytoalexine (PA) bezeichnet. Eine umfassende Darstellung und Zusammenfassung der in geringer Anzahl vorliegenden Arbeiten über diese Phytoalexine in Sicht einer allgemeinen Immunbiologie hat Müller (11) 1969 gegeben.

Bereits 1938 berichtete Gäumann (12) über Immunitätsprobleme bei Pflanzen. Diese Arbeiten wurden nach 1945 vom Autor erweitert fortgeführt (13), wobei über induzierte Abwehrreaktionen bei Pflanzen (14) und später über induzierte Abwehrreaktionen bei Orchideen (15) berichtet wurde. 1959 erschien von diesem Autor eine weitere Veröffentlichung über chemische Abwehrreaktionen bei Orchideen (16).

Die eigenen Ergebnisse bei den Bel.-Sorten bestätigten, daß diese Tabaksorten sich des Angriffes von PtA mittels einer biochemischen Reaktion zu erwehren vermögen, die durch den eingreifenden Pilz ausgelöst zur schnellen Bildung der identifizierten Verbindungen führt,

welche den Befall von PtA verhindern. — Nach Müller sind die Phytoalexine als Endprodukte einer archaischen und dem Pflanzenbereich eigentümlichen Abwehrreaktion zu deuten.

Unsere Untersuchungen zeigen darüber hinaus an, daß jene biochemischen Verbindungen, PtA-anfälligen Tabaksorten einmal über die Kotyledonenwurzeln gegeben, ebenfalls die PtA-Resistenz auslösen und nicht wirtsspezifisch sein müssen, was durch die Zugabe der aus Difco-Hefeextrakt isolierten gleichwertigen Verbindungen erreicht und bestätigt wurde. Diesen Verbindungen kommt auf Grund der übergewichtigen Menge eine „Starterwirkung“ zu, welche Stoffwechselvorgänge, besonders im Bereich der Riboflavin-Synthese, in andere Bahnen lenkt, wobei andere Zwischenprodukte gebildet werden, welche der obligate Parasit nicht für den Aufbau seiner eigenen Riboflavin-Synthese verwenden kann, womit er zum Absterben verurteilt ist. Bei den für den Difco-Hefeextrakt genutzten Heferassen wird jedoch dieser die PtA hemmende Syntheseweg eingehalten, das gleiche gilt für den Syntheseweg bei den PtA-infizierten Bel.-Typen.

Außerdem konnte im Rahmen der Kotyledonenteste eine kurative Wirkung festgestellt werden, welche nach erfolgter PtA-Infektion noch 48 Stunden wirksam ist, während die PtA-Infektion unter den obenangeführten optimalen Bedingungen nur 3,5 Stunden benötigt. Erst nach 48 Stunden verliert die anfällige Kotyledonenpflanze das Vermögen, die biochemisch ausgelöste Resistenz auszuführen.

Schließlich konnte in einem allerdings nur einjährigen Feldversuch in Forchheim, bei welchem am 23. Juli 1971 natürlich Peronospora auftrat, bei der Sorte „Badischer Geudertheimer“, nachdem bei diesen Pflanzen im Kotyledonenstadium eine einmalige Behandlung mit der angeführten Hefeextraktfraktion durchgeführt wurde, trotz günstiger Infektionsbedingungen, was durch Waldnähe und den Einsatz der künstlichen Feldberegnung gewährleistet war, keinerlei PtA-Befall — über die Ernte hinaus — festgestellt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß bei den PtA-hochanfälligen deutschen Gebrauchssorten durch eine einmalige Zugabe der resistenzauslösenden biochemischen Verbindungen eine Abwehr der Blauschimmelkrankheit möglich ist. Diese biochemischen Substanzen, aus PtA-resistenten Tabaksorten bzw. aus Difco-Hefeextrakt stammend, werden lediglich im Sörensen-Phosphatpuffer (1/60 m) von pH 8 zur Stabilisierung aufgenommen, wodurch keinerlei umweltschädliche Verbindungen bzw. Rückstände entstehen. Die Aufnahme dieser Verbindungen erfolgt über die Wurzeln der Kotyledonen, wobei eine systemische Wirkung erreicht wird, die sich auf die ganze auswachsende Pflanze erstreckt. Änderungen am äußeren Erscheinungsbild konnten an den Versuchspflanzen, die eine normale Blütenbildung und Blattreifung zeigten, nicht festgestellt werden.

Der Gehalt an diesen Verbindungen, die die PtA-Resistenz ausmachen, kann in behandelten anfälligen Tabakpflanzen während ihrer Entwicklung durch die angeführten chemischen Analysen oder durch das spezielle Bakterium nachgewiesen werden.

In weiteren Arbeiten soll geprüft werden, inwieweit diese Anwendung im praktischen Tabakanbau durchzuführen ist, um dadurch das Rückstandsproblem der Dithiocarbamate auszuschalten. Auch ist eine weitere Verbesserung der Trennungsmethoden mittels Fermenthydrolysen oder Teilhydrolysen erstrebenswert, um so zu hochwirksamen ballastfreien Fraktionen bzw. Anwendungsgemischen zu kommen.

Die hier angeführten Ergebnisse können sicherlich auch in anderen Bereichen der Landwirtschaft Anwendung finden.

ZUSAMMENFASSUNG

Seit 1960 tritt im Tabakbau von Europa und Teilen von Asien und Afrika epidemisch die Blauschimmelkrankheit auf, welche durch *Peronospora tab. Adam* (PtA) ausgelöst wird und zu hohen Verlusten führt. Alle im Anbau stehenden Sorten sind gegenüber diesem Pilz, der ein obligater Tabakparasit ist, anfällig und müssen entweder durch wöchentliche Dithiocarbamat-Spritzungen, welche Rückstände hinterlassen, prophylaktisch geschützt oder durch PtA-resistente Neuzüchtungen, welche auf *Nicotiana*-Wildformen aufbauen, ersetzt werden.

In eigenen Untersuchungen — als fünf Teilveröffentlichungen in der „Zeitschrift für Naturforschung“ publiziert — wurden bei den PtA-hochanfälligen deutschen Qualitätsanbausorten „Badischer Geudertheimer“, „Badischer Burley E“ und „Virgin SCR“ die Grundlagen für eine dritte Bekämpfungsmöglichkeit erarbeitet. Die vorliegende Arbeit enthält in zusammengefaßter Form den Stand dieser Arbeiten bis Ende 1971.

Beobachtungen ergaben, daß bei den PtA-resistenten Zuchthybriden (U. S. Bel.-61-Typen) durch PtA ebenfalls eine Infektion erfolgt, welche aber durch die Synthese von Abwehrstoffen gestoppt wird, und daß außerdem Wechselwirkungen zwischen den resistenzauslösenden Stoffen und Mikroorganismen bestehen. Die Abwehrstoffe wurden elektrophoretisch abgetrennt, chemisch erfaßt und als Nucleoprotein bzw. als Nucleotide und als eine dem Vitamin B₂ nahestehende Alloxazin-Verbindung bestimmt. Ihre Zugabe über die Wurzeln zu Kotyledonen der angeführten deutschen Qualitätsorten erzeugte in diesen über die mögliche Beobachtungszeit von 2 Monaten absolute Peronosporaresistenz, ohne äußere Veränderung der Sorten. Die Beobachtungsergebnisse sowie die Methoden zur Abtrennung der resistenzauslösenden Stoffe werden in zwei Entwicklungsabläufen dargestellt, die R_f-Werte der Alloxazin-Verbindung werden angeführt und die Ergebnisse besprochen.

Im Rahmen der Wechselwirkungen mit anderen Mikroorganismen wurde ein spezielles Bakterium (*Mikrokokkus spez.*) entdeckt, welches es ermöglichte, die die PtA-Abwehrreaktion auslösenden Substanzen auch im handelsüblichen Difco-Hefeextrakt nachzuweisen und abzutrennen. Nach Zugabe dieser abgetrennten Substanzen zu Kotyledonen der angeführten deutschen Sorten wurden die gleichen positiven Befunde bezüglich Resi-

stenzauslösung festgestellt. Diese aus Hefeextrakt stammenden Stoffe wurden chromatographisch mit den aus den Bel.-Sorten extrahierten verglichen und erwiesen sich hierbei als chemisch gleichwertig. All diese Ergebnisse sind mehrjährig gesichert. Auch eine kurative Wirkung wurde ermittelt, welche bis 48 Stunden nach erfolgter PtA-Infektion anhält.

Diese Ergebnisse mit dem speziellen Bakterium werden in einem weiteren Entwicklungsgang dargestellt. Durch das spezielle Bakterium wurden die Arbeiten, welche aus pflanzenschutztechnischen Gründen nur bis zu fünf Monate im Jahr möglich sind, stark beschleunigt.

In einem 1971 erstmals durchgeführten Feldversuch konnte, nachdem *Peronospora* natürlich auftrat, bei der Sorte „Badischer Geudertheimer“ nach einmaliger Vorbehandlung der Kotyledonen das Resistenzverhalten über die volle Tabakernte hinaus beobachtet werden.

Die Ergebnisse und ihre wissenschaftlichen Grundlagen werden diskutiert und ihre Nutzungsmöglichkeiten auch im Rahmen des Umweltschutzes angeführt.

SUMMARY

Since 1960 the blue mould disease, caused by *Peronospora tab. Adam* (PtA) and which leads to considerable losses, has been occurring epidemically in tobacco grown in Europe and parts of Asia and Africa. All varieties cultivated are susceptible to this fungus, which is an inevitable tobacco parasite, and must either be protected prophylactically by weekly spraying with dithiocarbamate, which leaves residues, or be replaced by new, PtA-resistant strains based on wild forms of *Nicotiana*.

In investigations of our own — published in 5 parts in the „Zeitschrift für Naturforschung“ — the fundamentals of a third way of combatting this disease were worked out using the very PtA-susceptible German, high-quality strains „Badischer Geudertheimer“, „Badischer Burley E“ and „Virgin SCR“. This present paper contains, summarized, the state of this work at the end of 1971.

It was observed that the PtA-resistant hybrid strains (U.S. Bel.-61 types) were also infected by PtA, but this infection was stopped by the synthesis of antibodies, and that there are reciprocal effects of the substances triggering off resistance and microorganisms. The antibodies were separated out electrophoretically, established chemically and ascertained to be nucleoprotein or nucleotides, and to be an alloxazin compound closely related to vitamin B₂. Their delivery, via the roots, to the cotyledons of the said German high-quality strains produced in them, during the 2-month observation period possible, absolute resistance to *Peronospora*, with no external change in the varieties. The observation results and the methods for separating the substances triggering off resistance are shown in two stages of development, and the results discussed.

Within the scope of the interreaction with other microorganisms a special bacteria was discovered which made it possible to also identify the substances which trigger off PtA-resistance in the commercial

Difco yeast extract, and to separate them out. After delivery of these separated substances to the cotyledons of the said German varieties, the same positive resistance-triggering results were ascertained. These substances, originating from yeast extract, were compared chromatographically with those extracted from the Bel. varieties and proved to be chemically equivalent. All these results were secured over a period of several years. A curative effect which lasted up to 48 hours after PtA infection, was established.

These results with the special bacteria are given in a later stage of development. This special bacteria (*Micrococcus spec.*) considerably accelerated the operations, which, for technical plant protection reasons, are possible only up to 5 months a year.

In a first field trial in 1971, and once *Peronospora* had occurred naturally, the resistance behaviour of var. "Badischer Geudertheimer", after a single prior treatment of the cotyledons was observed throughout the whole of the tobacco crop.

The results and their scientific fundamentals are discussed and their possible uses, also within the scope of pollution control, are listed.

RESUME

On constate depuis 1960, en Europe, et dans certaines parties d'Asie et d'Afrique, l'apparition épidémique d'une moisissure bleue sur les plantes de tabac. Cette maladie est provoquée par *Peronospora tab.* Adam (PtA) et entraîne de fortes pertes. Toutes les sortes de tabac cultivées sont attaquées par ce champignon, qui est un parasite spécifique du tabac, et doivent être traitées chaque semaine prophylactiquement par des injections de dithiocarbamates qui laissent un résidu — ou bien remplacées par de nouveaux hybrides PtA-résistants, élevés à partir des formes sauvages de *Nicotiana*.

Dans nos propres travaux, publiés en cinq parties dans le "Zeitschrift für Naturforschung", nous avons établi les bases d'une troisième possibilité pour combattre cette maladie à partir des souches allemandes très sensibles "Badischer Geudertheimer", "Badischer Burreley E" et "Virgin SCR". La présente communication résume ces travaux et les résultats jusque fin 1971.

Des observations ont montré que les souches hybrides de tabacs PtA-résistants (types U.S.-Bel.-61) sont également sujets à une infection, qui est arrêtée par la synthèse d'anticorps, et qu'il existe des interactions entre les composés amenant la résistance et les microorganismes. Les anticorps ont été séparés par électrophorèse, analysés chimiquement, et déterminés comme étant des nucléoprotéides, nucléotides et une substance alloxazine, apparentée à la vitamine B₂. Leur injection par les racines aux cotylédones des sortes allemandes décrites plus haut, a résulté en une résistance absolue au *Peronospora*, sans modification extérieure, et ce pendant les deux mois où l'observation a pu se faire. Les résultats des observations, ainsi que les méthodes de séparation des anticorps sont décrites en deux

processus expérimentaux; les valeurs R_f des composés alloxazine sont données, et les résultats sont discutés.

Dans le cadre d'interactions avec d'autres microorganismes, une bactérie particulière (*Micrococcus spec.*) a été découverte, qui a permis de déceler et de séparer les anticorps dans les extraits de levure "Difco" commerciaux. Après injection des substances extraites de ces levures, les mêmes effets positifs et la même résistance au PtA ont été démontrés. Ces substances extraites de levures ont été comparées aux anticorps provenant des sortes Bel., et trouvées chimiquement équivalentes. Tous ces résultats ont été répétés plusieurs années. Une action curative a pu être observée, durant plus de 48 heures après infection au PtA.

Les résultats avec cette bactérie spéciale sont décrits complètement. Grâce à cette bactérie, les travaux sur les plantes, qui ne sont techniquement possibles que cinq mois par an, ont été fortement accélérés.

LITERATUR

1. Lucas, G. Bl.: Diseases of tobacco; The Scarecrow Press Inc., New York & London, 1965.
2. CORESTA: Rapport général sur l'épidémie de mildiou du tabac en 1971, Paris, Déc. 1971.
3. Izard, C., Schiltz, P., et Hitier, H.: Estimation par la méthode des disques de l'efficacité "réelle" de certains traitements contre le mildiou du tabac; Ann. Inst. Exp. Tabac, Bergerac 1961, 669-673.
4. Izard, C.: The "cotyledon test" for assessing the fungicidal action of Maneb, sodium diethyl-dithiocarbamate and tanins; C. R. Acad. Agric. (frz.) 1962, 780-2.
5. Schmidt, J. A.: Bakterienantagonist von *Peronospora tabacina* Adam und biologischer Nachweis chemotaktisch wirkender keimungsauslösender Tabakinhaltsstoffe; Zeitschrift für Naturforschung 18 b (1963) 172-173.
6. Schmidt, J. A.: Wirkung von Lysozym auf *Peronospora tabacina* Adam; Zeitschrift für Naturforschung 20 b (1965) 82.
7. Schmidt, J. A.: Mikrobiologische und biochemische Untersuchungsergebnisse zur Wirkungsweise der PtA-Resistenz von Tabak (1. Mitt.); Zeitschrift für Naturforschung 23 b (1968) 1125-1126.
8. Schmidt, J. A.: Mikrobiologische und biochemische Untersuchungsergebnisse zur Wirkungsweise der PtA-Resistenz von Tabak (2. Mitt.); Zeitschrift für Naturforschung 24 b (1969) 1204-1205.
9. Schmidt, J. A.: Mikrobiologische und biochemische Untersuchungsergebnisse zur Wirkungsweise der PtA-Resistenz von Tabak (3. Mitt.); Zeitschrift für Naturforschung 26 b (1971) 1197-1198.
10. Imschenezki, A. A.: Mikrobiologie der Zellulose; Akademie-Verlag, Berlin.
11. Müller, K. O.: Phytoalexine in Sicht einer allgemeinen Immunbiologie; Zbl. Bakt. Abt. II. 123 (1969) 259-265.
12. Gäumann, E.: Immunitätsprobleme bei Pflanzen; Schweiz. Med. Wschr. 18 (1938) 10-15.

13. Gäumann, E., u. Jaag, O.: Über induzierte Abwehrreaktionen bei Pflanzen; *Experientia* 1 (1945) 21–22.
14. Gäumann, E., Braun, R., u. Bajzighes, G.: Über induzierte Abwehrreaktionen bei Orchideen; *Phytopath. Z.* 17 (1950) 36–62.
15. Gäumann, E., u. Kern, H.: Über biochemische Abwehrreaktionen bei Orchideen; *Phytopath. Z.* 36 (1959) 1–26.

Dank gebührt der Wissenschaftlichen Forschungsstelle im Verband der Cigarettenindustrie, Hamburg, welche diese Arbeiten durch eine Zuwendung für den Bau

eines PtA-sporendichten Phytotrons sehr unterstützt. Das Phytotron wird der Landesanstalt Mitte 1972 zur Verfügung stehen, und damit besteht die Möglichkeit, diese Arbeiten zu intensivieren. Darüber hinaus wird es die Anlage erlauben, anstehende Untersuchungen über die Verminderung konventioneller Fungizide durchzuführen, um die künftigen Anforderungen der Höchstmengenverordnung – Pflanzenschutz zu erfüllen.

Anschrift des Verfassers:

*Landesanstalt für Tabakbau und Tabakforschung,
7501 Forchheim, Kutschenweg 10.*