

Phyton (Austria)	Vol. 19	Fasc. 3—4	189—195	10. 9. 1979
------------------	---------	-----------	---------	-------------

## **Einfluß von Spurenelementen auf die Entwicklung von Kartoffel-X-Viren in Tomatenkallus**

Von

K. DANEK-JEZIK <sup>1)</sup>, A. GRAHSL und J. SCHMIDT <sup>2)</sup>

Mit 1 Abbildung

Eingegangen am 6. Juli 1978

### Summary

The influence of trace elements on the development of PVX in callus cultures of tomato

Tissue cultures were established from stem explants of virus-free and PVX-infected tomato plants („Rheinlands Ruhm“). There was practically no difference in primary growth. After several months in culture growth ceased with PVX-infected tissues.

PVX-infected tissue was cultivated on agar medium with concentrations of Mn and Zn from 0 to 500  $\mu$ moles and 0 to 150  $\mu$ moles, respectively. Optimum growth occurred with 100 or 200  $\mu$ moles Mn and 30 or 60  $\mu$ moles Zn. Virus titres (PVX) in sap obtained from callus tissue supplied with normal amounts of trace elements (100  $\mu$ moles of Mn, 30  $\mu$ moles of Zn) were  $\frac{1}{4}$  or  $\frac{1}{8}$ . With excess Mn (200  $\mu$ moles) and a relative lack of Zn (60  $\mu$ moles) in the nutrient medium virus titres decreased considerably in spite of undisturbed growth.

### Zusammenfassung

Es wurden Kalluskulturen von Stengelexplantaten gesunder und PVX-kranker Tomatenpflanzen („Rheinlands Ruhm“) angelegt. Im Anfangswachstum zeigte sich kein wesentlicher Unterschied. Nach einigen Monaten Kulturdauer stellte das PVX-infiizierte Gewebe das Wachstum ein.

PVX-infiiziertes Gewebe wurde auf Agar-Nährböden mit Mn-Konzentrationen von 0—500  $\mu$ Mol und Zn-Konzentrationen von 0—150  $\mu$ Mol kultiviert.

<sup>1)</sup> Dr. K. DANEK-JEZIK, Institut für Pflanzenphysiologie, Abteilung Anatomie und angewandte Pflanzenphysiologie der Universität Wien, Leiter: o. Prof. Dr. H. SCHINDLER, Dr.-Karl-Lueger-Ring 1, A-1010 Wien.

<sup>2)</sup> Ing. A. GRAHSL und Dipl.-Ing. J. SCHMIDT, Institut für Landwirtschaft der Österreichischen Studiengesellschaft für Atomenergie Ges. m. b. H., Leiter a. o. Prof. Dipl.-Ing. Dr. E. HAUNOLD, Forschungszentrum, A-2444 Seibersdorf.

Das Wachstum war optimal bei 100 oder 200  $\mu\text{Mol Mn}$  und 30 oder 60  $\mu\text{Mol Zn}$ . Der Virustiter (PVX) betrug im Preßsaft von Kallus bei normaler Spurenelementversorgung (100  $\mu\text{Mol Mn}$ , 30  $\mu\text{Mol Zn}$ ) etwa  $\frac{1}{4}$  bis  $\frac{1}{8}$ . Bei Mn-Überschuß (200  $\mu\text{Mol}$ ) und mäßiger Zn-Versorgung (60  $\mu\text{Mol}$ ) war trotz ungestörten Wachstums ein deutliches Absinken des Virustiters zu beobachten.

### Einleitung

Es ist bekannt, daß Nukleinsäuren bestimmte Kationenbindungsaffinität zuzuschreiben ist (ZUBAY & DOTY 1958, SHACK & BYNUM 1959 sowie ALTMANN *et al.* 1964). Der Ersatz von Wasserstoffbrücken durch Schwermetallionen wurde von YAMANE & DAVIDSON (1962) und die Bindung an Zucker von CHARLEY *et al.* (1963) beschrieben. Schließlich ist auch noch die Möglichkeit der Komplexbildung eines Metalles mit Base und Phosphorgruppe als Liganden gegeben, wie von SMITH & ALBERTY (1956) sowie von ALTMANN, STEHLIK & KAINDL (1963) nachgewiesen wurde.

Untersuchungen von CHEO, FRISSEN & SINSHEIMER (1959) an TMV-RNS zeigten, daß die Infektivität vom Spurenelementgehalt dieser Nukleinsäure beeinflußt wird und daß hierin zwischen Wirts-RNS und Viren-RNS ein Unterschied bestehen muß, da die TMV-RNS durch Metallionen stabilisiert werden konnte. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch ALTMANN, STEHLIK & KAINDL (1965) bei Versuchen an TMV-RNS mit Cu-, Zn- und Mn-Ionen. Auch an Versuchen mit Kartoffel-X-Virus (PVX) fehlt es nicht (SHALLA & PETERSON 1973). An Tomatenkallus wurde von MURAKISHI (1965, 1968) mit TMV gearbeitet. In dieser Arbeit soll die Beziehung zwischen Tomatenkallus und den Ionen Mn sowie Zn überprüft werden.

### Material und Methode

#### Kalluskulturen

Stengelexplantate von (mit PVX infizierten) Tomatenpflanzen der Sorte „Rheinlands Ruhm“ wurden auf dem Nährmedium nach MURASHIGE & SKOOG (1962) mit je 1 ppm Indol-Essigsäure (IES), Naphthyl-Essigsäure (NES), Gibberellinsäure ( $\text{GA}_3$ ) und Kinetin kultiviert (DANEK-JEZIK & SCHMIDT 1979). Bei den Versuchen wurden die Konzentrationen der Spurenelemente Mn und Zn modifiziert. Es wurden Spurenelementlösungen ohne diese Elemente sowie bis zum Fünffachen der Normalkonzentration (100  $\mu\text{M MnSO}_4$  bzw. 30  $\mu\text{M ZnSO}_4$ ) verwendet. Alle Versuche wurden sowohl mit primärem Kallus (vom Stengelexplantat abgetrennt) als auch mit sekundärem Kallus (nach einer weiteren Passage) durchgeführt. Zur Bestimmung des Wachstums wurde eine optische Klassifizierung angewendet, die eine rasche Beurteilung auch von einer großen Anzahl von Kalluskulturen gestattet und die Kultur in ihrer weiteren Entwicklung nicht stört. Folgende Wachstumsklassen kamen zur Anwendung:

- tot — abgestorbene Explantate,
- $\text{K}_0$  — Explantat ohne Kallusansatz,

- $K_1$  — geringer Kallusansatz an einzelnen Stellen des Explantates,  
 $K_2$  — mäßige Kallusentwicklung an mehreren Stellen,  
 $K_3$  — Kallusbildung auf der gesamten Oberfläche des Explantates,  
 $K_4$  — starkes Kalluswachstum.

Um zu einem Kallusgewebe mit möglichst gleichmäßigem Virusbefall zu kommen, wurden Kalluskulturen von PVX-kranken Stengeln angelegt. 10–12 Wochen alte Pflanzen wurden mit Karborundumpulver an drei verschiedenen Blättern sowohl an der Blattunterseite wie auch an der Blattoberseite verletzt und an dieser Stelle mit zwei Tropfen zentrifugiertem Preßsaft von PVX-kranken Kartoffelpflanzen betupft. Nach 14 Tagen wurde der Virustiter aus Fiederblättchen bzw. aus Stengelausschnitten bestimmt. Der Virustiter in den Fiederblättchen betrug maximal  $1/_{256}$ , im Durchschnitt  $1/_{64}$ . In den Stengeln konnte zumeist nur ein Titer von  $1/_{8}$ , gelegentlich von  $1/_{16}$  erreicht werden. Bei den Pflanzen zeigten sich starke Symptome wie Blattvergilbung, Ertragseinbuße und rasche Alterung.

### Ergebnisse und Diskussion

Das Kalluswachstum ist naturgemäß relativ großen Schwankungen unterworfen. Die Kallusentwicklung PVX-kranker Stengelexplantate auf dem Normalmedium verlief zunächst wie bei gesundem Ausgangsmaterial mit teilweise starkem Wachstum. Nach 8 Wochen wurde das primäre Kallusgewebe abgetrennt und serologisch untersucht bzw. überimpft. Der Primärkallus zeigte häufig einen Titer bis zur Stufe  $1/_{8}$ . Der weiter kultivierte (sekundäre) Kallus wurde in regelmäßigen Abständen von 5 Wochen überimpft bzw. einem serologischen Test unterworfen. Dabei zeigte sich, daß im Gegensatz zu gesunden Kulturen der PVX-befallene Sekundärkallus etwa nach der 3. bis 4. Passage das Wachstum komplett einstellte. Demzufolge war auch meist nur eine geringe Viruskonzentration mit einem Titer bis  $1/_{2}$  feststellbar. Die starke Beeinträchtigung der Kallusentwicklung bei einer Virusinfektion ist in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von CHANDRA und HILDEBRANDT (1966).

Die Versuche mit verschiedenen Mangankonzentrationen zeigten, daß sowohl beim primären als auch beim sekundären Kallus eine Mn-Konzentration von 500  $\mu$ Mol im Nährboden das Kallusgewebe zumeist zum Absterben brachte (Tab. I). Die überlebenden Gewebe kamen kaum über die Stufe  $K_1$  hinaus. Bei den Ansätzen ohne Mangan war zwar der Prozentsatz der abgestorbenen Explantate geringer, aber auch hier zeigte sich nur in wenigen Fällen mäßiges Kalluswachstum. Unter diesen schlechten Wachstumsbedingungen erscheint eine Aussage zur Virusvermehrung kaum mehr sinnvoll. Die parallelen serologischen Tests zeigten auch eine negative oder nur schwache Reaktion bei unverdünntem Preßsaft. Ein Chi-Quadrat-Test zur Überprüfung von Unterschieden in der Häufigkeit der einzelnen Wachstumsklassen bei verschiedenen Mangankonzentrationen im Nährmedium

Tabelle 1

Kallusentwicklung bei steigender Mn-Konzentration im Nährboden  
(Häufigkeit je Wachstumsklasse)

## a) Primärkallus

Mn $\mu$ Mol	tot	K <sub>0</sub>	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>	K <sub>4</sub>
—	3	9	9	1	—	—
100	—	—	—	6	7	8
200	—	—	2	3	8	5
500	11	8	1	1	—	—

## b) Sekundärkallus

Mn $\mu$ Mol	tot	K <sub>0</sub>	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>	K <sub>4</sub>
—	4	10	12	2	—	—
100	—	—	—	6	4	8
200	—	—	2	5	10	5
500	11	7	2	2	—	—

brachte sowohl beim primären als auch beim sekundären Kallus ein höchst signifikantes Ergebnis ( $\chi^2_{15} = 91$  bzw. 96). Der Virustiter erreichte nur bei der Normalkonzentration maximal  $1/16$ . Darüber fiel er stark ab.

Auch bei den Versuchen mit verschiedenen Zinkkonzentrationen zeigten die Wachstumsanalysen sowohl bei primärem als auch bei sekundärem Kallus signifikante bzw. hochsignifikante Unterschiede. Das Kallusgewebe scheint in seiner Entwicklung durch höhere Zinkmengen eher gehemmt zu werden, was sich vor allem beim sekundären Kallusgewebe deutlich bemerkbar machte (Tab. 2). Fast unabhängig davon erreichte der

Tabelle 2

Kallusentwicklung bei steigender Zn-Konzentration im Nährboden  
(Häufigkeit je Wachstumsklasse)

## a) Primärkallus

Zn $\mu$ Mol	tot	K <sub>0</sub>	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>	K <sub>4</sub>
—	—	2	4	12	5	1
30	—	—	1	17	5	1
60	—	1	—	8	9	5
150	—	3	6	8	6	1

## b) Sekundärkallus

Zn $\mu$ Mol	tot	K <sub>0</sub>	K <sub>1</sub>	K <sub>2</sub>	K <sub>3</sub>	K <sub>4</sub>
—	2	4	9	5	3	—
30	—	2	5	13	4	—
60	—	—	2	13	5	4
150	1	1	5	16	1	—

Virustiter im Kallusgewebe zumeist die Stufe  $\frac{1}{4}$ , was ungefähr der Virusentwicklung im normalen Medium entspricht. Eine Zinksteigerung bei normaler Manganversorgung bringt demnach nur geringe Änderungen im Virustiter, die etwa dem Wachstumsverlauf entsprechen.

Zur Überprüfung möglicher Wechselwirkungen zwischen dem Mangan- und dem Zinkgehalt in der Nährlösung wurde ein Kombinationsversuch angesetzt. Der Versuch wurde mit Primärkallus durchgeführt, da dieser stärkere Wachstumsreaktionen zeigt. Bestimmt man den Median der Wachstumsklassen (jene Wachstumsklasse, in der bei Aufsummierung der

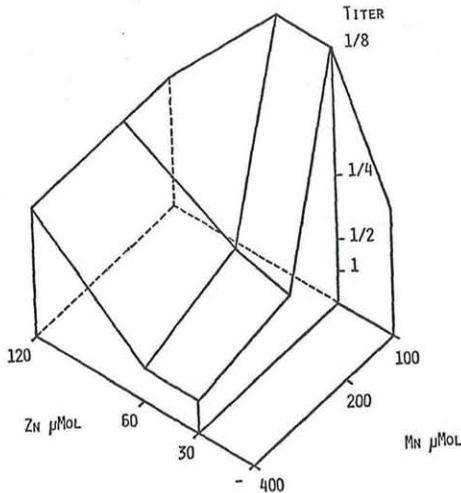


Abb. 1. Virustiter (PVX) in primären und sekundären Kalluskulturen von Tomate in Abhängigkeit von der Mn- und Zn-Konzentration des Nährbodens

einzelnen Häufigkeiten die Hälfte der Beobachtungen erreicht wird) so erhält man in allen Fällen die Wachstumsklasse  $K_2$ , außer bei der Behandlung mit doppelter Mn-Menge und normaler Zn-Konzentration; in diesem Falle ist der Median in der Wachstumsklasse  $K_3$  zu finden. In Tab. 3 sind die Medianwerte des Wachstums sowohl für den Mn-Zn-Kombinationsversuch als auch für alle anderen Versuche zusammengestellt. Es zeigt sich dabei eine gleichmäßige Verteilung mit Ausnahme der bereits vorhin besprochenen Extremwerte bei Mn-Mangel und nach Behandlung mit der fünffachen Mn-Konzentration.

In Abb. 1 wird dem Wachstum der durchschnittliche Virustiter in den wichtigsten Behandlungskombinationen aus allen Versuchen gegenübergestellt. Man kann dabei eine Gruppe von Behandlungen herausgreifen, in denen im Verhältnis zu Zn starker Mn-Überschuß besteht. Es sind dies die Behandlungen mit 2 bis 4facher Mn-Versorgung und normaler bis

doppelter Zn-Versorgung, wo ein Abfallen des Virustiters gegenüber den anderen Behandlungskombinationen deutlich zu ersehen ist. Wie die Untersuchungen von ALTMANN, STEHLIK & KAINDL (1965) bei TMV an Tabak zeigen, übersteigt in den Nukleinsäuren der Zn-Gehalt jenen des Mn, insbesondere in der TMV-RNS. Nimmt man ähnliche Verhältnisse für PVX an, so kann die Beeinträchtigung der Virusvermehrung durch das ungünstige Mn-Zn-Verhältnis hervorgerufen worden sein.

Tabelle 3

Mittlere Wachstumsklassen (Median) in primären und sekundären Kalluskulturen in Abhängigkeit von der Mn- und Zn-Konzentration des Nährbodens (Erste Zeile Primärkallus, zweite Zeile Sekundärkallus; jeweils in der Reihenfolge Mn-Versuch, Zn-Versuch, Mn-Zn-Versuch)

Zn μMol	—	100	Mn μMol 200	400	500
—		— K2 —			
		— K1 —			
30	K0 — —	K3 K2 K2	K3 — K3	— — K2	tot — —
	K0 — —	K3 K2 —	K3 — —	— — —	tot — —
60		— K3 K2	— — K2	— — K2	
		— K2 —	— — —	— — —	
120		— — K2	— — K2	— — K2	
		— — —	— — —	— — —	
150		— K2 —			
		— K2 —			

## Literatur

- ALTMANN H., KAINDL H., FRISCHAUF H. & KAINDL K. 1964. Über die Bindung von Metallionen an Nukleinsäuren. — SGAE-Report 14: 1—6.
- ALTMANN H., STEHLIK G. & KAINDL K. 1963. The use of neutron activation analysis in the determination of trace elements in nucleic acids. — 3<sup>e</sup> Coll. Intern. de Biol. de Saclay.
- ALTMANN H., STEHLIK G. & KAINDL K. 1965. Untersuchungen zur unterschiedlichen Virusresistenz junger und alter Pflanzengewebe. — 2nd Meeting, Federation of European Biochemical Societies, Vienna, A 23.
- CHANDRA N. & HILDEBRANDT A. C. 1966. Growth in microculture of single tobacco cells infected with tobacco mosaic virus. — Science 152: 789—791.
- CHARLEY P. J., SARKAR B., SITT C. F. & SALTMANN P. 1963. Chelation of iron by sugars. — Biochim. et Biophys. Acta 69: 313.
- CHEO P., FRISSEN B. C. & SINSHEIMER R. L. 1959. Biophysical studies of infections with nucleic acid from tobacco mosaic virus. — Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 45: 305.

- DANEK-JEZIK K. & SCHMIDT J. 1979. Untersuchungen zum Kalluswachstum und zur Regeneration von *Lycopersicon esculentum*. — *Phyton* (Austria) 19: 175—179.
- MURAKISHI H. H. 1965. Survival of dissociated tomato-callus cells inoculated with TMV. — *Virology* 27: 236—239.
- 1968. Infection of tomato-callus cells in suspension with TMV—RNA. — *Phytopathology* 58: 993—996.
- MURASHIGE T. & SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. — *Physiol. Plant.* 15: 473—497.
- SHACK J. B. S. & BYHUM B. S. 1959. Determination of interaction of desoxyribonuclease and magnesium ions by means of a metalion indicator. — *Nature* 184: 635.
- SHALLA T. A. & PETERSEN L. J. 1973. Infection of isolated plant protoplasts with potato virus X. — *Phytopathology* 63: 1125.
- SMITH R. M. & ALBERTY R. A. 1956. The apparent stability constants of toxic complexes of various adenosines. — *J. Amer. Chem. Soc.* 78: 2376.
- STEHLIK G. & ALTMANN H. 1963. Die Anwendung der Neutronenaktivierungsanalyse auf Spurenelementuntersuchungen in Nukleinsäuren. — *Monatshefte d. Chemie* 94: 1163.
- YAMANE T. & DAVIDSON N. 1962. On the complexing of desoxyribonucleic acid by silver (I). — *Biochim. et Biophys. Acta* 55: 609.
- ZUBAY G. & DOLY P. 1958. The interaction of nucleic acid with magnesium ions. — *Biochim. et Biophys. Acta* 29: 47.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Phyton, Annales Rei Botanicae, Horn](#)

Jahr/Year: 1979

Band/Volume: [19\\_3\\_4](#)

Autor(en)/Author(s): Danek-Jezik K., Grahl A., Schmidt J.

Artikel/Article: [Einfluß von Spurenelementen auf die Entwicklung von Kartoffel-X-Viren in Tomatenkallus. 189-195](#)