

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Resistenzgenetik, Grünbach

## Methode zur relativen Konzentrationsbestimmung von Fusarium-Toxinen durch Messung der Respirationsrate

Measurement of the respiration rate for the determination of relative concentrations of Fusarium toxins

R. Schuchmann

### Zusammenfassung

Die relative Konzentration von Toxinen, die *Fusarium*-Spezies während der Kultur auf definierten Nährmedien abgeben, wurde mit Hilfe einer O<sub>2</sub>-Elektrode aufgrund der verminderten Respirationsrate von Kartoffel-Suspensionskulturen bestimmt. Versuche mit spezifischen Hemmstoffen der Atmungskette machten deutlich, daß es sich bei der gefundenen Hemmung um einen unspezifischen Effekt der/des Toxine(s) handelt.

Die Methode kann genutzt werden, um in Versuchen zur Selektion auf *Fusarium*-Resistenz mittels Toxinen die Toxin-konzentration reproduzierbar einzustellen.

### Abstract

The relative concentration of toxins produced by *Fusarium* species during culture on defined media was estimated by measuring the decrease of the respiration rate of potato cell suspensions using an O<sub>2</sub>-electrode. Addition of specific inhibitors of respiration demonstrated that the inhibition was due to an unspecific effect of the toxin(s). The procedure can be used to standardize the *Fusarium* toxin concentration in selection experiments for *Fusarium*-resistance.

### Einführung

Die Pathogenität vieler Krankheitserreger beruht auf einer Schädigung des Wirts durch die Abgabe von Toxinen; eine inkompatible Wirt-Pathogen-Reaktion kann in solchen Fällen auf einer Resistenz des Wirts gegenüber dem Toxin des Pathogens beruhen. Sofern sich das Toxin oder eine toxische Fraktion isolieren läßt, kann unter Ausnutzung dieses Resistenzmechanismus auf krankheitsresistente Genotypen selektiert werden, und zwar nicht nur an der ganzen Pflanze (HEITFUSS und WILLIAMS, 1976), sondern auch in Zell- und Gewebekulturen (WENZEL, 1985). Um derartige Selektionssysteme reproduzierbar einsetzen zu können, muß in der Regel die Toxinaktivität bestimmt werden, da die Toxinproduktion meist qualitativ und quantitativ von den Kulturbedingungen, wie z. B. Nährmedium, Temperatur und Kulturdauer, abhängig ist (DURBIN, 1981). Nur in wenigen Fällen ist die Toxinzusammensetzung chemisch aufgeklärt, so daß meist nur die relative Toxinkonzentration ermittelt werden kann. Hierzu eignen sich einerseits *In-vivo*-Tests (Messung der Hemmung des Wurzelwachstums, Auswertung nekrotischer Reaktionen, Stärke der Pollenkeimung oder Messung der CO<sub>2</sub>-Fixierung in Blättern) und andererseits *In-vitro*-Tests. Die *In-vivo*-Test-

systeme haben meist den Nachteil, daß zwischen Toxinapplikation und Versuchsauswertung mehrere Tage bis Wochen vergehen und oft hohe, z. T. unphysiologische Toxinkonzentrationen eingesetzt werden müssen.

*In-vitro*-Systeme bauen auf schnelleren physiologischen Parametern auf und sind besser kontrollierbar. Allerdings sind auch derartige Reaktionen nicht immer spezifisch, wie z. B. die Erhöhung der Permeabilität pflanzlicher Membranen nach Toxinzugabe, die als Erhöhung der Leitfähigkeit des die Zellen umgebenden Mediums gemessen werden kann (DAMANN et al., 1974).

Unter den Erregern von Pflanzenkrankheiten spielen derartige Toxine vor allem in der Gruppe pilzlicher Pathogene eine wichtige Rolle. Sehr unterschiedliche und z. T. auch bereits definierte Toxine werden von *Fusarium*-Arten abgegeben. Bei der Kartoffel bewirken *Fusarien* wirtschaftlich gravierende Lagerfäulen (LANGERFELD, 1978). Im folgenden wird eine Methode beschrieben, mit der die relativen Toxinkonzentrationen in definierten Nährmedien von *Fusarium*-Spezies hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Kartoffel ermittelt werden können. Dabei wird die Hemmung der Atmungsaktivität von Kartoffelsuspensionskulturen mit einer O<sub>2</sub>-Elektrode nach Toxinzugabe gemessen.

### Material und Methoden

#### *Kallus und Suspensionskulturen*

Blätter der dihaploiden Kartoffelklone HH 236, HH 372 und H 75.1208/13 wurden mit 0,1 % HgCl<sub>2</sub> + 0,1 % SDS für 5 Minuten oberflächensterilisiert, in 1 cm<sup>2</sup> große Stücke geschnitten und in Petrischalen auf LS-Medium gelegt (LINSMAIER und SKOOG, 1965). Diese Blattstücke wurden zur Kallusinduktion und Kallusbildung 3 Wochen im Dunkeln bei 26 °C kultiviert. Der an den Blatträndern gebildete Kallus wurde auf ein modifiziertes MS-Medium (MURASHIGE und SKOOG, 1962) mit 2 mg/L 2.4-D + 0,5 % Kokosnußmilch überführt und alle 3 Wochen auf neues Medium umgesetzt. Zur Erstellung der Suspensionskulturen wurden Kallusstücke in 25 ml Medium (Mikro- und Makronährstoffe: MS, Vitamine: Gamborg B5 (GAMBORG und MILLER, 1968) + 0,5 mg/L 2.4-D) in 100 ml Erlenmeyerkolben überführt und auf einem Schüttler (120 rpm) im Dunkeln bei 22 °C kultiviert. Alle 10 Tage wurden die sehr feinen Suspensionskulturen mit einem Netzlöffel (Maschenweite: 0,5 mm) in neues Medium umgesetzt.

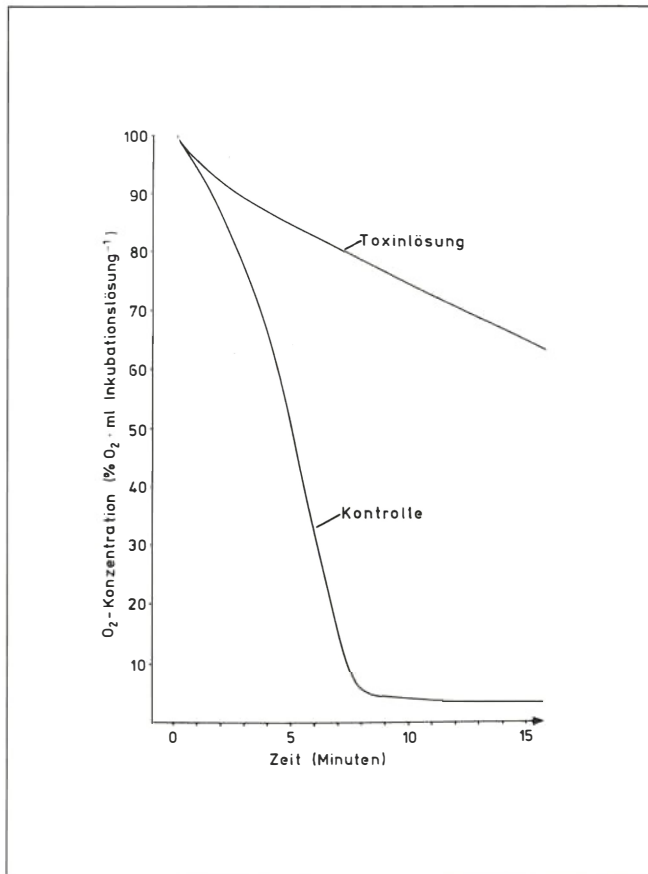
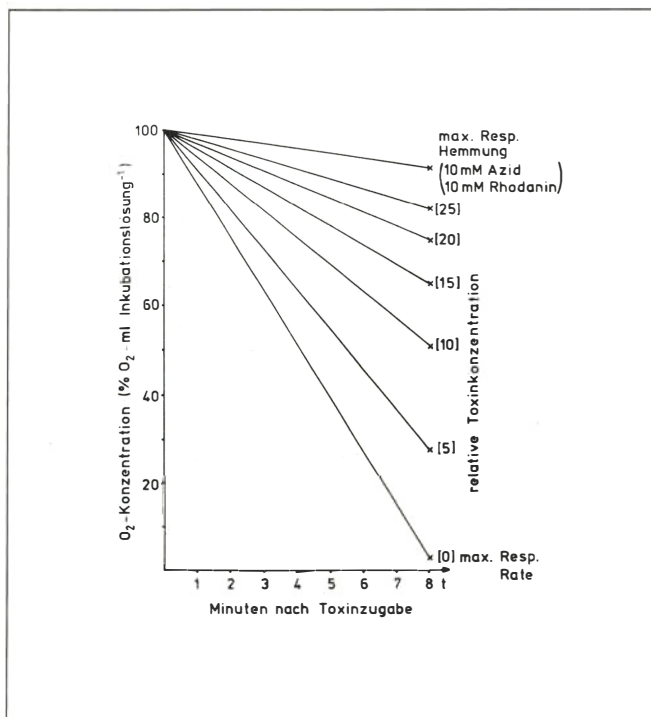


Abb. 1. Einfluß einer Toxinfraktion aus *Fusarium-oxysporum*-Kulturfiltraten auf die Respirationsrate von Kartoffelsuspensionskulturen.

Abb. 2. Änderung der Respirationsrate einer Kartoffelsuspensionskultur nach Zugabe verschiedener Toxinkonzentrationen (Toxine isoliert aus *Fusarium-oxysporum*-Kulturfiltraten).



**Pilzkulturen**

Die *Fusarium*-Arten *F. coeruleum*, *F. oxysporum* und *F. sulphureum* wurden als Erddauerkulturen von Dr. E. LANGERFELD, BBA Braunschweig, zur Verfügung gestellt. Nach zweimaliger Passage auf Agarmedium nach Czapek-Dox (MÜLLER und MELCHINGER, 1964) wurden die Konidien mit Henniger-Medium (HENNIGER, 1963) abgeschwemmt. Jeweils 50 ml Henniger-Medium in 250 ml Glasgefäßen wurden mit 1 ml Konidien suspension (10 000 Konidien/ml) angeimpft und drei Wochen im Dunkeln bei 18 °C kultiviert. Nach Zentrifugation des Pilzmyzels (13 000 rpm, 15 min) wurde der Überstand als Kulturfiltrat für die weiteren Untersuchungen verwandt.

**Toxinextraktion**

Nach Ansäuern mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 3,5 wurde das Kulturfiltrat dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten Extrakte mit verdünnter H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 3,5) gewaschen, im Rotationsverdampfer eingengt und unter N<sub>2</sub> getrocknet. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und als Toxinextrakt für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

**Kallustest**

Zur Überprüfung der vollständigen Extraktion der Toxine aus dem Kulturfiltrat wurde das modifizierte MS-Medium jeweils mit gleichen Konzentrationen des Kulturfiltrates, der daraus mit Ethylacetat extrahierten Toxinfraktion und dem nach der Extraktion verbliebenen Kulturfiltratrest versetzt. Nach 14 Tagen Kultur der Kallusstücke im Dunkeln bei 26 °C wurde die Zunahme der Frischmasse (FM) ermittelt.

**O<sub>2</sub>-Messung**

Für die Messung der O<sub>2</sub>-Konzentrationen in wäßriger Lösung kam eine O<sub>2</sub>-Elektrode (Clark-Elektrode, Rank Brothers, Cambridge, U.K.) zur Anwendung. Die Eichung der Elektrode erfolgte nach der Methode von DELIEU und WALKER (1972) und die Meßsignale wurden durch einen gekoppelten Schreiber registriert. Zur Messung wurde die Elektrodenkammer mit einer 2%igen Saccharose-Lösung (pH 5,8), 0,3 g Suspensionskultur (FM) und 100 µl Toxinlösung beschickt. Die Meßdauer betrug zwischen 8 und 20 Minuten bei 20 °C.

**Ergebnisse**

Sowohl die Kulturfiltrate als auch die daraus mit Ethylacetat extrahierten Toxinfraktionen aller drei *Fusarium*-Kulturen bewirkten eine starke Hemmung des Wachstums (d.h. der Zunahme der FM) von Kartoffel-Kalli, wenn sie in einer bestimmten Konzentration ins Nährmedium gegeben werden (Tab.1). Die extrahierte Toxinfraktion unterschied sich in ihrer Hemmung auf das Kalluswachstum nicht merklich von dem jeweiligen Kulturfiltrat. Der nach der Extraktion zurückbleibende Kulturfiltratrest bewirkte keine Wachstumshemmung mehr, damit sind die Toxine offenbar vollständig extrahiert worden.

Tab. 1. Frischmasse-(FM)-Zunahme von Kartoffel-Kalli nach 10 Tagen auf Medium mit *Fusarium*-Kulturfiltratzusatz oder einer daraus extrahierten Toxinfraktion (Kontrollkultur: FM-Zunahme: 0,55 g = 100 %)

	Kulturfiltrat	Toxinfraktion	Kulturfiltratrest
<i>F. oxysporum</i>	0,05 g (-90 %)	0,04 g (-92 %)	0,53 g (-4 %)
<i>F. coeruleum</i>	0,09 g (-83 %)	0,11 g (-80 %)	0,56 g (+2 %)
<i>F. sulphureum</i>	0,18 g (-67 %)	0,17 g (-69 %)	0,55 g (0 %)

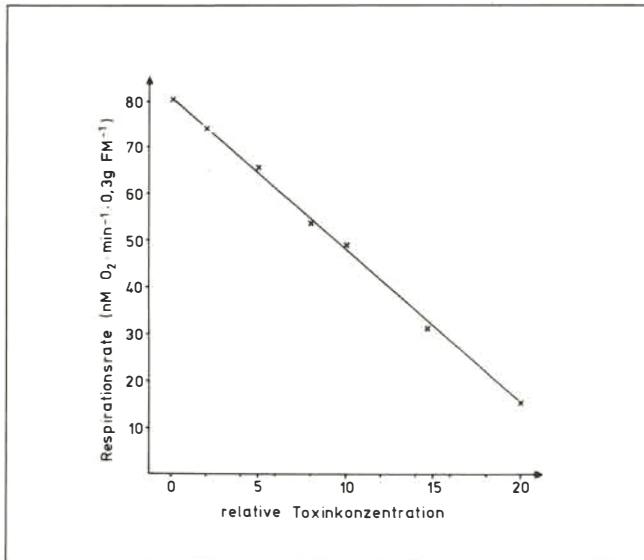


Abb. 3. Abhängigkeit der Respirationsrate einer Kartoffelsuspensionskultur von zunehmenden Toxinkonzentrationen (Inkubation mit isolierten Toxinextrakten aus *Fusarium-oxysporum*-Kulturfiltraten).

Da die Toxine aus dem Kulturfiltrat der *F.-oxysporum*-Kulturen sowohl im Kallus-Toxin-Test als auch bei den Untersuchungen mit der O<sub>2</sub>-Elektrode jeweils die stärksten toxischen Wirkungen zeigten, wird im folgenden nur noch auf die Toxine dieser Kultur eingegangen.

Die Kartoffelsuspensionskulturen wiesen im Kontrollversuch (ohne Toxine) eine hohe Respirationsrate auf; innerhalb von 8 Minuten wurde der in der Inkubationslösung vorhandene Sauerstoff bis auf einen Rest von etwa 4 % veratmet. Bei Zugabe einer Toxinfraktion aus *F.-oxysporum*-Kulturfiltraten kam es zu einer Hemmung der Atmungsaktivität, die eine direkte Abhängigkeit von der Konzentration der zugesetzten Toxinextrakte zeigte (Abb. 2). Mit der daraus erhaltenen Eichgeraden (Abb. 3) ließen sich die relativen Toxinkonzentrationen anderer Toxinaufarbeitungen des gleichen Pilzes ermitteln und durch Verdünnen oder Konzentrieren auf einen für die Selektion kritischen Toxizitätswert einstellen.

Um über die Empfindlichkeit und genotypische Abhängigkeit eines solchen Tests eine Aussage machen zu können, ist es vorteilhaft zu ermitteln, ob eine spezifische Reaktion gemessen wird oder ob die Abnahme der Atmungsaktivität auf einer komplexen Reaktion beruht, die lediglich mit der Toxinkonzentration korreliert, aber nicht kausal verknüpft ist. Dazu wurden den Kulturen verschiedene spezifische Hemmstoffe der Elektronentransportkette der oxydativen Phosphorylierung zugesetzt und deren Effekt auf die Respirationsrate mit dem Einfluß der *Fusarium*-Toxine verglichen. Um hier möglichst reproduzierbar zu arbeiten, wurde in diesem Versuchsteil als Toxin reine Fusarinsäure (Sigma, No. F-1878) eingesetzt, dem Haupttoxin aus *F.-oxysporum*-Kulturen (DOBSON, 1967). Sie hemmte im Bereich von 0,1 mM bis 10,0 mM – ebenso wie die aus *F.-oxysporum*-Kulturfiltraten extrahierten Toxine – konzentrationsabhängig die Respirationsrate.

Im Vergleich dazu bewirkte eine Inkubation der Kartoffel-Suspensionskulturen mit Hemmstoffen der Cytochrom-Oxidase keine meßbare (10 mM KCN) oder nur eine geringe Hemmung der Atmungsaktivität (10 mM Na-Azid).

Viele pflanzliche Zellen verfügen über eine alternative Elektronentransportkette, die von der Hauptkette im Bereich

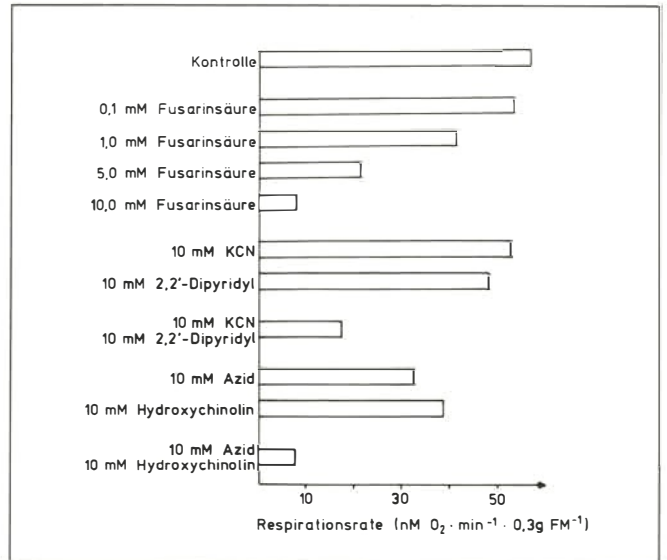


Abb. 4. Einfluß von Fusarinsäure und Elektronentransporthemmern der oxydativen Phosphorylierung auf die Respirationsrate von Kartoffelsuspensionskulturen.

des Coenzym Q abgezweigt und nicht zur ATP-Synthese genutzt werden kann (CAHILL und WESTE, 1983). Dieser KCN-resistente Nebenweg kann je nach Pflanzenmaterial unterschiedlich stark ausgeprägt sein (MOHR und SCHOPFER, 1978), so daß die Pflanzenzellen nach Blockierung der Cytochromoxidase die Atmungsaktivität über diesen Nebenweg aufrechterhalten können.

Ähnlich wie bei der alleinigen Hemmung der Cytochromoxidase bewirkt auch eine Hemmung des KCN-resistenten Nebenweges durch 10 mM Dipyridyl oder 10 mM 6-Hydroxychinolin keine drastische Änderung der Respirationsrate, da in diesem Fall der Weg über die Elektronentransportkette zur Cytochromoxidase frei ist. Erst bei gleichzeitiger Inkubation des Pflanzenmaterials mit Blockieren des KCN-resistenten Nebenweges und solchen der Cytochromoxidase (10 mM 6-Hydroxychinolin + 10 mM Na-Azid) wird die Respirationsrate ähnlich stark gehemmt wie bei der Inkubation in 10 mM Fusarinsäure.

## Diskussion

Nach Zusatz von teilgereinigten Toxinextrakten aus den *Fusarium*-Spezies *F. coeruleum*, *F. sulphureum* und *F. oxysporum* wurde in Kartoffelsuspensionskulturen eine Hemmung der Atmungsaktivität festgestellt. Ein Vergleich der Wirkungsweise auf die Respirationsrate von Fusarinsäure und dem Toxinextrakt aus dem *F.-oxysporum*-Kulturfiltrat einerseits und von Elektronentransporthemmern der oxydativen Phosphorylierung andererseits zeigt, daß die Toxine weder direkt den Weg zur Cytochromoxidase noch den KCN-resistenten Nebenweg blockieren. Auch wirken die Toxine nicht als Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung, denn es kommt zu keiner Erhöhung der O<sub>2</sub>-Aufnahme. Somit handelt es sich bei der beobachteten Hemmreaktion nicht um eine spezifische Reaktion des Toxins mit einem Enzym der Atmungskette.

Pilztoxine verursachen häufig Membranschäden, indem sie die Permeabilität verändern oder durch sonstige Membranbeeinflussungen die Zelle in ihrer physiologischen Aktivität schädigen. Dies könnte auch hier die Ursache für die unspezi-



fische Hemmung der Atmungsaktivität von Kartoffelsuspensionskulturen nach Inkubation mit Toxinextrakten aus *Fusarium*-Kulturen sein.

Mit Hilfe einer O<sub>2</sub>-Elektrode und Messung der Änderung der Respirationsrate lassen sich relative Konzentrationen von Toxinen, welche indirekt über Membraninteraktionen die Atmungsaktivität beeinflussen, schnell und einfach messen. Diese Hemmreaktion ist direkt mit der Toxinkonzentration korreliert, so daß nach Aufstellung einer Eichgeraden aus der Atmungsaktivität auf die vorhandene Toxinmenge geschlossen werden kann. Damit ermöglicht diese Methode das reproduzierbare Arbeiten mit *Fusarium*-Toxinen bei Versuchen, die eine bestimmte Toxinkonzentration erfordern (z. B. bei *In-vitro*-Selektionen auf Resistenz) oder bei der Untersuchung unbekannter toxischer Komponenten (z. B. bei Extraktions- und Reinigungsschritten).

### Literatur

CAHILL, D., G. WESTE, 1983: Changes in respiration of seedling roots inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopath. Z.* **106**, 51–62.  
DAMANN, K. E. Jr., J. M. GARDNER, R. P. SCHEFFER, 1974: An assay for *Helminthosporium victoriae* toxin based on induced leakage of electrolytes from oat tissue. *Phytopathologie* **64**, 652–654.

DELIEU, T., D. A. WALKER, 1972: An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. *New Phytol.* **71**, 201–225.

DOBSON, T. A., D. DESATY, D. BREWER, L. C. VINING, 1976: Biosynthesis of fusaric acid in cultures of *Fusarium oxysporum* Schlecht. *Can. J. Biochem.* **45**, 809–823.

DURBIN, R. D. (ed.): *Toxins in Plant Disease*. Academic Press, New York (1981).

GAMBORG, O. L., R. A. MILLER, K. OJIMA, 1968: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**, 151–158.

HEITFUS, R., P. H. WILLIAMS (ed.): *Physiological Plant Pathology*. Springer-Verlag, Berlin (1976).

HENNIGER, H., 1963: Zur Kultur von *Phytophthora infestans* auf vollsynthetischen Nährsubstraten. *Z. Allgem. Mikrobiol.* **3**, 126–135.

LANGERFELD, E., 1978: *Fusarium coeruleum* (Lib.) Sacc. als Ursache von Lagerfäulen an Kartoffelknollen. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem*, Heft 184.

LINSMAIER, E. M., F. SKOOG, 1965: Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **18**, 100–127.

MOHR, H., P. SCHOPFER: *Lehrbuch der Pflanzenphysiologie*. Springer-Verlag, Berlin (1978).

MÜLLER, J., H. MELCHINGER: *Methoden der Mikrobiologie*. Kosmos-Verlag, Stuttgart (1964).

MURASHIGE, T., F. SKOOG, 1962: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473–497.

WENZEL, G., 1985: Strategies in unconventional breeding for disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathology* **23**, (in press).

Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutz., **37** (6), S. 84–88, 1985, ISSN 0027-7479.  
© Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für biologische Schädlingsbekämpfung, Darmstadt

## Inaktivierung von Apfelwickler-Granuloseviren durch UV-Strahlung und Temperatur

Inactivation of codling moth granulosus virus by UV-irradiation and temperature

Von Eva Fritsch und Jürg Huber

### Zusammenfassung

Der Einfluß von UV-Strahlung und Temperatur auf die Aktivität von Insektenviren wurde am Beispiel des Granulosevirus des Apfelwicklers, *Cydia pomonella* (L.), untersucht.

Bestrahlungsversuche mit künstlichem UV-Licht (mit Ultravitalux-Lampen) zeigten, daß die Virusaktivität zunächst schnell, dann aber mit steigender Expositionszeit nur noch langsam abnimmt. Die ausgeplatteten trockenen Granuloseviren erwiesen sich ferner als sehr hitzeresistent. Eine Einwirkung von 75 °C während 160 min wirkte sich nicht auf die Aktivität der Viren aus.

Eine synergistische Wirkung von UV-Strahlung und Temperatur trat erst über 50 °C in Erscheinung. Bei Temperaturen, wie sie im Freiland vorherrschen, konnte ein derartiger Effekt nicht beobachtet werden.

### Abstract

The rate of inactivation of the granulosus virus of codling moth, *Cydia pomonella*, by artificial UV-irradiation, high temperatures and the combination of these two factors was determined. Exposure to UVA and UVB resulted in substantial inactivation of dry deposits of the virus, but exposure to temperatures up to 75 °C for 160 minutes produced no significant loss of activity. With high temperatures the rate of UV-inactivation was substantially increased, but this effect was significant only above 50 °C, so that it does not influence the field persistence of the virus.

Insektenviren, insbesondere Baculoviren, zeichnen sich durch eine hohe Selektivität aus und erfüllen somit in idealer Weise eine zentrale Forderung, die der integrierte Pflanzenschutz an ein modernes Insektizid stellt. Der Einsatz von Insektenviren ermöglicht eine gezielte Bekämpfung einzelner Schädlinge unter weitgehender Schonung von Umwelt und Nützlingen.