

VIRUSKRANKHEIT VON ALLIARIA  
OFFICINALIS

Mit 8 Textabbildungen und 2 Tafeln

DAVOR MILIČIĆ, MILAN PANJAN, ĐURĐA BILANOVIĆ  
und BRANKO KATIĆ

(Aus dem Botanischen Institut der Naturwissenschaftlich-mathematischen Fakultät  
und Institut für Pflanzenschutz Zagreb)

Vor drei Jahren wurde in der Umgebung von Zagreb eine große Anzahl von *Alliaria officinalis*-Pflanzen gefunden, deren Blattspreiten mit gelbgrünen Flecken bedeckt waren. Da eine solche Fleckigkeit der Blätter für viele Viruskrankheiten charakteristisch ist, wurden die anomalen Exemplare in dieser Richtung weiter untersucht. Während der mikroskopischen Untersuchung wurden besonders in ihren Blattzellen X-Körper und kristalline Einschlüsse entdeckt. Auf Grund dieser Beobachtungen konnte mit großer Wahrscheinlichkeit konstatiert werden, daß diese Pflanzen von einer Viruskrankheit leiden (Miličić, 1956 a).

Die mosaikkranken Pflanzen wurden zuerst neben den Dörfern Šestine und Gračani beobachtet, wo im Jahre 1955 ungefähr 20—30% der gesamten Pflanzen dieser Art deutliche Krankheitssymptome zeigten. Diese Mosaikkrankheit erschien in demselben Gebiete auch in den nächsten Jahren mit ungefähr gleicher Intensität. Ferner konnte von uns konstatiert werden, daß diese Virose im Dorf Vrapče bei Zagreb verbreitet ist; außerdem konnten wir im Jahre 1957 viele kranken Exemplare dieser Art unter den Pflanzen finden, die sich spontan im Botanischen Garten der Universität Zagreb entwickelt haben.

Gelegentlich der Übertragungsversuche mit *Alliaria*-Virus konnten wir feststellen, daß sich diese Virose leicht auf *Hesperis matronalis* und *Hesperis dinarica* übertragen kann. Die bei diesen Glashaus-Versuchen erreichten Erfahrungen ermöglichten uns, kranke *Hesperis*-Pflanzen auch im Offenen zu erkennen; so konnten wir konstatieren, daß fast alle in Parkanlagen des Botanischen Gartens der Universität Zagreb gezogenen *Hesperis*-Pflanzen mit *Alliaria*-Virus infiziert sind. Demzufolge scheint uns, daß diese Virose in Zagreb und Umgebung regelmäßig und häufig ist.

Von anderen Lokalitäten, in denen diese Virose verbreitet ist, werden wir zuerst die Stadt Požega in Kroatien erwähnen, wo kranke Pflanzen im Jahre 1957 beobachtet worden sind. Außerdem haben wir kranke *Alliaria*-Pflanzen auch in Wien (Dornbach) in Österreich im Jahre 1956 gefunden; da wir dabei in kranken Exemplaren X-Körper und kristalline Einschlüsse wahrgenommen haben, ist es sehr wahrscheinlich, daß sich auch bei diesen Exemplaren um dieselbe Mosaikkrankheit handelte.

### Äußere und innere Krankheitssymptome

Das *Alliaria*-Virus ist von kranken auf gesunde Pflanzen von *Alliaria officinalis* durch infektiösen Preßsaft leicht übertragbar. Die Inokulation wurde so ausgeführt, daß die Blattoberfläche mit einem Glasstabe leicht gerieben wurde, nachdem auf diese der infektiöse Saft und Karborundpuder gesetzt wurden. Nach diesem Verfahren wurden die inokulierten Pflanzen durch 24 Stunden in einem luftfeuchten Raum gehalten. Die ersten Krankheitssymptome erschienen 11 bis 14 Tage nach der Inokulation, häufig aber war die Inkubationszeit noch länger, manchmal dauerte sie auch 20 Tage. Dieser Unterschied in der Länge der Inkubation war von der Temperatur abhängig; es scheint uns, daß die optimale Temperatur für Erlangung einer kurzen Inkubation zwischen 22° und 25° C liegen dürfte.

Gelegentlich dieser Versuche gelang uns, mit dem *Alliaria*-Virus folgende Arten zu infizieren: *Hesperis matronalis*, *Hesperis dinarica*, *Nicotiana glutinosa*, *Sinapis alba*, *Sinapis arvensis* und *Capsella bursa pastoris*. Da sich die Krankheitssymptome dieser Pflanzen voneinander etwas unterschieden, werden wir im folgenden die anomalen Veränderungen bei jeder einzelnen Pflanze abge sondert beschreiben.

#### *Alliaria officinalis*

An den Blättern dieser Pflanze entsteht regelmäßig eine Mosaikfleckigkeit verschiedener Form; gelbgrüne chlorotische Blattbereiche können ziemlich groß sein, so daß sie manchmal den größeren Teil der Spreite bedecken. Diese Scheckung braucht sich nicht an allen Blättern einer infizierten Pflanze äußern, so daß manchmal einzelne Blätter ganz gesundes Aussehen behalten. Neben der Fleckigkeit erscheint häufig an den Blättern auch eine Kräuselung ihrer Oberfläche als eine weitere wichtige Charakteristik der erkrankten Pflanzen. Dieses Symptom kann manchmal fehlen, so daß dann die fleckigen Blätter eine mehr oder minder glatte Oberfläche besitzen. GleichermäÙe sind auch die Blattränder manchmal nach oben oder nach unten gerollt (drittes Erkrankungssymptom). Neben solchen Blättern mit den gerollten Spreiten ist

es möglich bei den infizierten Exemplaren auch völlig ebenflächige Blätter zu finden. Außer diesen Veränderungen kann bei den kranken Pflanzen auch ein Zurückbleiben in der Entwicklung im Vergleich mit den gesunden Exemplaren beobachtet werden.

Die ersten Zeichen der Erkrankung erscheinen nach der Inokulation an den jungen Blättern, die älteren dagegen, die sich vor der Inokulation oder während der Inkubationszeit entwickeln, bleiben auch weiter nach ihrem Aussehen ganz gesund. Aber auch nach der Entstehung der Blätter mit deutlichen Krankheitssymptomen können noch immer einzelne gesunde Blätter erscheinen.

Was die Dauer der kranken Symptome betrifft, müssen wir hervorheben, daß sich an infizierten Pflanzen, die im Gewächshaus sehr lang (ein Exemplar über zwei Jahre) gezogen wurden, noch immer deutliche Zeichen der Erkrankung finden konnten; diese Symptome waren doch etwas schwächer als am Anfang der Infektion.

Die Versuche mit *Alliaria* konnten wir nur langsam durchführen, weil wir sehr lang keine keimfähigen Samen dieser Art enthielten. Später haben wir solche bekommen, nachdem wir diese durch längere Zeit einer niedrigen Temperatur ausgesetzt haben. Was die Entwicklung der Pflanzen in Gewächshausbedingungen betrifft, so konnten diese in die reproduktive Phase nicht übergehen, sondern erneuerten ständig nur ihre basalen Blätter.

Parallel mit den angeführten äußeren Veränderungen an den Blättern entstehen auch Unregelmäßigkeiten in ihrer inneren Struktur. Die Querschnitte durch die chlorotischen Blatteile zeigen Unterschiede im Bereiche des Palisadenparenchyms. Besonders scharfe Veränderungen konnten wir an den im Glashaus gezogenen Pflanzen wahrnehmen, die infolge schlechterer Entwicklungsbedingungen dünnere Blätter enthielten. Während bei diesen Exemplaren in den grünen Blattbereichen typische Palisadenzellen vorhanden waren, diese Zellschicht konnte sich in chlorotischen Bereichen von anderen Mesophyllschichten nicht mehr unterscheiden (Abb. 1). Zum Unterschied von diesen Glashaus-Pflanzen waren die Blätter bei den im Offenen wachsenden Exemplaren besser entwickelt und viel dicker. Bei diesen Exemplaren waren die Palisadenzellen in den grünen und chlorotischen Blatteilen verlängert, aber in den ersteren waren sie viel länger als in den letzteren Bereichen. Ähnliche Veränderungen in der Größe der Palisadenzellen entstehen auch bei anderen Virus-Mosaikkrankheiten (Köhler und Klinkowski, 1954; Esau, 1944, 1956).

Außer diesen Veränderungen erscheinen bei den kranken Pflanzen auch besondere Körper im Protoplasten, die bei gesunden Pflanzen durchaus fehlen. Diese Körper wurden schon früher genauer beschrieben (Miličić, 1956 a), und zwar während einer Untersuchung, die an den kranken im Freien gesammelten Pflanzen ausgeführt wurde. Da uns jetzt Pflanzen zur Verfügung standen, die experimentell infiziert waren, konnten wir nun die Entstehungsfolge verschiedener Zelleinschlußkörper nach der Infektion genauer studieren. Wie bei anderen

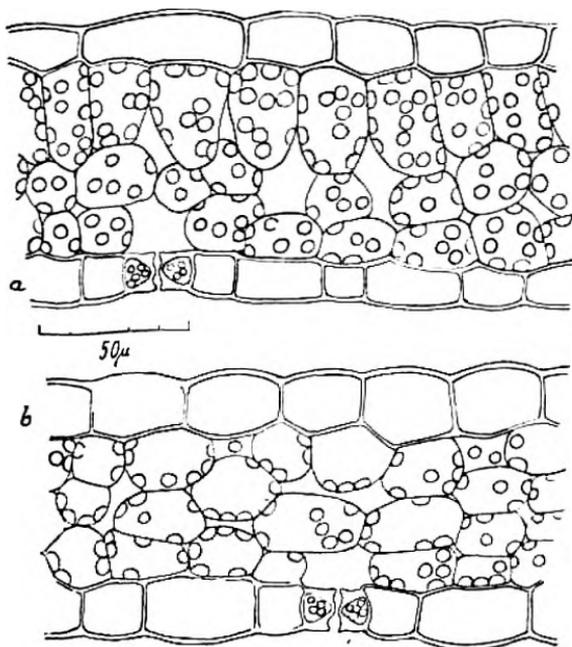


Abb. 1. *Alliaria officinalis*. Querschnitt durch den grünen (a) und chlorotischen Blatteil (b) einer kranken Pflanze.

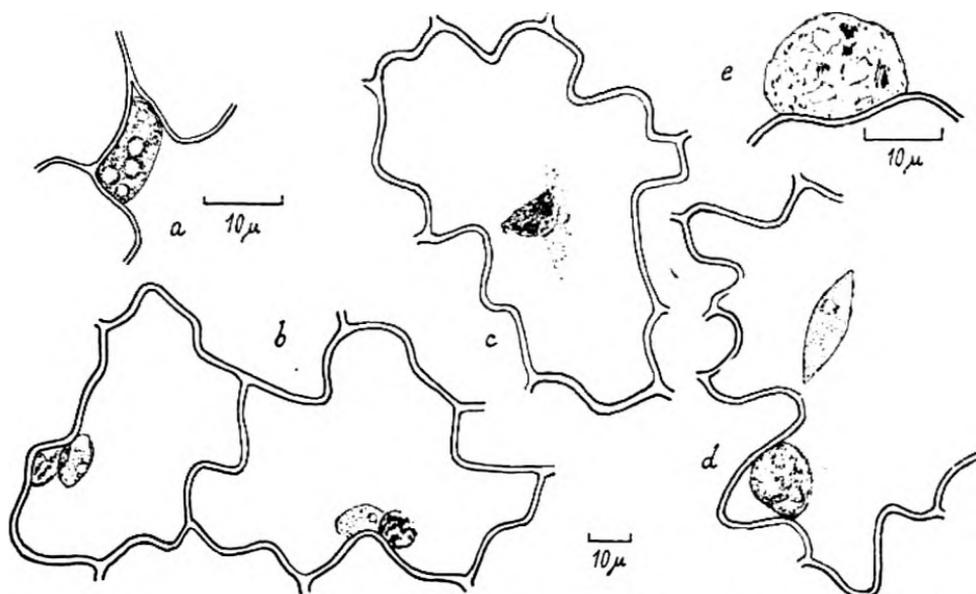


Abb. 2. X-Körper in Blattepidermiszellen von *Alliaria officinalis* (a), *Hesperis matronalis* (b und c), *Hesperis dinarica* (d) und *Capsella bursa pastoris* (e). b und c nach Fixierung in Sublimat-Alkohol und Färbung mit Säurefuchsin gezeichnet.

Virosen (vgl. B a w d e n, 1950), so auch bei dieser Krankheit, entstehen in den Zellen zuerst amorphe X-Körper (Abb. 2 a; Taf. I A). Diese konnten wir in der Stengel-, Blatt- und Fruchtepidermis, wie auch manchmal im inneren Gewebe, in der Zeit finden, als auch die ersten äußeren Krankheitssymptome zu erscheinen begannen. Die X-Körper waren meistens ziemlich groß, fast kugelig, scharf von Cytoplasma getrennt und häufig vakuolisiert (Abb. 2 a; Taf. I A).

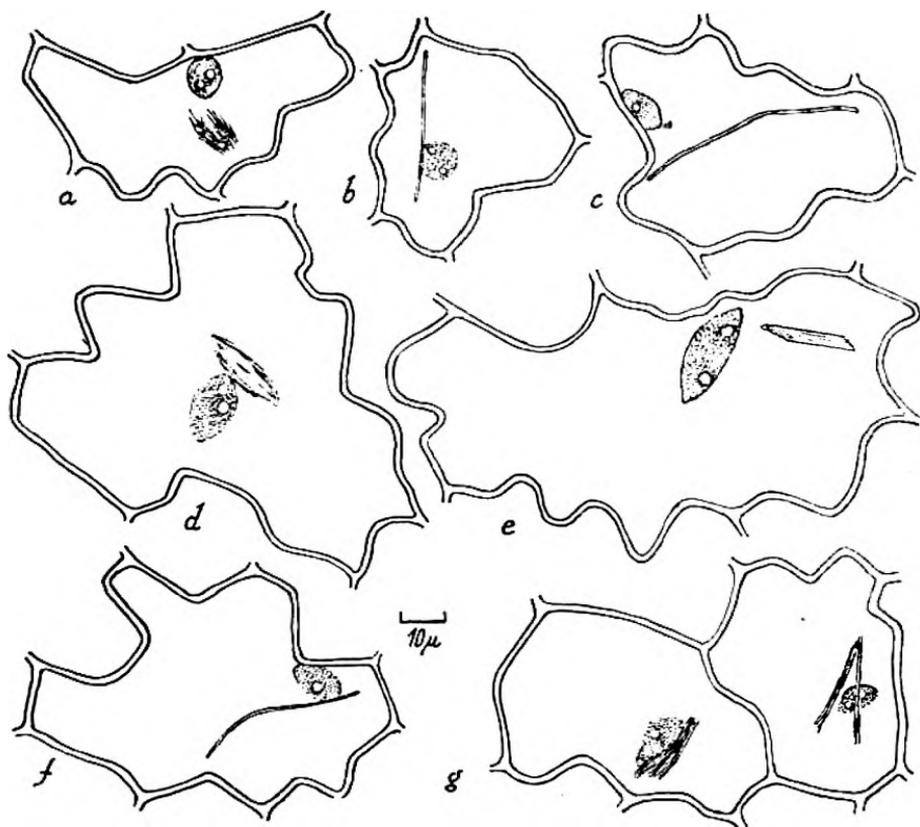


Abb. 3. Blattepidermiszellen von *Hesperis matronalis*. Verschieden geformte kristalline Einschlusskörper. Nach Fixierung in Sublimat-Alkohol und Färbung mit Säurefuchsin gezeichnet.

Um die Eigenschaften der X-Körper genauer zu erkennen, wurden an diesen einige Färbungsversuche mit folgenden Ergebnissen ausgeführt. Nach Fixierung färbten sich die Körper kräftig mit Pyronin, blieben aber nach gleicher Vorbehandlung und nachheriger Färbung mit Methylgrün ungefärbt. Gelegentlich der Färbung mit dem Gemisch von Methylgrün und Pyronin nach U n n a färbten sich die X-Körper rot und die Zellkerne grün. Zum Vergleich haben wir den gleichen Färbungsversuch an den Blatzellen von *Nicotiana tabacum* ausgeführt,

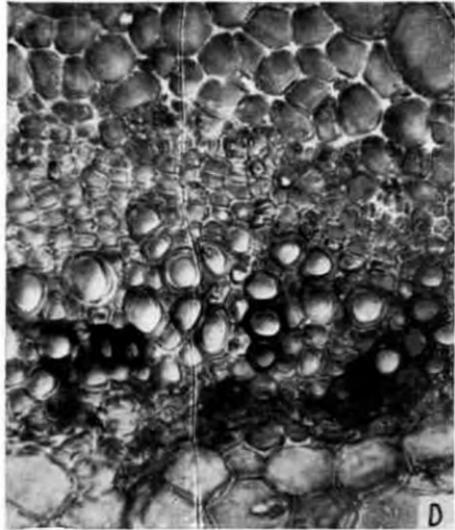
die mit Tabakmosaikvirus infiziert wurden. Dabei konnten wir feststellen, daß auch bei dieser Pflanzenart Zellkerne grün und X-Körper rot gefärbt waren. Auf Grund dieser Ergebnisse kann man vermuten, daß die X-Körper von *Alliaria* Ribonukleinsäure (RNS) enthalten.

Diese Vermutung gründet sich auf die Ergebnisse von Brachet (1940), nach denen eine starke Rotfärbung mit Pyronin sehr häufig von RNS stammen kann. Derselbe Stoff ist in reichlichem Maße in allen pflanzlichen Virose vorhanden, so daß man erwarten kann, daß die RNS auch in *Alliaria*-Virus anwesend sein wird. Was aber den X-Körper der kranken Pflanzen anbelangt, nach neueren Untersuchungen stellen sie Aggregate von Virusteilchen dar (vgl. Brandes, 1956). Es ist demnach sehr wahrscheinlich, daß auch in X-Körpern von *Alliaria* eine große Menge von Viruspartikeln vorhanden ist, die sich infolge ihres Reichtums an RNS mit Pyronin intensiv rot anfärben lassen.

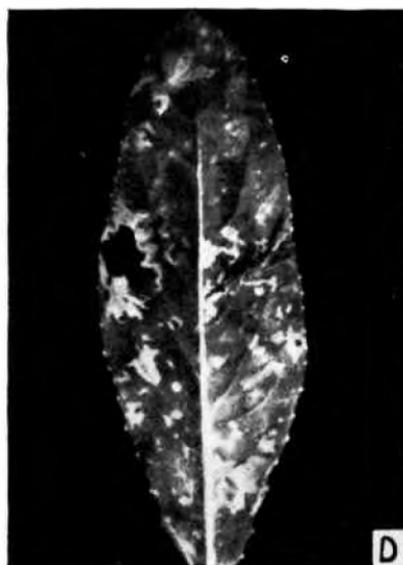
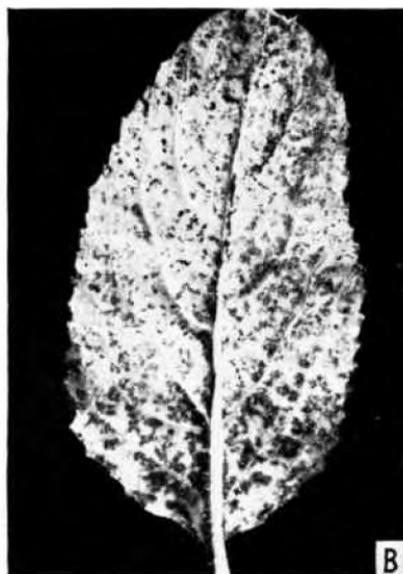
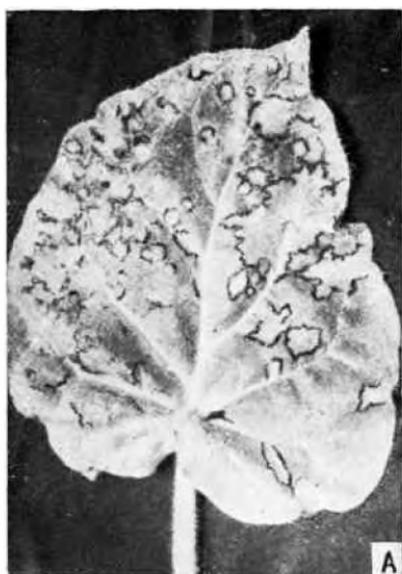
Kurze Zeit nach der Erscheinung der X-Körper kann man in den Zellen kranker Pflanzen auch kristalline Einschlußkörper finden deren Morphologie und Verhalten gegen einige Reagenzien Miličić (1956 a) untersucht hat. Es muß doch erwähnt werden, daß wir jetzt die stab- bzw. fadenförmigen Proteinkörper, die von Miličić beschrieben wurden, in den experimentell infizierten *Alliaria*-Pflanzen nicht finden konnten. Doch ist es sehr wahrscheinlich, daß auch solche Einschlußkörper von demselben Virus bedingt waren, weil wir in von uns experimentell mit *Alliaria*-Virus infizierten *Hesperis matronalis*-Pflanzen stab- bzw. fadenförmige Eiweißkristalle entdeckt haben (Abb. 3). Auch bei anderen Virose, z. B. bei Kakten-Viruskrankheit, ist es bekannt, daß in den Wirtszellen neben breiteren Proteinspindeln auch fadenförmige Kristallkörper entstehen können (Weber, Kenda und Thaler, 1952; Miličić, 1954). Was das Vorkommen der kristallinen Einschlüsse betrifft, sie sind nicht regelmäßig verbreitet, so daß wir diese manchmal vergebens in einigen Blättern suchten, die sonst deutliche Krankheitssymptome zeigten. Trotz dieser Schwierigkeiten kann man die kristallinen Einschlußkörper für die Diagnose dieser Virose erfolgreich benutzen.

### *Hesperis matronalis*

Das *Alliaria*-Virus ist mechanisch durch Saftverimpfung mittels Karborundpuders leicht zu übertragen. Bei *H. matronalis* ruft das Virus verschiedene Abnormalitäten hervor. Das häufigste Krankheitssymptom ist wieder eine Mosaikfleckung an den Blättern, die sich oft in der Weise äußert, daß sich an größeren oder kleineren chlorotischen Blattbereichen unregelmäßige normal grüne Flecken erhalten, die vom chlorotischen Blatteil scharf, ohne allmählichen Übergang getrennt sind. Auch die kleinen chlorotischen Flecken, die sich manchmal in grünen Bereichen befinden, sind häufig von diesen scharf gesondert.



A. X-Körper in den Epidermiszellen des Stengels von *Alliaria officinalis*. B. X-Körper in Kontakt mit dem Zellkern in einer Haarzelle von *Nicotiana glutinosa*. C. Kristalliner Einschlusskörper in einer Epidermiszelle von *Sinapis alba*. D. Querschnitt durch einen Teil des Blatt tieles von *Hesperis matronalis*. Zahlreiche Nekrosen im Xylem und nebenliegendem Parenchym haben die dunkelbraune Färbung der Gefäßmembranen und anderer Zellwände verursacht.



A. *Nicotiana glutinosa*. Chlorotische Flecken sind scheinbar mit schwarzen Linien umgeben. Die Linien sind als Folge der starken Durchsichtigkeit des Blattes an diesen Stellen und des schwarzen Hintergrundes entstanden. B. Blattunterseite eines nekrotischen Exemplars von *Hesperis matronalis*. Zahlreiche dunkle nekrotische Flecken sind sichtbar. C und D. Infolge der Entstehung des Anthrazyans ist die charakteristische Moafäckscheckung an den Blättern von *Hesperis matronalis* noch deutlicher geworden.

Diese charakteristische Fleckigkeit wurde bei einigen Pflanzen in Sommermonaten besonders deutlich, wenn ihre alten Blätter infolge der stellenweise reichlichen Anhäufung des Anthozyans kräftig rot geworden waren. Da gleichzeitig in diesen Blättern die Chloroplasten degenerierten und die Menge von Anthozyan in gelbgrünen Blatteilen sehr niedrig blieb, so geschah es, daß die vorher chlorotischen Bereiche fast weiß und die normalen intensiv rot gefärbt waren (Taf. II. C, D). Um die Verteilung des Anthozyans in der Blattzellen feststellen zu können, waren diese bunten Blätter anatomisch untersucht. Dabei konnten wir konstatieren, daß die intensive Rotfärbung besonders von reichlicher Anhäufung des Anthozyans in jenen Palisadenzellen stammte, die sich in früher grünen Blatteilen befanden, während die vorher chlorotischen Blattbereiche in dieser Zellschicht sehr wenig Anthozyan enthielten (Abb. 4).

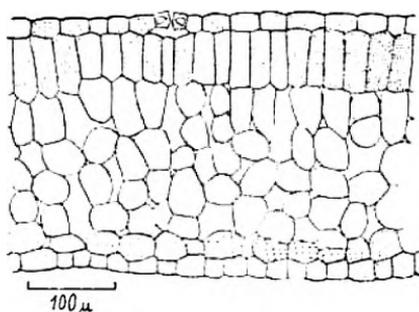


Abb. 4. Querschnitt durch das Blatt von *Hesperis matronalis*. Die punktierten Zellen enthalten Anthozyan. Die Dichtigkeit der Punktierung entspricht der Farbstoffmenge in der Zelle.

Daß dieses Virus die Verteilung des Anthozyans im Gewebe beeinflussen kann, kam besonders in den Blüten zum Ausdruck. Die normalen Blüten dieser Pflanzen waren gleichmäßig rosaviolett; bei den infizierten Exemplaren dagegen konnte man an den sonst rosavioletten Kronblättern weiße Streifen oder verschiedenförmige Flecken beobachten, die häufig scharf vom rosavioletten Teil getrennt waren. Diese Scheckung der Blüten (breaking) entstand auch bei den kranken Exemplaren von *Hesperis matronalis*, die im Botanischen Garten der Universität Zagreb im Offenen gezogen wurden. Solche Buntstreifigkeit der Blüten ist ein häufiges Symptom verschiedener Viruskrankheiten (vgl. Nikolić, 1949).

Außer dieser Mosaikfleckung trat bei einigen Pflanzen auch eine leichte Wellung und Verbiegung der Laubblätter auf. Neben diesen Krankheitssymptomen konnten wir bei einer größeren Anzahl erkrankter Pflanzen auch nekrotische Flecken an den Blättern wahrnehmen (Taf. II B). Die nekrotischen Stellen befanden sich am häufigsten an der unteren Blattseite in Form kleinerer Flecken. Solche Nekrosen konnten wir nicht selten auch am Blattstiele beobachten. Die abgestorbenen

Zellen enthielten einen rotbraunen Farbstoff, infolgedessen die nekrotischen Stellen leicht sichtbar waren. Dieser Nekrosen halber, die an etwas älteren Blättern unabhängig von der Inokulationstelle entstanden, hatten die Blätter ein kurzes Leben und starben viel früher ab, als die Blätter von infizierten Exemplaren ohne Nekrosen. Aus diesem Grund war die Anzahl der basalen Blätter bei nekrotischen Exemplaren regelmäßig kleiner, als bei anderen erkrankten Pflanzen. Dieser Unterschied war deshalb deutlich, weil die aus Samen gezogenen Exemplaren von *Hesperis matronalis* in Bedingungen unserer Glashaus-Kultur in die reproduktive Phase nicht übergehen konnten, sondern bildeten ständig nur die Blätter der basalen Rosette. Auf diese Weise lebten einige nekrotische Exemplare mehrere Jahre und entwickelten dabei immer neue junge Blätter, die bald infolge nekrotischer Veränderungen abstarben.

Um die Lokalisation der Nekrosen im Gewebe genauer zu erforschen, haben wir anatomische Untersuchungen mit folgenden Ergebnissen ausgeführt. Die Nekrosen in der unteren Epidermis waren häufig insel-



Abb. 5

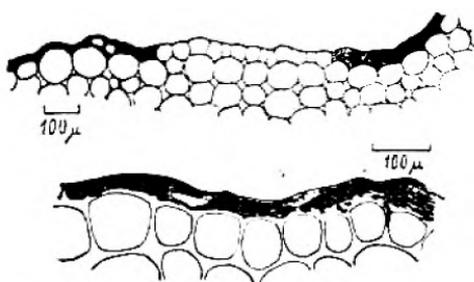


Abb. 6.

Abb. 5. *Hesperis matronalis*. Flächenschnitt. Nekrotische Zellen in der Epidermis der Blattunterseite sind punktiert.

Abb. 6. *Hesperis matronalis*. Querschnitte durch den peripheren Teil des Blattstieles. Nekrosen in der Epidermis.

artig verteilt und dann nur auf eine kleinere Anzahl von Zellen begrenzt (Abb. 5), so daß diese makroskopisch die Form kleiner dunklen Flecken annahmen, die mehr oder minder gleichmäßig in der Epidermis verteilt waren (Taf. II B). In anderen Fällen, und zwar besonders am Blattstiele, konnten wir größere und breitere Flecke beobachten.

Die Querschnitte durch den Blattstiel zeigten, daß die abgestorbene Epidermis oft dünn ist und mit einem braunen Stoff ausgefüllt (Abb. 6). An einigen Stellen drangen die Nekrosen tief in das innere Gewebe hinein und gelangen bis in den Bereich der Leitbündel. Hier behielt der Phloemteil ihr normales Aussehen, aber im Xylem gingen manche Parenchymzellen zugrunde. Mit dem braunen Farbstoffe, der während dieser Nekrosen entstand, waren auch die Zellwände mancher Gefäße gefärbt (Taf. I D). Auch im Zellumen der Gefäße befand sich manchmal ein bräunlicher fester Körper, der das Lumen völlig ausfüllte. Ähnliche

Veränderungen im Xylem sind auch bei einigen anderen Virose, wie z. B. bei Pierce'scher und Phony-Krankheit bekannt (vgl. Esau 1948 a, b).

Die Verbiegung der Spreitenoberfläche, die als pathologische Veränderung bei *Alliaria* häufig ist, wurde bei dieser *Hesperis*-Art nur seltener, und zwar in einer leichten Form, beobachtet.

Es war weiter auffallend, daß bei *Hesperis matronalis*-Pflanzen ihre wichtigsten Krankheitssymptome, wie die Mosaikfleckigkeit und die Nekrosen, nicht gleichmäßig bei allen Exemplaren verbreitet waren. So zeichneten sich z. B. einige Exemplare durch eine Mosaikfleckigkeit aus, waren aber ohne Nekrosen, während die anderen stark mit nekrotischen Flecken angefallen waren. Um feststellen zu können, ob dieser Unterschied von einer Veränderung des Virus in den Wirtszellen abhängig war, haben wir neun gesunde *Hesperis matronalis*-Pflanzen teilweise mit dem infektiösen Zellsafte aus nekrotischen und teilweise mit dem Saft aus mosaikfleckigen Exemplaren derselben Art inokuliert. Es muß erwähnt werden, daß die nekrotischen Exemplare gleichzeitig auch ein mehr oder minder starkes Mosaik zeigten. Nach der Inkubationszeit haben wir die auf Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse erhalten. Wie

Tab. 1. Infektionsversuche mit *Hesperis matronalis*-Pflanzen, die verschiedene äußere Symptome enthielten

	Infektion ausgeführt durch den Preßsaft aus einer Pflanze mit		
	Nekrosen	Mosaik	Mosaik
Krankheitssymptom an der I. infizierten Pflanze	Nekrosen	Mosaik	Mosaik
Krankheitssymptom an der II. infizierten Pflanze	Nekrosen	Mosaik	Mosaik
Krankheitssymptom an der III. infizierten Pflanze	Mosaik	Nekrosen	Nekrosen

aus dieser Tabelle sichtbar ist, haben wir von aus einem nekrotischen Exemplar gewonnenem Gewebesafte neben nekrotischen auch eine mosaikfleckige Pflanze bekommen; gleicherweise haben die mosaikfleckigen Exemplare neben panaschierten auch nekrotische Infektionen verursacht.

Parallel mit diesen Versuchen wurden analoge Experimente mit *Alliaria* durchgeführt. Einige Exemplare dieser Art wurden teilweise mit dem Preßsaft von nekrotischen und teilweise mit dem Saft von mosaikfleckigen *Hesperis matronalis*-Pflanzen inokuliert. Nach der Inkubation entstanden an allen *Alliaria*-Pflanzen schon bekannte, für diese

Pflanzen charakteristische und einheitliche Krankheitssymptome. Es scheint uns demnach, daß der Unterschied in den äußeren Erkrankungs-symptomen bei *Hesperis matronalis* nicht vom Virus stammt, sondern von der Ungleichheit der Wirtspflanzenexemplare.

Während dieser Untersuchung wurden besonders eingehend die intrazellularen Einschlußkörper von *Hesperis matronalis* untersucht. Nach der Inkubation, und zwar fast gleichzeitig mit den ersten äußeren Veränderungen, entstehen in den Zellen auch die ersten großen X-Körper (Abb. 2 b, c). In den Schnitten, die 17 Tage nach der Inokulation durch-mustert wurden, wurden schon auch kristalline Einschlußkörper beobachtet. Was die amorphen X-Körper betrifft, waren diese nach Form und anderen Eigenschaften von den analogen Gebilden bei anderen Virosen nicht zu unterscheiden. Besonders viel X-Körper wurden in der Epidermis jener Pflanzen wahrgenommen, bei denen Nekrosen in den Epidermiszellen häufig waren. Bei diesen Pflanzen wurden folgende Reaktionen auf ihre X-Körper ausgeführt, auf Grund dessen wir schließen konnten, daß diese Gebilde eine Eiweißnatur besitzen: Die Körper färbten sich nämlich mit Jodjodkali braun, mit Pikrinsäure gelb, mit konz.  $\text{HNO}_3$  gelb, mit Millonschem Reagens ziegelrot. Gelegentlich der Färbung mit Methylgrün färbten sich die Zellkerne grün, die X-Körper dagegen blieben völlig ungefärbt. Gleicherweise waren die Körper ungefärbt geblieben, wenn die Zellen vital mit wässriger Lösung von Neutralrot bei pH 7 gefärbt wurden.

Wie in anderen Fällen, so auch bei dieser Pflanze beginnt sich bald in den X-Körper das kristalline Material anzuhäufen, das früher oder später den amorphen X-Körperteil völlig zurückdrängt. Die Morphologie der kristallinen Körper kann sehr variieren; die Kristalle erscheinen in Form einer kurzen Spindel oder eines Balkens, eines langen gleich-mäßig verdickten Stabes oder eines Fadens, eines Haufens von Nadeln, die nicht immer untereinander parallel orientiert sind u. s. w. (Abb. 3). Diese kristallinen Gebilde lassen sich in Sublimat-Alkohol fixieren und nachher — wie die anderen Eiweißkristalle — mit Säurefuchsin nach der Methode Z i m m e r m a n n rot anfärben (M o l i s c h, 1913).

### *Hesperis dinarica*

Diese Pflanzenart war nicht so eingehend wie die vorigen unter-sucht. Im Glashaus waren nur drei ihre Exemplare mit *Alliaria*-Virus infiziert. Bei allen Exemplaren konnte man nach der Inkubation als erstes Erkrankungszeichen eine helle Bräunung an der Oberseite der jungen Blätter beobachten. Diese Färbung entstand als Folge des Ab-sterbens vieler Palisadenzellen. In Zusammenhang damit waren unterhalb der Epidermis große mit Luft gefüllte Interzellularen entstanden, die das Licht stark reflektierten und so die helle Farbe der Blattoberseite verursachten. Der braune Farbton dieser Blattseite stammte von dem braunen Farbstoff, der in abgestorbenen Zellen erschienen ist.

Bei den späteren, jüngeren Blättern verschwanden rasch diese Nekrosen und anstatt der Nekrosen entstand eine Mosaikscheckung, die jener von *Hesperis matronalis* ähnelte. In der weiteren Entwicklung dieser Pflanzen ist diese Scheckung als ein beständiges Symptom geblieben, die Nekrosen dagegen konnten nur selten beobachtet werden. Gleichermassen zeigte eine größere Anzahl von Exemplaren dieser Art, die sich spontan in Parkanlagen des Botanischen Gartens der Universität Zagreb mit diesem Virus infiziert haben, nur die Mosaikscheckung. Neben dieser Scheckung entstanden häufig an den Blättern schwache Faltungen ihrer Spreiten.

Während einer kurzen Untersuchung der infizierten Pflanzen auf die Anwesenheit der Einschlusskörper konnten wir nur X-Körper finden (Abb. 2 d). Infolge der Kürze dieser Untersuchung ist es nicht ausgeschlossen, daß eventuelle kristalline Einschlüsse übersehen wurden.

### *Nicotiana glutinosa*

Auch auf diese *Solanaceae* läßt sich das *Alliaria*-Virus mechanisch leicht übertragen. Nach der Inkubation erscheinen an den neuen jungen Blättern rundliche oder unregelmäßige gelbgrüne Flecke. Die Ränder dieser Flecke verhielten sich bei unserem folgenden Versuche anders, als ihr zentraler Teil. Gelegentlich des Photographierens der Blätter haben wir diese in eine mit Wasser gefüllte Küvette gesetzt und ins Wasser eingetaucht, um störenden Lichtreflexionen an der Blattoberfläche auszuweichen. Dabei ist das Wasser in die Randteile der Flecken eingedrungen, hat Interzellularräume ausgefüllt, so daß diese Blatteile sehr durchsichtig geworden sind. Infolge dieser durch Wasserinfiltration erreichten Durchsichtigkeit waren die Flecke bei jenen Blättern, die sich vor einem dunklen Hintergrund befanden, mit einer schwarzen Linie umgeben, so daß sich ihre Grenzen gegenüber den grünen Blatteilen jetzt sehr scharf hervorhoben (Taf. II A). Unter welchen Bedingungen in den kranken Blättern eine solche streng lokalisierte Wasserinfiltration entsteht, wurde nicht weiter untersucht.

Die kranken Pflanzen zeichneten sich auch mit unebenen Blattspreiten aus und blieben im Wachstum hinter den gesunden Pflanzen deutlich zurück. In seltenen Fällen haben wir auch sehr kleine nekrotische Flecke an den Blattspreiten, und zwar innerhalb der chlorotischen Bereiche, beobachtet.

Diese Art wurde mehrmals mikroskopisch untersucht, um die Form und Natur ihrer Zelleinschlüsse je genauer zu erkennen. Trotzdem wurden in ihrer Epidermiszellen nur amorphe X-Körper (Taf. I B) und niemals kristalline Gebilde gefunden. Dieses Ergebnis ist ziemlich unerwartet, da aus bisherigen Untersuchungen bei anderen Virosen bekannt ist, daß die Zelleinschlüsse ziemlich beständig und von Wirtspflanzen wenig abhängig sind, so daß sie in derselben Form bei verschiedenen Pflanzenarten vorkommen (B a w d e n, 1950). In einigen Fällen

konnten doch Abtretungen von dieser Regel konstatiert werden. So z. B. bildet ein Stamm von Tabakmosaikvirus bei *Collinsia bicolor* statt hexagonaler Kristalle nur amorphe X-Körper (Suhov i Vovk, 1950, zit. n. Goldin, 1954). Ob es sich auch in unserem Falle um eine analoge Erscheinung handelt, müßte noch genauer untersucht werden.

### *Sinapis alba*

Diese Pflanzenart haben wir mehrmals mit *Alliaria-Virus* infiziert. Die ersten Erkrankungszeichen erschienen an den jungen Blättern in Form einer Adernaufhellung. Später entstand an diesen Blättern eine starke Mosaikfleckigkeit; außerdem wurden die Blätter manchmal gekräuselt und am Spreitenrande nach unten etwas gerollt. Neben diesen Veränderungen konnte man an den kranken Pflanzen wahrneh-

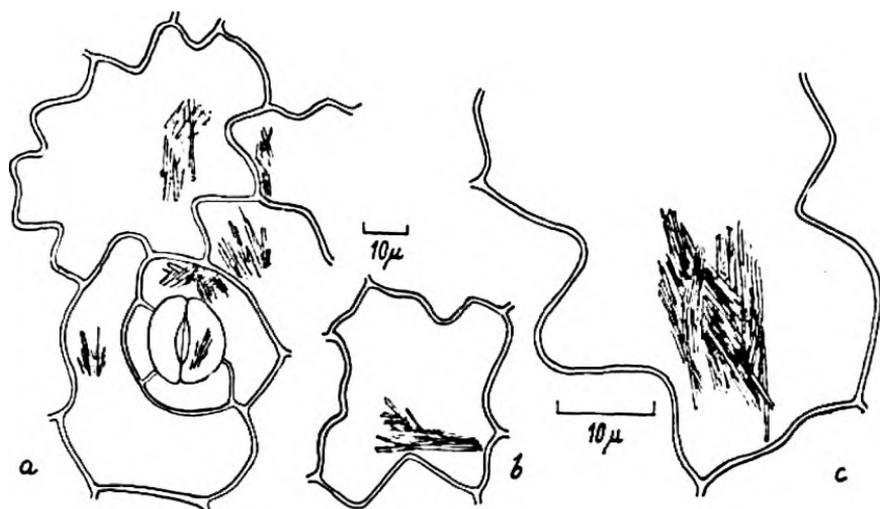


Abb. 7. Blattepidermiszellen von *Sinapis alba*. Kristalline Einschlüsse in Form von Nadelbüscheln.

men, daß sie in ihrer Entwicklung hinter den gesunden Exemplaren zurückgeblieben sind; so z. B. die ersteren waren niedriger und begannen später zu blühen.

Die stärksten Symptome haben wir an jenen Pflanzen beobachtet, die im frühen Frühling gezogen wurden; demgegenüber waren die Symptome bei den im späten Frühling und im Herbst entwickelten Pflanzen viel weniger kräftig.

Auch in der Epidermis dieser Pflanzenart entstehen Viruseinschlüsse, und zwar in Form amorpher X-Körper und kristalliner Gebilde. Die erstere Einschlußkörperart wurde in den Blatzellen in der Zeit gefunden, als nach der Infektion auch die ersten äußeren Krankheits-

symptome zu erscheinen begannen. Nicht lange nachher wurden in denselben Zellen auch kristalline Gebilde beobachtet. Die letzteren waren aus büschelartig angehäuften Kristallnadeln zusammengesetzt (Taf. I C; Abb. 7), die häufig gegeneinander nicht regelmäßig parallel orientiert waren. Diese Nadelbüschel waren besonders häufig bei den Pflanzen mit stärkeren Krankheitssymptomen; sie wurden in größerer Menge in den Epidermen der Blattspreite beobachtet, wo sie sich auch in den Schließzellen finden konnten (Abb. 7 a).

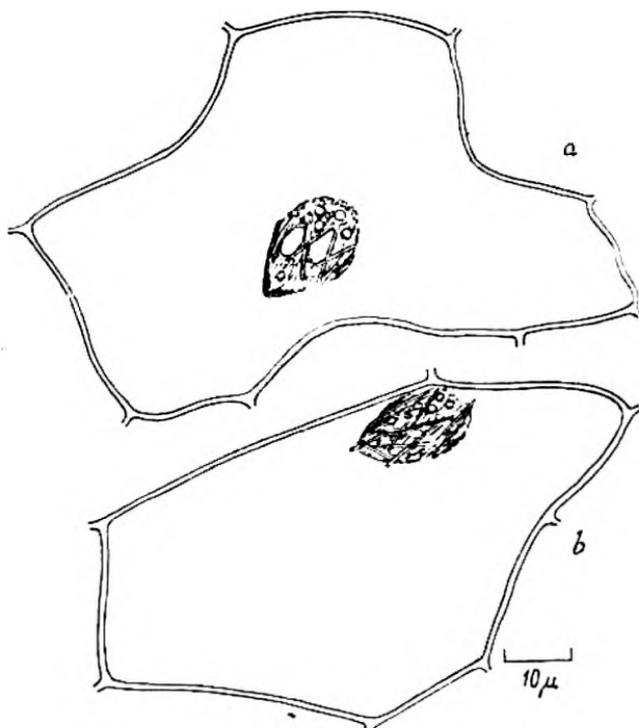


Abb. 8. Blattepidermiszellen von *Sinapis arvensis*. X-Körper mit kristallinen Nadeln.

### *Sinapis arvensis*

Von dieser Pflanzenart wurden in Mai 1957 drei Exemplare infiziert. An ihren Blättern wurden ähnliche Krankheitssymptome wie bei *Sinapis alba* konstatiert und zwar zuerst eine starke Mosaikscheckung und manchmal eine Kräuselung der Spreitenoberfläche; außerdem wurden die Blattränder oft nach unten etwas gerollt. Auch diese Exemplare wurden einer mikroskopischen Untersuchung unterzogen, während dessen in der Blattepidermis ganz amorphe X-Körper gefunden wurden neben solchen, die im Innern zahlreiche Kristallnadeln enthielten. Diese Körper waren häufig auch vakuolisiert (Abb. 8).

## *Capsella bursa pastoris*

Auch von dieser Pflanzenart wurden nur drei Exemplare infiziert. Die äußeren kranken Symptome dieser Pflanzen bestanden aus einer schwachen Mosaikscheckung und einer leichten Faltung der Spreiten; außerdem waren auch die Blattränder häufig leicht nach unten gerollt. Von den infizierten Pflanzen ist ein Exemplar höchst wahrscheinlich wegen der Infektion bald zugrunde gegangen. In der Blattepidermis der am Leben gebliebenen Pflanzen wurden gelegentlich einer kurzen mikroskopischen Durchsicht nur amorphe und stark vakuolisierte X-Körper beobachtet (Abb. 2 e).

### Schl u ß b e m e r k u n g e n

Das Ausgangsmaterial für Übertragungsversuche war ein krankes Exemplar von *Alliaria officinalis* aus der Umgebung von Zagreb. Mit dem Preßsaft dieser Pflanze war zuerst das *Alliaria*-Virus auf die Arten *Hesperis matronalis* und *Nicotiana glutinosa* übertragen. Später diente ein krankes Exemplar dieser letzteren Art für die Infektion von *Sinapis alba*, *Sinapis arvensis*, *Hesperis dinarica*, *Capsella bursa pastoris* und für die Übertragung des Virus auf mehrere gesunde, aus Samen gezogene Exemplare von *Alliaria officinalis* und *Nicotiana glutinosa*. Von diesen Pflanzen haben einige Exemplare der Arten *Sinapis alba* und *Hesperis matronalis* für eine neue Infektion der Ausgangsart *Alliaria officinalis* gedient. In allen diesen Fällen zeigten die infizierten Pflanzen schon bekannte Symptome, die für *Alliaria*-Viruskrankheit charakteristisch sind.

Schon allein auf Grund der X-Körper-Entdeckung in den kranken Exemplaren von *Alliaria officinalis* konnte Miličić (1956 a) vermuten, daß sich bei *Alliaria* um eine Viruskrankheit handelt. Unsere Untersuchungen haben diese Meinung noch wahrscheinlicher gemacht, weil die Mosaikkrankheit von *Alliaria* nach ihrer Übertragungsart und nach ihren Krankheitssymptomen mit anderen Pflanzen-Viruskrankheiten sehr übereinstimmt. Um dieses Virus besser zu erkennen, wäre doch unter anderem notwendig, das Virus zu isolieren und den Beweis zu bringen, daß das isolierte Material die Infektionsfähigkeit behalten hat.

Gelegentlich der weiteren Bearbeitung des *Alliaria*-Virus wäre auch wichtig, die Bestimmung des Virus zu versuchen. Es ist nämlich nicht ausgeschlossen, daß das *Alliaria*-Virus identisch mit einem schon bekannten Virus ist. Gleicherweise ist es möglich, daß es sich um einen Cruciferen-Virus handelt. Unlängst ist in Jugoslawien von Panjan und Prpić (1954) eine Viruskrankheit von *Brassica oleracea* var. *acephala* entdeckt worden. Letztere Virose und die *Alliaria*-Viruskrankheit sind gewiß nicht gleich, weil sich diese Krankheiten voneinander in mehreren Charakteren scharf unterscheiden.

Die Bestimmung des *Alliaria*-Virus könnte vielleicht auch infolge seiner Fähigkeit, die Entstehung kristalliner Einschlüsse in den Wirtszellen zu verursachen, sehr erleichtert werden. Da solche Einschlüsse nur von einer kleineren Anzahl von Viren gebildet werden können (vgl. das Verzeichnis bei Goldin, 1954), wäre es notwendig zuerst festzustellen, ob nicht das *Alliaria*-Virus mit einem von diesen Viren identisch sein könnte.

Das *Alliaria*-Virus wurde durch die Untersuchung der Zelleinschlüsse entdeckt (Miličić, 1956 a). Mit Hilfe dieser Methode wurde vor kurzem in Jugoslawien auch eine Virose an *Rumex obtusifolius* gefunden (Miličić und Bralić, 1958). Gleichermassen wurde mittels der Einschlüsse festgestellt, daß die Viruskrankheit der Kakteen in Jugoslawien ziemlich verbreitet ist, und zwar bei den in Glashäusern und Parkanlagen gezogenen Pflanzen (Miličić, 1956 b). Die Kakteenvirose wurde in Jugoslawien bei Epiphyllen und Opuntien beobachtet (Miličić, 1954; Miličić und Plavšić, 1956). Wie aus diesen Angaben hervorgeht, ist die Untersuchung von Zelleinschlüssen ein sehr nützliches Mittel für Entdeckung neuer viruskranker Pflanzen.

Die Anwesenheit der amorphen und speziell der kristallinen Einschlusskörper hat auch unsere Untersuchung über das *Alliaria*-Virus bedeutend erleichtert, obwohl die Einschlüsse manchmal selten waren. Von vier mit *Alliaria*-Virus infizierten Pflanzenarten, bei denen die Einschlüsse eingehender untersucht worden waren, enthielten alle die X-Körper, die kristallinen Einschlüsse aber fehlten nur bei *Nicotiana glutinosa* (vgl. Tab. 2).

Tab. 2. Anwesenheit von Einschlusskörpern in den Wirtspflanzen

Pflanzenart	Art von Zelleinschlüssen		
	X-Körper	X-Körper mit Kristallnadeln	Kristalline Einschlusskörper
<i>Alliaria officinalis</i>	+	+	+
<i>Hesperis matronalis</i>	+	+	+
<i>Hesperis dinarica</i>	+	?	?
<i>Nicotiana glutinosa</i>	+	—	—
<i>Sinapis alba</i>	+	+	+
<i>Sinapis arvensis</i>	+	+	?
<i>Capsella bursa pastoris</i>	+	?	?

Wie bei Tabakmosaikkrankheit, so auch bei *Alliaria*-Virose kann man feststellen, daß die kristallinen Einschlusskörper dieselbe Form in verschiedenen Wirtspflanzen haben bzw. daß eine ziemlich große Unabhängigkeit der Einschlusskörperform von den Wirtspflanzen besteht.

So haben die kristallinen Körper unserer Virose in *Alliaria officinalis*, *Sinapis alba* und *Hesperis matronalis* meistens die Form von Nadeln-  
büscheln, in denen die Nadeln gegeneinander nicht immer parallel  
orientiert sind.

Was den Umstand betrifft, daß wir in *Nicotiana glutinosa* kristalline  
Eiweißkörper nicht finden konnten, so kann dies auch von kleinerer  
Anzahl dieser Gebilde in dieser Pflanzen abhängen. Deshalb ist es nicht  
ausgeschlossen, daß die kristallinischen Einschlüsse auch in *Nicotiana*  
manchmal anwesend sind, daß wir aber diese wegen ihrer Seltenheit  
nicht beobachten konnten. Wenn aber in weiteren Untersuchungen  
festgestellt werden wird, daß die kristallinen Einschlüsse in *Nicotiana*  
*glutinosa* nicht vorkommen, wäre das doch kein isolierter Fall in unserer  
bisherigen Kenntnis über Einschlusskörper. Nach Goldin (1954) haben  
Suhov und Vovk (1950) gelegentlich ihrer Untersuchungen über  
kristalline Einschlüsse (hexagonale Plättchen), die in mit Tabakmosaik-  
krankheit infizierten Pflanzen entstehen, festgestellt, daß diese Kristalle  
bei *Collinsia bicolor* ausnahmsweise nicht erscheinen.

#### L I T E R A T U R

- Bawden, F. C., 1950: Plant viruses and virus diseases. Waltham, Mass., U. S. A.  
Brachet, J., 1940: La détection histochemique des acides pentosenucléiques.  
C. R. Soc. Biol. Paris 133, 88.  
Brandes, J., 1956: Über das Aussehen und die Verteilung des Tabakmosaik-  
virus im Blattgewebe. Phytopath. Z. 26, 93.  
Esau, K., 1944: Anatomical and cytological studies on beet mosaic. Jour. Agric.  
Res. 69, 95.  
Esau, K., 1948 a: Some anatomical aspects of plant virus disease problems. II.  
Bot. Rev. 14, 413.  
Esau, K., 1948 b: Anatomic effects of the viruses of Pierce's disease and phony  
peach. Hilgardia 18, 423.  
Esau, K., 1956: An anatomist's view of virus diseases. Amer. Jour. Bot. 43,  
739.  
Goldin, M. I., 1954: Virusnye vključenija v rastitelnoj kletke. Moskva.  
Köhler, E., und M. Klinkowski, 1954: Viruskrankheiten. In Sorauers Handb. d.  
Pflanzenkrankh. Berlin und Hamburg.  
Miličić, D., 1954: Viruskörper und Zellteilungsanomalien in *Opuntia brasiliensis*.  
Protoplasma 43, 228.  
Miličić, D., 1956 a: Virus-Zelleinschlüsse in *Alliaria officinalis*. Protoplasma  
47, 341.  
Miličić, D., 1956 b: Rasprostranjenje kakteja s virusnim tijelima u primorskim  
krajevima Jugoslavije (= Die Verbreitung der Viruskörper-führenden  
Kakteen an der jugoslawischen Meeresküste). Biol. glasnik 9, 21.  
Miličić, D., und V. Bratić, 1958: Viruskörper von *Rumex obtusifolius*. Proto-  
plasma 49, 226.  
Miličić, D., und B. Plavšić, 1956: Eiweißkristalloide in Kakteen-Virusträgern.  
Protoplasma 46, 547.  
Molisch, H., 1913: Mikrochemie der Pflanze. Jena.

Nikolić, V., 1949: Viroze kulturnih biljaka. Beograd.

Panjan, M., i Z. Prpić, 1954: Prilog poznavanju virusne bolesti na stočnom kelju (= Beiträge zur Kenntnis einer Viruskrankheit des Markstammkohls). Biljna proizvodnja 1954, 169.

Suhov, K., i A. Vovk, 1950: Izmenčivost virusa tabačnoj mozaiki pri passadžah čerez organizmy rastenij raznyh vidov. Tr. In-ta genetiki AN SSSR 18, 215, Zit. n. Goldin.

Weber, F., G. Kenda und I. Thaler, 1952: Viruskörper in Kakteenzellen. Proto-plasma 41, 277.

## ZUSAMMENFASSUNG

I. Die Virose von *Alliaria officinalis*, die bis unlängst nur aus wenigen Lokalitäten in der Umgebung von Zagreb bekannt war, ist auch anderswo in Zagreb und Umgebung, ferner in Požega in Kroatien und in Wien in Österreich verbreitet. Diese Krankheit erschien durch mehrere vergangene Jahre regelmäßig in der Umgebung von Zagreb. Außer *Alliaria* wurden im Offenen auch *Hesperis matronalis* und *Hesperis dinarica* mit diesem Virus infiziert.

II. Das *Alliaria*-Virus läßt sich auf die Arten *Alliaria officinalis*, *Hesperis matronalis*, *Hesperis dinarica*, *Nicotiana glutinosa*, *Sinapis alba*, *Sinapis arvensis* und *Capsella bursa pastoris* durch infektiösen Preßsaft bei Karborundzusatz leicht übertragen.

III. Die ersten Krankheitssymptome entstehen an den neuen jungen Blättern, während die älteren dabei unverändert bleiben. Bei allen infizierten Pflanzen erscheinen an den Blattspreiten chlorotische Flecke. Außerdem sind die Blätter häufig gekräuselt und ihre Ränder nach unten oder seltener nach oben etwas gerollt, und zwar besonders bei *Alliaria* und *Sinapis*-Arten. Bei manchen *Hesperis matronalis*-Exemplaren wurden Nekrosen beobachtet, die in besonders starkem Maße an unterer Blattspreitenepidermis und am Blattstiele entstanden. Die Nekrosen verbreiteten sich manchmal aus der Epidermis in das innere Gewebe des Blattstieles, wo auch Xylemteile absterben konnten. Das *Alliaria*-Virus verursacht auch eine Buntheit der Blüte (breaking) von *Hesperis matronalis*.

IV. In der Blatt- und Stengelepidermis erscheinen parallel mit den ersten äußeren Krankheitssymptomen intrazelluläre Einschlüsse in Form amorpher X-Körper. In diesen Körpern beginnt sich bald das kristallinische Material anzusammeln, das aus Proteinnadeln besteht. Aus X-Körpern entstehen endlich kristalline Einschlüsse, die aus einer größeren Anzahl mehr oder minder parallel orientierten Nadeln aufgebaut sind. In selteneren Fällen können die kristallinen Einschlüsse fadenförmig sein.

## S A D R Ź A J

### VIRUSNA BOLEST KRSTAŠICE ALLIARIA OFFICINALIS

I. Viroza biljke *Alliaria officinalis*, koja je donedavna bila poznata samo s malog broja nalazišta u okolici Zagreba, pronađena je na više novih lokaliteta u tom području, zatim u Požegi u Hrvatskoj i u Beču u Austriji. Viroza se u okolici Zagreba pojavljuje redovno svake godine. Osim navedene biljke bile su na otvorenom spontano inficirane ovim virusom i vrste *Hesperis matronalis* i *Hesperis dinarica*.

II. Ovaj virus daje se pomoću inficiranog soka uz upotrebu karbوندuma prenijeti na vrste *Hesperis matronalis*, *Hesperis dinarica*, *Alliaria officinalis*, *Nicotiana glutinosa*, *Sinapis alba*, *Sinapis arvensis* i *Capsella bursa pastoris*.

III. Prvi simptomi oboljenja javljaju se na mladim, novim listovima, dok stariji listovi ostaju i dalje nepromijenjeni. Kod svih inficiranih biljaka pojavljuju se na listovima klorotične pjege. Osim toga nastaje često kovrčanje (*Alliaria* i vrste *Sinapis*), savijanje ili lagano nabiranje lisne plojke. Kod nekih primjeraka vrste *Hesperis matronalis* zapažene su nekroze, koje su u naročito jakoj mjeri nastajale u donjoj epidermi plojke lista i u epidermi peteljke. Nekroze su ponekad zahvaćale i unutrašnjost peteljke, gdje je ugibao i ksilemski parenhim. Virus češnjače uzrokuje i šarenilo cvjetova (breaking) kod vrste *Hesperis matronalis*.

IV. U epidermskim stanicama listova i stabljike nastaju usporedno s prvim vanjskim znacima oboljenja intracelularne uklopine u obliku amorfnih X-tijela. U tim se tijelima počinje uskoro nakupljati kristalinični materijal, koji se sastoji od igličastih tvorevina. Na kraju se formiraju kristalinične uklopine, koje su izgrađene od velikog broja više ili manje usporedno položenih iglica. U rjeđim slučajevima mogu kristalinične uklopine imati nitast oblik.