

SIND VERSCHIEDENE EIWEISSKRISTALLE DER KAKTEEN VIRUSKÖRPER?

Mit 10 Textabbildungen und 2 Tafeln

DAVOR MILIČIĆ

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

Die Eiweißkristalle aus den Pflanzenzellen waren in der letzten Zeit Gegenstand ziemlich häufiger Untersuchungen. Das größte Interesse zogen dabei an sich Kristalle der Kakteen heran, und zwar besonders die Eiweißspindeln, die in der Epidermis verschiedener Epiphyllen und Opuntien oft in großer Menge vorkommen. Diese doppelbrechenden Proteinkörper wurden schon von Molisch (1885) entdeckt und von ihm als Reservematerial betrachtet, unlängst aber wurde ihre Natur nachgeprüft, währenddessen die Eiweißspindeln als Viruskörper erkannt wurden (Rosenzopf, 1951; Weber, Kenda und Thaler, 1952 a; Amelunxen, 1957). Diese Entdeckung wie der Umstand, daß die meisten Eiweißkristalle in der Zeit entdeckt wurden, als über Viren sehr wenig oder gar nichts bekannt wurde, hat viele Forscher zur Untersuchung verschiedener anderer Eiweißkristalle in dieser Richtung angeregt. So wurden vor kurzem mit Rücksicht auf eventuelle Virusnatur die Proteinkristalle von *Scutellaria* (Weber, 1955 b, 1956; Thaler, 1955/1956 a), von *Lilium* (Weber, 1953/1954 a, 1955 a; Thaler, 1956 a), von *Impatiens* (Weber, 1953/1954 b; Thaler, 1956 b; Goldin und Fedotina, 1956 a), von *Alliaria* (Miličić, 1956 c; Miličić, Panjan, Bilanović und Katić, 1958), von *Solanum* (Reiter, 1956), von *Drosera* (Weber, 1953/1954 b), von *Scindapsus* (Thaler, 1955/1956 b), von *Valerianella* (Thaler, 1954), von *Melampyrum* (Goldin, 1954) und von *Saintpaulia* (Kenda, Thaler und Weber, 1956) erforscht.

In der Arbeit über die Eiweißkristalle von *Melampyrum*, die regelmäßig in den Zellkernen dieser Pflanze vorkommen, vertritt Goldin

auf Grund seiner Färbungsversuche die Meinung, daß diese Kristalle sehr wahrscheinlich aus Ribonukleoproteiden aufgebaut sind. Eine andere Veröffentlichung von Goldin und Fedotina befaßt sich mit den Eiweißspindeln aus den Fruchtknoten von *Impatiens balsamina*, also wieder mit Kristallen, die sich regelmäßig in einer Pflanzenart befinden. Während dieser Untersuchung konnten die Autoren elektronenoptisch feststellen, daß die Spindeln aus stabförmigen Elementarteilchen zusammengesetzt sind, die den Partikeln des Tabakmosaikvirus oder des X-Virus der Kartoffel sehr ähnlich sind. Es scheint demnach, daß Eiweißkristalle, die normale Zellbestandteile einiger Pflanzenarten sind, nach ihrer chemischen Zusammensetzung und nach ihrer Struktur mit echten Viruskristallen übereinstimmen können. Es wäre interessant zu wissen, ob diese »normalen« Eiweißkristalle Infektionsfähigkeit besitzen, weil sie in solchem Falle doch als Virusweiße betrachtet werden müßten (vgl. die Auffassung von Viren bei Schramm, 1957).

Für die oben erwähnten Eiweißspindeln der Kakteen, die heute schon sehr gut bekannt sind, ist mit Sicherheit bewiesen, daß sie Aggregate von Virusmakromolekeln darstellen. Die ausführliche Untersuchung der Struktur der Eiweißspindeln, die Isolation und die genaue biochemische Analyse des Kakteenvirus wurde vor kurzem von Amelunxen (1958) ausgeführt.

Das Kakteenvirus wurde elektronenoptisch zuerst von Suhov und Nikiforova (1955) und von Amelunxen (1956) beobachtet. Dabei wurde festgestellt, daß die Kakteen-Eiweißspindeln aus fadenförmigen Makromolekeln aufgebaut sind, die den Elementarteilchen vieler Viren ähneln. Die langen Makromolekeln des Kakteenvirus sind häufig etwas gekrümmt, so daß Suhov (1956) meint, daß wegen dieser Eigenschaft das Kakteenvirus nicht imstande ist, echte polyedrische Kristalle zu bilden; demgegenüber besitzt diese Fähigkeit das Tabakmosaikvirus, dessen Makromolekeln gerade sind, und es kristallisiert häufig in der Pflanzenzelle in Form von hexagonalen Plättchen (vgl. Steere und Williams, 1953). Von anderen Eigenschaften des Kakteenvirus ist seine Lokalisation in der Epidermis bemerkenswert, wo die Eiweißspindeln in reichlicher Anzahl und bedeutender Größe vorkommen (vgl. Roland, 1957).

Es wurde bisher vielfach hervorgehoben, daß das Kakteenvirus keine äußeren Krankheitssymptome verursacht. Doch hatten manchmal einzelne Autoren während ihrer Untersuchungen der Eiweißspindeln auf verschiedene krankhafte Veränderungen einiger Wirtspflanzen gezeigt. Solche Beobachtungen wurden doch nur an wenigen Exemplaren gemacht, so daß nicht gewiß ist, ob sich um vom Virus bedingte Symptome handelte. Wir konnten auch häufig, aber nicht regelmäßig, bei mehreren spindel-führenden Exemplaren von *Opuntia monacantha* Haw. (= *Opuntia vulgaris* Mill.) und *Opuntia tomentosa* S. D. eine schwache Mosaikfleckigkeit an den jungen Kladdodien beobachten; wir wissen aber nicht, unter

welchen Bedingungen diese Veränderungen entstehen und ob sie wirklich von Virus abhängig sind. Daß das Kakteenvirus keine äußeren krankhaften Veränderungen verursacht, wurde vor kurzem wieder von Goldin und Fedotina (1956 b) hervorgehoben. Diese Autoren meinen, daß diese Kakteenvirose wegen dieser Eigenschaft ein besonderes theoretisches Interesse verdient. Während ihrer Untersuchung kamen sie noch zum Schlusse, daß die Eiweißspindeln bildende Virose in keinem Zusammenhang mit der von Blattný und Vukolov (1932) beschriebenen *Epiphyllum*-Mosaikkrankheit steht. Außerdem behaupten Goldin und Fedotina (1956 b), daß die Ergebnisse, auf Grund deren Blattný und Vukolov die genannte Krankheit dargestellt haben, für die Virusnatur der Erkrankung nicht genug überzeugend sind. Demnach stellt sich die Frage, ob die sog. *Epiphyllum*-Mosaikkrankheit im Sinne von Blattný und Vukolov überhaupt existiert. Wir können uns — was die Symptome an *Epiphyllum* betrifft — an den Gesichtspunkt von Goldin und Fedotina anschließen.

In den Zellen vieler Kakteen entstehen neben den Eiweißspindeln auch andere Eiweißkristalle; das sind in erster Linie die Stachelkugeln (Weber, Kenda und Thaler, 1952 b; Amelunxen, 1956 a), die Eiweißdrusen (Weber, Kenda und Thaler, 1952 a; Miličić und Plavšić, 1956) und die rhombenförmigen Plättchen (Miličić, 1956 a). Diese Kristalle befinden sich manchmal mit Proteinspindeln in ein und derselben Zelle. Sie besitzen auch verschiedene andere Eigenschaften, die bei Beurteilung wichtig sind, ob sich um normale oder vom Virus bedingte Zelleinschlüsse handelt. In dieser Mitteilung werden wir, nach einigen Angaben über Übertragung des Kakteenvirus, unsere Beobachtungen über rhombenförmigen Plättchen von *Opuntia inermis* DC. (= *Opuntia stricta* Haw.) und Stachelkugeln von *Opuntia monacantha* Haw. vorführen; außerdem werden wir die hexagonalen Kristalle beschreiben, die wir in Blatt- und Kladodienepidermis von *Opuntia tomentosa* S. D. gefunden haben.

Übertragung des Kakteenvirus

Das Kakteenvirus ist durch Pfropfung übertragbar, wie dies Rosenzopfs (1951) und Webers (1954) Versuche gezeigt haben. In jenem Partner, der vor der Pfropfung ohne Eiweißspindeln war, erscheinen die ersten Kristalle mehrere Woche nach der Pfropfung (Rosenzopf, 1951) oder sogar erst nach mehreren Monaten (Weber, 1954).

Die Virusübertragung durch infektiösen Preßsaft hat schon Rosenzopf mit Erfolg ausgeführt, und zwar in der Weise, daß die Epidermis-Flächenschnitte in einer Reibschale zerquetscht wurden und der gewonnene Gewebesaft mit einer Injektionskanüle in die gesunde Kaktee eingespritzt wurde. Die ersten Symptome (Eiweißspindeln) wurden erst nach 5 bis 6 Wochen wahrgenommen. Bei einem in analoger Weise

ausgeführten Versuche haben Miličić und Plavšić (1956) die ersten Zelleinschlüsse nach drei Wochen beobachtet. Gelegentlich der Infektionsversuche von Amelunxen (1958) entstanden die ersten Krankheitszeichen nach 51 bzw. nach 38 Tagen.

Das Kakteenvirus ruft keine sicheren äußeren Krankheitssymptome hervor, so daß wir auf eine mikroskopische Untersuchung angewiesen sind, wenn wir feststellen wollen, ob die Pflanzen infiziert sind. Als ein sicherer Nachweis der Infektion kann uns dabei nur die Anwesenheit der X-Körper oder Eiweißspindeln dienen, die sich — wenigstens bei der Mehrheit der bekannten Wirtspflanzen — in der Kladodien- und Blatt-epidermis dauernd sehr reichlich befinden. Wegen des Fehlens der äußeren Symptome ist die Untersuchung der Virusübertragung erschwert (vgl. Amelunxen, 1958, S. 147).

Es ist schon lange bekannt, daß die Inokulation der Viren mit Hilfe des Preßsaftes einen besseren Erfolg haben kann, wenn diese durch Anreibung der Organe bei Zusatz von Karborundpuder ausgeführt wird (Kalmus und Kassanis, 1945). Da die Inkubation mit Injektionen zu lang dauerte, haben wir versucht, die Inokulation des Virus mit dieser Methode durchzuführen. Der Preßsaft für die Inokulation wurde so bereitet, daß in einer Reibschale Flächenschnitte von Kladodienoberfläche einer *Epiphyllum bridgesii*-Pflanze zerquetscht waren. Nach der Inokulation wurde das behandelte Material wenigstens durch 24 Stunden in einem luftfeuchten Raum gehalten. Die Infektion kann mit Erfolg auch an den von Mutterpflanze getrennten Kladodien von *Epiphyllum* oder *Opuntia* ausgeführt werden. In letztem Falle haben wir die behandelten Kladodien in Petrischalen gehalten, deren Innenseiten mit feuchtem Filtrierpapier belegt waren.

Die gesunden Pflanzen, die wir für diese Versuche brauchten, stammten aus den Glashäusern des Botanischen Gartens der Universität Zagreb. Häufig haben wir Kladodien eines größeren Exemplares von *Epiphyllum bridgesii* benützt, das auf eine *Pereskia* gepfropft wurde. Dieses Exemplar wurde durch mehrere Jahre mehrmals mikroskopisch untersucht, niemals aber enthielt es Eiweißspindeln. Für Infektionsversuche dienten uns auch junge *Opuntia inermis*- und *Epiphyllum bridgesii*-Pflanzen, die für diese Zwecke aus Samen bzw. aus spindelfreien Stecklingen gezogen wurden. Gelegentlich der Inokulation der jungen Kladodien von *Epiphyllum* geschah es häufig, daß einige Tage nach der Behandlung die Kladodien infolge Verletzung und Austrocknung von Mutterpflanze abfielen. Durch die Behandlung der älteren, basalen statt der jungen Kladodien konnte man diese Schwierigkeit vermeiden.

Ungefähr 20 gesunde Kladodien von *Epiphyllum bridgesii* wurden mit infektiösem Preßsaft kranker Exemplare derselben Art bei Karborundzusatz infiziert. Die ersten Spindeln wurden in großer Anzahl schon 6 Tage nach der Inokulation beobachtet, wenn die Kladodien bei Zimmertemperatur von 25° C gehalten wurden. Es ist interessant, daß wir

dabei X-Körper nicht finden konnten, sondern nur Eiweißspindeln. Es scheint demnach, daß auch bei Kakteenvirus, wie bei Tabakmosaikvirus (B a w d e n, 1950:40), die Viruskristalle entweder mittels der X-Körper oder direkt entstehen können. Die zuerst erscheinenden kristallinen Körper hatten keine regelmäßige Spindelform, sondern die Form von Stäbchen und Nadeln, die sich häufig in größerer Anzahl in einer Zelle befanden (Abb. 1).

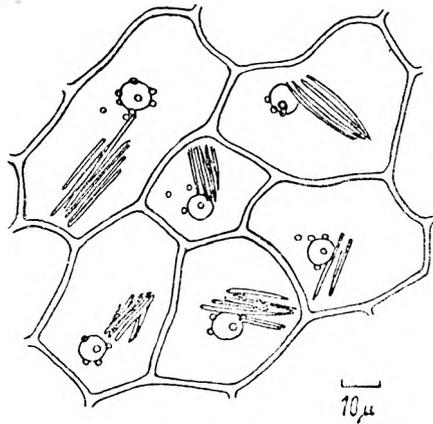


Abb. 1. *Epiphyllum bridgesii*. Die ersten »Spindeln«, die in einer vorher spindelfreien Pflanze an der Inokulationsstelle entstanden sind.

In einem anderen Versuche wurden in derselben Weise drei jüngere Kladodien von *Opuntia inermis* infiziert. Der infektiöse Gewebesafte wurde aus den saftigen Blättern von *Opuntia monacantha* ausgepreßt, die sich für Inokulationszwecke als sehr geeignet gezeigt haben. Die »Inkubation« dauerte in diesem Falle 8 bis 10 Tage. Auch bei diesen Pflanzen haben wir als erstes Krankheitssymptom nur kristalline Körper wahrgenommen. Die Zellen mit diesen Einschlußkörpern waren in großer Anzahl vertreten und auf die ganze behandelte Kladodienoberfläche zerstreut. Wie bei *Epiphyllum* so auch bei dieser Opuntie entstanden die Einschlußkörper besonders reichlich in der Epidermis.

Wie aus den oberen Angaben hervorgeht, dauert die »Inkubation« viel länger, wenn die Virusübertragung mittels Injektionskanülen oder Pfropfung erfolgt, als wenn das Virus mittels Karborundpuders inokuliert wird. Diese Erscheinung ist nach unserer Meinung durch relativ langsame Verbreitung des Virus in den Wirtspflanzen erklärbar. Im ersten Falle, d. h. bei der Virusübertragung mit Injektionskanülen oder Pfropfung, werden zuerst die Zellen im inneren Gewebe infiziert. Das

Virus braucht sehr viel Zeit, um von diesen inneren Zellen in die Epidermis zu gelangen, wo seine Anwesenheit mit Hilfe dünner Flächenschnitte leicht nachweisbar ist, und zwar auf Grund des Vorkommens der Eiweißspindeln. Demgegenüber bei Anwendung des Karborundpuders werden die Epidermiszellen direkt infiziert, so daß in ihnen Eiweißspindeln schneller entstehen können, weil ein Durchgang durch mehrere Zellen nicht notwendig ist.

Schon in früheren Untersuchungen hat Miličić (1956 b) festgestellt, daß *Opuntia inermis*-Pflanzen aus Rovinj in Istrien spindelhaltig und -frei sein können. Auf Grund der Anwesenheit bzw. Abwesenheit der Eiweißspindeln in den Pflanzen aus verschiedenen Fundorten in Rovinj konnte er vermuten, daß das Kakteenvirus durch Samen nicht übertragbar ist. Die spindelhaltigen Pflanzen befanden sich nämlich in Parkanlagen, wo sie höchst wahrscheinlich aus Stecklingen gezogen wurden, weil sich die Opuntien durch diese viel leichter und schneller als durch Samen vermehren können. Da sich die Viren auf diese Weise regelmäßig übertragen können, so konnten aus infizierten Stecklingen spindelhaltige Pflanzen entstehen. Demgegenüber haben sich die spindelfreien Pflanzen mutmaßlich später spontan aus Samen der spindelhaltigen Exemplare entwickelt, was aus dem Umstand hervorgeht, daß sie außerhalb der Parkanlagen als verwilderte Pflanzen wuchsen. Diese aus Samen entwickelten Pflanzen sind ohne Spindeln geblieben, weil die Viren durch Samen meistens nicht übertragbar sind.

Um feststellen zu können, ob das Kakteenvirus wirklich durch Samen nicht übertragbar ist, haben wir aus Samen spindelhaltiger *Opuntia inermis*-Pflanzen 40 junge Exemplare gezogen. Nach zwei Jahren, als die Pflanzen genug groß geworden sind, wurden sie einer mikroskopischen Durchmusterung unterzogen. Dabei wurde die Blattepidermis (je zehn zirka 2 mm² große Flächenschnitte von jeder jungen Pflanze) und die Kladodienepidermis (zwei zirka 10 mm² große Flächenschnitte von jeder Pflanze), also die Pflanzenteile, wo die Eiweißspindeln am häufigsten vorkommen, genauer untersucht, aber in keinem Exemplar konnten wir Eiweißspindeln finden. Diese Körper sind nämlich dauernd in den infizierten Kakteen anwesend, so daß wir auf Grund ihrer Abwesenheit in den angeführten Geweben schließen konnten, daß die jungen Pflanzen gesund sind.

Dieser Versuch zeigt demnach, daß das Kakteenvirus durch Samen nicht übertragbar ist, so daß es auch nach dieser Eigenschaft von meisten anderen Pflanzenviren nicht zu unterscheiden ist. Daß die jungen Pflanzen, die wir für diesen Versuch brauchten, schon genug entwickelt waren, um die Spindeln bilden zu können, war mittels Infektionsversuche bewiesen, währenddessen in drei jungen Pflanzen 8 bis 10 Tage nach der Inokulation Eiweißspindeln entstanden sind.

Rhombenförmige Plättchen

Diese Körper wurden von Miličić (1956 a) in Eiweißspindel-führenden *Opuntia inermis*-Pflanzen gefunden (Abb 2). Da er in spindel-freien Exemplaren derselben Art, d. h. in nicht infizierten Pflanzen, die Plättchen nicht finden konnte, meinte er, daß diese Gebilde von Virusinfektion abhängig sind.

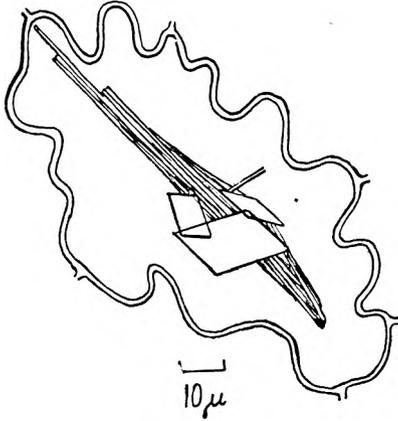


Abb. 2. *Opuntia inermis*. Epidermiszelle des Blattes. Rhombenförmige Plättchen und eine Eiweißspindel.

Da uns jetzt 40 junge, aus Samen gezogene Pflanzen von *Opuntia inermis* zur Verfügung standen, die sich in gesundem, spindelfreiem Zustande befanden, konnten wir mit Sicherheit feststellen, ob die rhombenförmigen Plättchen von spindelbildendem Virus abhängen. Die Untersuchung, ob die Plättchen in diesen nicht infizierten Pflanzen anwesend sind, wurde parallel mit den schon angeführten Beobachtungen über die Übertragung des Kakteenvirus ausgeführt. Dabei konnten wir feststellen, daß die Plättchen in fast allen jungen Pflanzen anwesend sind, weil wir von 40 untersuchten Exemplaren nur in zwei Pflanzen die Plättchen nicht finden konnten. Das Vorkommen dieser Kristalle in so großer Anzahl spindelfreier Exemplare zeigt, daß die Plättchen mit dem Kakteenvirus nicht Gemeinsames haben und daß sie sehr wahrscheinlich einen normalen Zellbestandteil von *Opuntia inermis* darstellen. Die frühere Meinung, daß die Plättchen in spindelfreien Exemplaren fehlen (Miličić, 1956 a), war also nicht richtig und gründete sich auf der Durchmusterung ungenügender Anzahl nicht infizierter Exemplare.

Die rhombenförmigen Plättchen sind relativ selten. In vielen Flächenschnitten durch die Blattepidermis (zirka 2 mm² große Schnitte) konnten wir diese Gebilde nicht beobachten; nur in 25 bis 50% solcher Schnitte waren sie anwesend, und zwar häufig in sehr wenigen Zellen. Es ist sehr

wahrscheinlich, daß die Plättchen in allen 40 Exemplaren vorkommen, aber daß diese in einigen Pflanzen sehr selten sind. Das geht aus dem Umstand hervor, daß wir bei mehreren Pflanzen erst während einer wiederholten Durchmusterung der Blätter die Plättchen finden konnten.

Die rhombenförmigen Kristalle sind in der Sippe *Opuntia inermis* ziemlich verbreitet, weil wir diese nicht nur in den Exemplaren aus Rovinj, sondern auch in den spindelfreien Pflanzen aus Dubrovnik, Split und Insel Hvar beobachtet haben. Außerdem waren dieselben Kristalle auch in den Exemplaren anwesend, die wir aus dem Botanischen Garten Berlin-Dahlem bekommen haben. Für die letzte Sendung sind wir der Direktion dieses Gartens sehr viel zu Dank verpflichtet.

Miličić (1956 a) hat auch einige Beobachtungen gemacht, auf Grund welcher er vermuten konnte, daß sich die Plättchen im Zellsafte befinden. Während dieser Untersuchung haben wir uns von der Richtigkeit dieser Meinung überzeugt, so daß wir jetzt halten, daß diese Kristalle immer in der Vakuole lokalisiert sind. Diese Überzeugung gründet sich auf folgenden Beobachtungen: Die rhombenförmigen Plättchen waren sehr häufig an den Körnchenaggregaten angewachsen, die sich im Zellsafte befanden (vgl. Miličić, 1956 a). Während der Färbung der Schnitte mit Neutralrot (1:10000, pH 7,1) färbten sich die Körnchenaggregate und die Plättchen kräftig rot. Gelegentlich dieses Färbungsversuches entstehen in den Vakuolen sehr kleine Entmischungstropfen, die sich teilweise an die Körnchenaggregate anlegen. Die Anlagerung der Tropfen ist manchmal sehr reichlich, was zur Folge hat, daß die Aggregate so stark bedeckt werden, daß ihre körnige Struktur nicht mehr sichtbar ist, sondern sie ein homogenes Aussehen bekommen. Im letzteren Falle erhalten diese Gebilde die Form rundlicher Körper, die viel größer als die Aggregate sind. Diese Veränderung könnte nicht entstehen, wenn die Aggregate im Cytoplasma lokalisiert wären, weil die Anlagerung der Substanz durch Cytoplasma verhindert würde. Da die Plättchen häufig mit in dieser Weise veränderten Aggregaten im festen und deutlichen Kontakt stehen, müssen sie sich auch in der Vakuole befinden.

In sehr seltenen Fällen entsteht am Schnitttrande in gefärbten Zellen eine traumatische Vakuolenkontraktion, währenddessen wir auch feststellen konnten, daß die Plättchen und Körnchenaggregate eine intravakuoläre Lokalisation besitzen (vgl. Miličić und Plavšić, 1956). Was die Beobachtung von Miličić (1956 a) betrifft, daß sich die Plättchen im horizontal gestellten Mikroskop bei vertikaler Orientierung des Präparates in der Zelle manchmal nicht verlagern können, so könnte die Verlagerung der Körper von zahlreichen Cytoplasmafäden verhindert werden, die die Vakuolen durchziehen. Wir vertreten also die Meinung, daß sich die Plättchen ständig in der Vakuole befinden.

Außer den Körnchenaggregaten und Plättchen kommen manchmal im Zellsafte der Epidermiszellen auch kugelige Gebilde vor, die sehr stark vakuolisiert sind (Abb. 3). Über die Natur dieser Gebilde können wir noch nicht Sicheres sagen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß sie durch

Quellung und Zersetzung der Körnchenaggregate entstehen. Da diese vakuolisierten Gebilde den X-Körpern ähnlich sind, können sie mit den letzteren Körpern leicht verwechselt werden. Daß es sich dennoch um intravakuoläre Gebilde und nicht um X-Körper handelt, konnten wir auf Grund ihrer Brownscher Bewegung und Verlagerung in der Zelle bei vertikaler Orientierung des Präparates beschließen.

Mit Rücksicht auf ihre chemischen Eigenschaften und Lokalisation in der Zelle stimmen die Plättchen mit den Eiweißdrusen von *Epiphyllum* überein (Miličić und Plavšić, 1956). Daß die ersteren Körper in

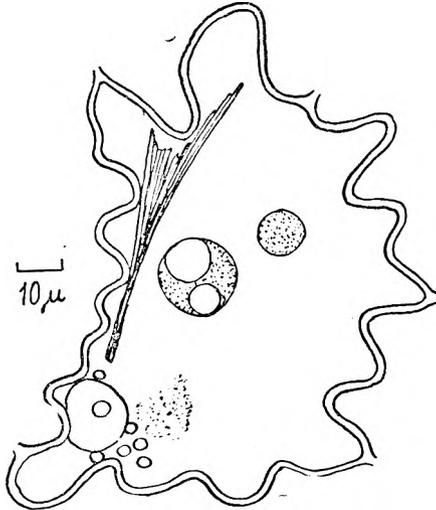


Abb. 3. *Opuntia inermis*. Kugelige Gebilde im Zellsafte einer Blatt-epidermiszelle. Links in der Zelle ist eine Eiweißspindel sichtbar, unten neben dem Zellkern ein Körnchenaggregat.

keinem Zusammenhang mit dem die Eiweißspindeln bildenden Virus stehen, geht aus den angeführten Versuchen deutlich hervor. Die Übereinstimmung dieser zwei Gebilde in ihrer Lokalisation in der Zelle weist auf die Möglichkeit hin, daß sie auch in ihren Beziehungen gegenüber den Eiweißspindeln gleich sind, d. h. daß sie von diesen Viruskörpern nicht abhängig sind. Es ist deshalb notwendig den Charakter der Eiweißdrusen experimentell nachzuprüfen und festzustellen, ob sie normale oder von Virus bedingte Zellbestandteile sind.

Stachelkugeln von *Opuntia monacantha*

Diese kristallinen Körper wurden von Weber, Kenda und Thaler (1952 b) in panaschierten Exemplaren von *Opuntia monacantha* entdeckt. Neben anderen Beobachtungen wurde dabei an diesen Kristallen

eine Reihe von Reaktionen ausgeführt, auf Grund dessen vermutet werden konnte, daß sie Eiweißstoffe enthalten. Dieselben Körper wurden später von *A m e l u n x e n* (1956 a) untersucht.

Das Untersuchungsmaterial von *Opuntia monacantha*, auf dem wir folgende Beobachtungen durchgeführt haben, stammte teilweise aus dem Botanischen Garten der Universität Zagreb und teilweise aus den Gärten in Hvar und Rijeka. Alle Exemplare waren spindelhaltig und enthielten häufig Stachelkugeln in der Epidermis der Kladodien und Blätter. Für Lebenduntersuchung waren die Blattepidermen besonders geeignet.

Die Stachelkugeln können neben der regelmäßigen Kugelform (*W e b e r, K e n d a* und *T h a l e r*, 1952 b), auch verschiedene unregelmäßige Formen besitzen, die jenen von *Epiphyllum*-Eiweißdrusen sehr ähnlich

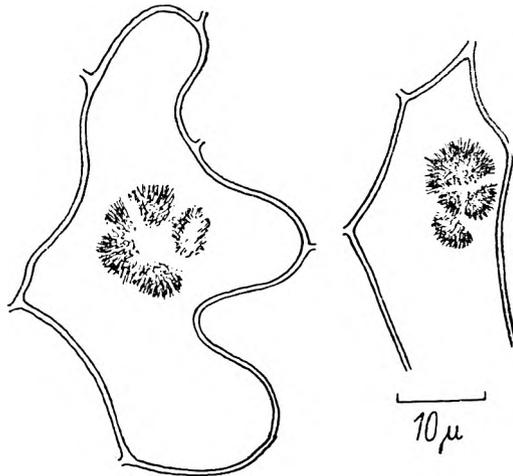


Abb. 4. *Opuntia monacantha*. Epidermiszellen des Kladodiums. Zerfall der Stachelkugeln.

sind, so daß unter den Stachelkugeln und Eiweißdrusen keine wesentlichen morphologischen Unterschiede bestehen. Manchmal können die Kugeln in mehrere Stücke zerfallen (Abb. 4). In vielen Fällen konnten wir, besonders in Blattepidermis, beobachten, daß die Stachelkugeln in einer Gallerte eingebettet sind, die die Kugeln von allen Seiten als eine gleichmäßig dicke Hülle umgibt. Im peripheren Teile dieser durchsichtigen Gallerte kann man häufig winzige unbewegliche Körnchen beobachten, die mit Hülle fest verbunden sind (Abb. 5).

In unseren nicht panaschierten Exemplaren von *Opuntia monacantha* befinden sich die Kugeln häufig, aber nicht immer, mit den Eiweißspindeln in ein und derselben Zelle. Was die Verteilung der Kugeln in diesen Pflanzen betrifft, konnten wir während der Durchmusterung einiger Exemplare im späten Herbst konstatieren, daß die Kugeln nur in jüngsten

Kladodien vorkommen, in den älteren dagegen fehlen. Demgegenüber waren die Eiweißspindeln auch in den letzteren Kladodien in reichlichen Maße anwesend. Demnach stimmt die Verteilung der Stachelkugeln und der Eiweißspindeln in den Pflanzenteilen von *Opuntia monacantha* nicht überein.

Weber, Kenda und Thaler (1952 b) haben schon berichtet, daß die Stachelkugeln im Gemisch von Flemming fixiert werden können; wir werden nur hinzufügen, daß sich diese Kristalle auch in Sublimat-Alkohol fixieren lassen.

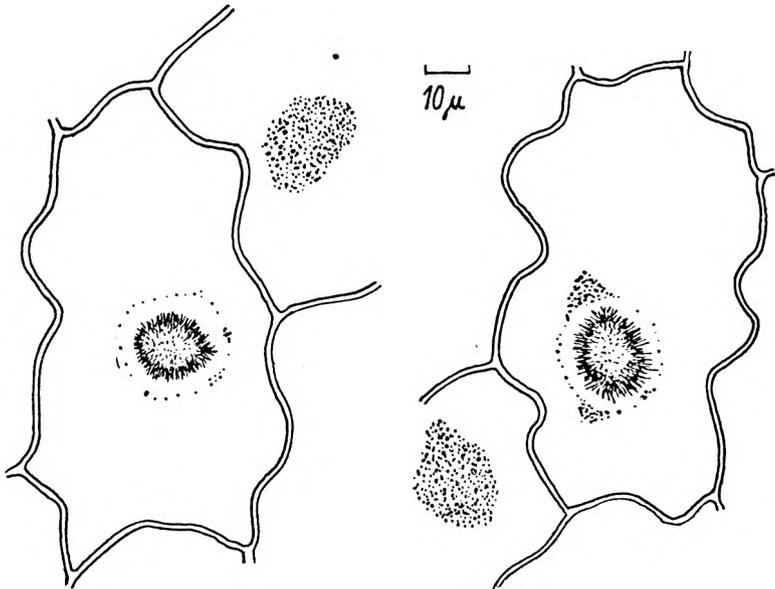


Abb. 5. *Opuntia monacantha*. Epidermiszellen des Blattes. Stachelkugeln in einer Gallerthülle. In den benachbarten nur teilweise gezeichneten Zellen ist je ein Körnchenaggregat zu sehen.

Da schon früher von Miličić und Plavšić (1956) bewiesen wurde, daß sich die den Stachelkugeln sehr ähnlichen Eiweißdrüsen regelmäßig im Zellsafte befinden, haben wir versucht auch die Lokalisation der Stachelkugeln in der Zelle genauer zu untersuchen. Dabei haben wir wahrgenommen, daß auch die Stachelkugeln, besonders jene von kleinerem Umfang, die Brownsche Bewegung häufig zeigen können. Solche Kugeln waren imstande, bei horizontaler Orientierung des Mikroskopes ihre Lage in der Zelle zu verändern und dabei vom oberen in den unteren Teil der Zelle zu fallen. Einmal haben wir auch die Geschwindigkeit des Kugelfallens gemessen: die Kugel brauchte vier Minuten, um eine $140\ \mu$ lange Zelle durchzuwandern. Viele Kugeln zeigten doch keine Brownsche Bewegung und konnten sich nicht im

horizontalen Mikroskop verlagern. Auf Grund dieser Beobachtungen konnten wir doch beschließen, daß sich mindestens ein Teil der Kugeln in der Vakuole befindet.

Eine große Hilfe für die Bestimmung der Lokalisation der Stachelkugeln in der Zelle kann die vitale Färbung mit einer wäßrigen Lösung von Neutralrot geben. Dieser Farbstoff verursacht bei höherem pH eine Rotfärbung des Zellsaftes. Nach der Behandlung der Kladodienepidermis mit dieser Lösung färben sich die Vakuolen und die Kugeln kräftig rot (Taf. I). In vielen Fällen bilden sich dabei in der Vakuole kleinere oder größere rotgefärbte Entmischungstropfen, die sich häufig an die Stachelkugeln anlegen. Dieser Prozeß war manchmal so intensiv und die Kugeln von Tropfen so vollständig bedeckt, daß ihre Stachelspitzen häufig nicht mehr sichtbar waren. Die mit solchen Entmischungstropfen bedeckten Stachelkugeln bekamen dadurch eine glatte Oberfläche (Abb. 6). Diese Erscheinung entstand gleichmäßig in allen Epidermiszellen der Schnitte, und zwar in den Zellen mit beweglichen und unbeweglichen Stachelkugeln. Deshalb meinen wir, daß alle Kugeln eine gleiche Lokali-

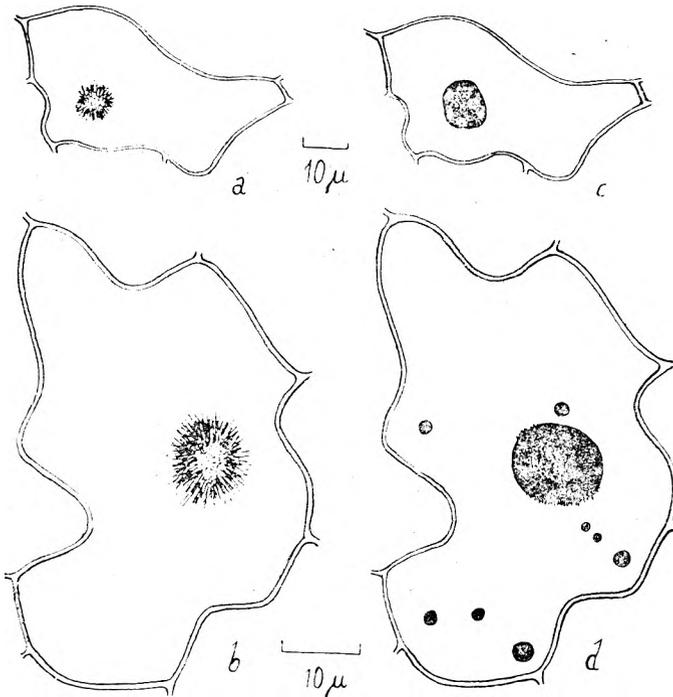


Abb. 6. *Opuntia monacantha*. Epidermiszellen des Kladodiums. Bedekung der Stachelkugeln mit Entmischungstropfen während der Behandlung mit Neutralrot. a und b vor, c und d nach der Vitalfärbung.

sation in der Zelle besitzen dürften; sie müssen sich im Zellsafte befinden, sonst könnten die Kugeln nicht mit Entmischungstropfen bedeckt werden, weil dieser Prozeß im Falle einer intraplasmatischen Lokalisation von Protoplasma verhindert worden wäre.

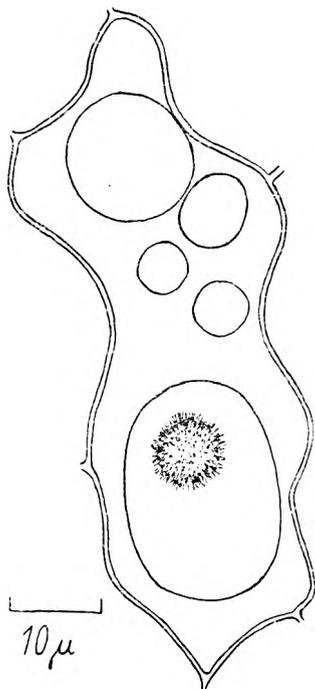


Abb. 7. *Opuntia monacantha*. Mehrere kontrahierte Vakuolen in einer Epidermiszelle des Kladodiums. In der größten Vakuole liegt eine Stachelkugel.

Außer mit Neutralrot läßt sich die Zellsaffärbung auch mit dem basischen Farbstoffe Methylenblau hervorrufen. Wenn wir eine alkalische wäßrige Lösung dieses Farbstoffes verwenden, die eine Konzentration von 1:10000 und pH über 11 enthält, färben sich die Vakuolen und die Stachelkugeln blau, im Zellsafte aber entstehen dabei keine Entmischungstropfen. Durch die Tatsache, daß sich die Kugeln während der Vitalfärbung anfärben lassen, wird die Meinung unterstützt, daß die Kugeln in der Vakuole lokalisiert sind.

Gelegentlich der Neutralrot-Färbung konnten wir häufig am Schnitt-rande eine traumatische Vakuolenkontraktion beobachten. Die kontrahierten Vakuolen und die Stachelkugeln waren kräftig rot angefärbt, so daß sich diese vom gequollenen und ungefärbten Protoplasma sehr stark unterschieden. Die Stachelkugeln befanden sich immer in der verkleinerten Vakuole und niemals im vergrößerten Protoplasma, das jetzt einen großen Teil des Zellumfanges einnahm (Abb. 7).

Während die Vitalfärbung und die Vakuolenkontraktion deutlich zeigen, daß sich die Stachelkugeln im Zellsafte befinden, geben die Versuche mit Verlagerung dieser Körper im horizontalen Mikroskop keine einheitlichen Ergebnisse. Wir meinen doch, daß alle Stachelkugeln in den Vakuolen liegen. Der Umstand, daß sich einige Kugeln bei vertikaler Orientierung des Präparates nicht verlagern lassen und keine Brownsche Bewegung zeigen, kann sich mit dem Vorhandensein verschiedener mechanischer Hindernisse in der Zelle erklären, die die Bewegung der Kugeln verhindern. Durch das Messen des Kugeldurchmessers und der Höhe der Epidermiszellen konnten wir feststellen, daß diese zwei Größen ziemlich übereinstimmen, so daß sich mindestens ein Teil der Kugeln wegen der Berührung der oberen und unteren Epidermis-Zellwand bzw. des wandständigen Plasmabelags nicht bewegen kann. Wenn sich um die Stachelkugeln eine Gallerthülle befindet, dann kann auch diese durch die Vergrößerung des Durchmessers des gesamten Gebildes in demselben Sinne wirken.

Außerdem vermögen auch zahlreiche cytoplasmatische Fäden, die die Vakuole durchziehen, ein mechanisches Hindernis darzustellen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß auch andere Hindernisse bestehen, die die Bewegung unmöglich machen.

Was die Frage über die Entstehung der Stachelkugeln betrifft, werden wir folgende Beobachtung vorführen. Manchmal konnten wir in der Blattepidermis nebeneinander Zellen mit einem Körnchenaggregat und Zellen mit in einer Gallerte eingebetteten Stachelkugeln beobachten. Da im peripheren Teil der Gallerthülle zahlreiche Körnchen vorhanden waren, die jenen aus Körnchenaggregaten nach der Größe und Lichtbrechung sehr ähnlich waren (Abb. 5), haben wir den Eindruck bekommen, daß die Stachelkugeln durch Kristallisation im Innern der Körnchenaggregaten entstanden sind; während der Entstehung der Kugeln mußten sich zahlreiche Körnchen aus den Aggregaten in die Stachelkugeln umwandeln. Doch konnten sich diese zwei Gebilde auch zufällig in den benachbarten Zellen finden und miteinander in keinem genetischen Zusammenhang stehen. Wir werden hier noch betonen, daß sich während der Färbung mit Neutralrot die Körnchenaggregate, die Stachelkugeln und die Körnchen aus den peripheren Teilen der Gallerthülle kräftig rot anfärben. Im Zusammenhang mit der Frage über die Entstehung der Stachelkugeln werden wir hinzufügen, daß sich die Körnchenaggregate und die den Stachelkugeln sehr ähnlichen Eiweißdrusen in derselben Vakuole nebeneinander befinden können (Miličić und Plašić, 1956).

Es scheint uns, daß auch die Körnchenaggregate eine Gallerte als ihre Grundsubstanz besitzen. In einer ähnlichen Gallerte sind manchmal in den Blattzellen von *Opuntia monacantha* auch zahlreiche Nadelkristalle vorhanden, deren Natur noch unbekannt ist (Abb. 8). Gleichermassen wissen wir sehr wenig über die Körnchenaggregate, so daß noch Ungewissheit darüber besteht, ob sie immer dieselben Körper darstellen.

Es geht aus diesen Beobachtungen hervor, daß die Eiweißdrusen von *Epiphyllum* und die Stachelkugeln von *Opuntia monacantha* sehr ähnliche

Körper sind, die nach ihrer Form und Lokalisation in der Zelle übereinstimmen. Es bleibt aber uns noch immer unbekannt, ob diese Körper in irgend welchem Zusammenhang mit den Proteinspindeln stehen. Um dies festzustellen, müßten noch eingehende Versuche ausgeführt werden.

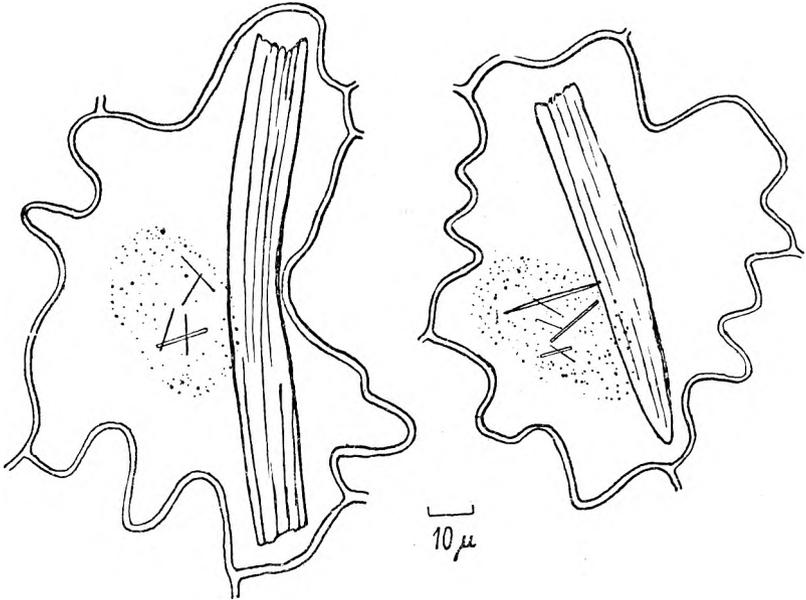


Abb. 8. *Opuntia monacantha*. Nadelkristalle in einer Gallerte. Neben diesen Körpern sind Eiweißspindeln sichtbar.

Hexagonale Eiweißkristalle

In den Trichomen und Epidermiszellen der Kladodien und Blätter von *Opuntia tomentosa* haben wir bis jetzt nicht bekannte hexagonale Kristalle gefunden. Diese Körper waren fast immer regelmäßig gebaut und bestanden aus zwei niedrigen sechseitigen Pyramiden. In der Abb. 9 sind diese Körper in Profil- und Flächenstellung sichtbar. Ziemlich selten konnten wir doch auch Kristalle finden, die aus zwei oder drei angewachsenen hexagonalen Körpern aufgebaut wurden.

Die hexagonalen Kristalle sind in Essigsäure und Alkohol-Essigsäure löslich, sie können aber mit Alkohol und Sublimat-Alkohol fixiert werden. Nach der Fixierung mit letzterem Mittel werden sie sehr intensiv mit Säurefuchsin färbbar. Sie stimmen demnach in dieser Eigenschaft mit den Proteinkristallen überein (M o l i s c h, 1913). Daß die Eiweißkristalle von *Opuntia tomentosa* Eiweißnatur besitzen, wurde durch den positiven Resultat der M i l l o n s c h e n, X a n t h o p r o t e i n - und R a s p a i l s c h e n Reaktion, sowie durch die Verdauung mit Trypsin und Pepsin nachgewiesen. Dem-

gegenüber konnte die Biuretreaktion nicht ausgeführt werden, denn die Kristalle lösen sich schon in konzentrierter CuSO_4 . Im Feulgen-Reagens blieben die Kristalle ungefärbt.

Neben den Proteinkristallen wurden manchmal in der Blattepidermis einem Oktaeder ähnliche CaC_2O_4 -Kristalle wahrgenommen, die mit Rücksicht auf ihre Größe und ihr Aussehen in Profilstellung den Proteinkristallen ähnelten. Um einen Irrtum zu vermeiden, wurde vor jedem Versuch die Art der Kristalle untersucht, so daß die folgenden Beobachtungen sicher an hexagonalen Kristallen durchgeführt worden sind.

Da sich die Eiweißkristalle bei anderen Kakteen in verschiedenen Zellteilen befanden, wurde auch der Zell-Lokalisation der hexagonalen Kristalle eine größere Aufmerksamkeit gewidmet. Bei den Kristallen

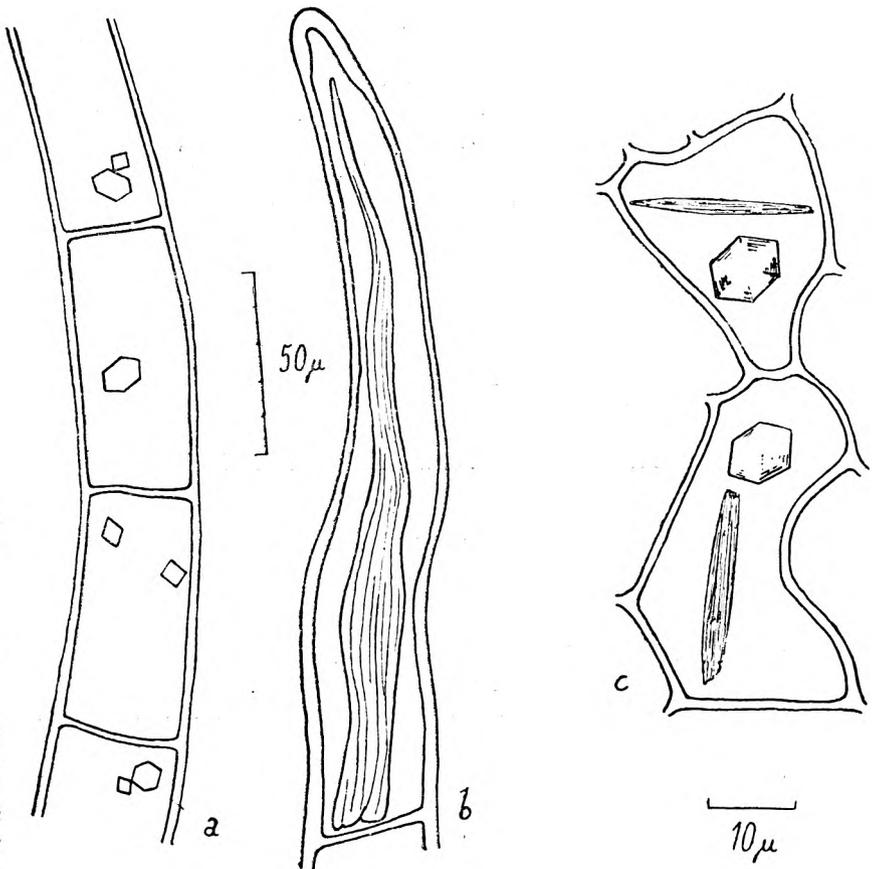
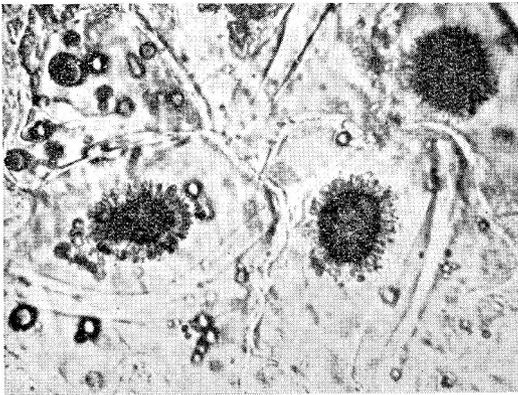
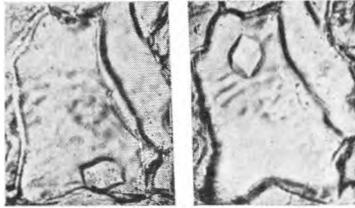


Abb. 9. *Opuntia tomentosa*. Eiweißspindeln und hexagonale Kristalle in den Haar- und Epidermiszellen der Kladodien.

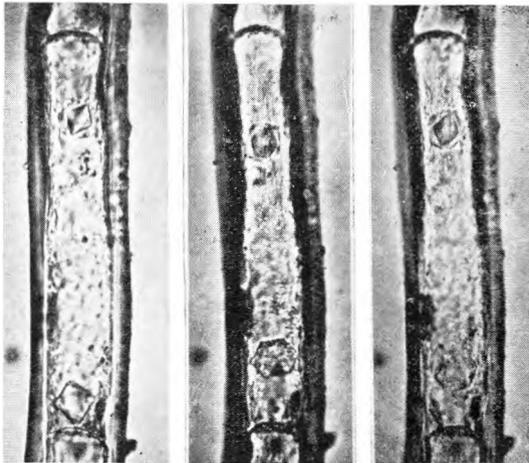


Opuntia monacantha. Blattepidermis. Während der Behandlung mit Neutralrot färben sich die Stachelkugeln kräftig rot, die Eiweißspindeln bleiben dabei ungefärbt.

TAFEL II



A. *Opuntia tomentosa*. Epidermiszelle des Blattes. Verlagerung eines hexagonalen Kristalls bei der vertikalen Orientierung des Präparates.



B. *Opuntia tomentosa*. Intra- und extranukleare Eiweißkristalle in einer Haarzelle

konnten wir oft Brown'sche Bewegung beobachten. Außerdem haben mehrere Versuche mit dem Mikroskop in horizontaler Stellung gezeigt, daß manche hexagonale Kristalle in der Zelle versetzbar sind und dabei in einer halben Minute von einem in den anderen Teil der Zelle gelangen (Taf. II, A). Die Kristalle, die ihre Lage in der Zelle änderten, färbten sich mit Neutralrot. Für diese Versuche wurden besonders die Kristalle aus den großen Blattepidermiszellen geeignet.

Den Versuch mit Neutralrot und KCNS, der von Miličić und Plavšić für den Nachweis der intravakuolären Lokalisation der Eiweißdrüsen verwendet wurde, konnten wir leider hier nicht anwenden, denn das Protoplasma quillt nicht unter dem Einfluß dieser Lösungen. Gleichermassen konnten wir bei unserer Pflanze nach der Plasmolyse mit Na_2CO_3 keine Vakuolenkontraktion hervorrufen (siehe Höfler, 1951). In diesem letzten Falle permeiert kurze Zeit nach der Plasmolyse das Plasmolytikum in die Vakuolen der Kladodienepidermis und der Zellsaft wird dadurch gelb gefärbt (Flavonolen!). Dieselbe Farbe bekommen oft auch die hexagonalen Kristalle, das Protoplasma vergrößert aber dabei sein Volumen in größerem Maße nicht. Nur einmal konnten wir eine traumatische Vakuolenkontraktion beobachten: in diesem Falle befand sich in der verkleinerten und rot gefärbten Vakuole ein hexagonaler Kristall, der intensiv das Neutralrot speicherte.

Auf Grund dieser Versuche und Beobachtungen geht hervor, daß ein Teil der hexagonalen Kristalle in der Vakuole lokalisiert ist. Der andere Teil der hexagonalen Kristalle muß sich teilweise im Zellkern und teilweise im Cytoplasma befinden. Die intranuklearen Eiweißkristalle waren gewöhnlich etwas kleiner als die extranuklearen (Taf. II, B); sie konnten daher von den letzteren leicht unterschieden werden und sie blieben außerdem bei Färbung mit Neutralrot ungefärbt. Im allgemeinen befanden sich die Kernkristalle ziemlich selten im untersuchten Material. Wenn aber in einer Epidermiszelle diese Kristalle gefunden wurden, so waren sie auch in anderen benachbarten Zellen anwesend. Extra- und intranukleare Kristalle waren manchmal nebeneinander in ein und derselben Zelle vorhanden (Taf. II, B). Nach genauer Beobachtung konnten wir konstatieren, daß sich bei den extra- und intranuklearen Kristallen um Körper derselben hexagonaler Struktur handelt.

Ein Teil der Kristalle ist gewiß im Cytoplasma lokalisiert. Nach unseren Beobachtungen unterschieden sich die cytoplasmatischen Kristalle von intravakuolären dadurch, daß die ersten bei vertikaler Stellung des Präparates ihre Lage in der Zelle nicht änderten und das Neutralrot nicht speicherten. In einigen Fällen konnten wir in zwei benachbarten Epidermiszellen Kristalle beobachten, die sich verschiedenartig benahmen: die ersten speicherten das Neutralrot und änderten ihre Lage in der Zelle, sie waren also in der Vakuole gestellt, die anderen blieben ungefärbt und hielten ihre Lage ohne Änderung fest, sie befanden sich also im Cytoplasma.

Demzufolge können die hexagonalen Kristalle in verschiedenen Zellteilen liegen: im Cytoplasma, in der Vakuole und im Zellkern.

In den Zellen von mehreren Exemplaren dieser Kakteenart konnten wir neben den hexagonalen Kristallen auch Eiweißspindeln finden (Abb. 10). Wie die Kristalle, so waren auch die Spindeln in der Epi-

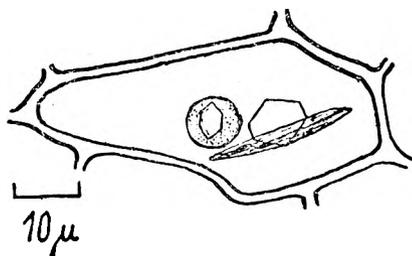


Abb. 10. *Opuntia tomentosa*. Eiweißspindel und verschiedenartig lokalisierte hexagonale Eiweißkristalle in ein und derselben Zelle.

dermis der Blätter und Kladodien vorhanden. Besonders die Proteinspindeln aus den Trichomen erreichten eine beträchtliche Größe (Abb. 9). Was die Häufigkeit der Eiweißspindeln betrifft, sie waren bei unserer Kaktee manchmal viel seltener, als sie gewöhnlich bei *Epiphyllum* auftreten.

Die Eiweißspindeln fanden sich oft sogar in denselben Zellen mit hexagonalen Kristallen zusammen. Die letzteren hatten dabei bald eine intranukleare bald eine extranukleare Lokalisation.

Um eine bessere Kenntnis über die Natur der hexagonalen Körper zu erreichen, bemühten wir uns mehrere Exemplare von *Opuntia tomentosa* aus verschiedenen Ländern zu verschaffen. In liebenswürdiger Weise haben uns Stecklinge dieser Art Herr H. Krainz (Städt. Sukkulenten-Sammlung, Zürich), Herr Prof. Dr. E. Werdermann (Botanischer Garten und Museum, Berlin-Dahlem), Herr Prof. Dr. A. Guillaumin (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris), Herr Prof. Concetto Distefano (Catania), Herr L. Marnier-Lapostolle (Jardin botanique »Les Cèdres«, St. Jean-Cap-Ferrat, Frankreich), Herr L. Vatrican (Jardin exotique, Monaco) und Herr F. Riviere de Caralt (Jardin Pinya de Rosa, Barcelona) gesendet. Die mikroskopische Durchsicht der Stecklinge hat gezeigt, daß Eiweißkristalle in verschiedener Weise verteilt waren (vgl. Tab. 1).

Wie aus der Tab. 1 sichtbar ist, befinden sich auch bei dieser Art die Eiweißspindeln sehr häufig in den Exemplaren, die aus botanischen Gärten stammen. Das stimmt gut mit den Ergebnissen unserer früheren am adriatischen Küstenlande durchgeführten Untersuchungen überein, während deren wir konstatieren konnten, daß die Eiweißspindeln häufig in jenen Kakteen vorkommen, die in den Gärten und Parkanlagen wachsen (Miličić, 1956 b). Demgegenüber haben dieselben Untersuchungen

TAB. 1. Verteilung der Eiweißkristalle in *Opuntia tomentosa*-Pflanzen von verschiedener Herkunft

Herkunft der Stecklinge	Eiweißspindeln	Hexagonale Kristalle
Berlin	+	+
Paris	+	(+)
Catania	+	+
St. Jean-Cap-Ferrat	—	?
" " " "	+	+
Monaco	—	(+)
Barcelona	+	+
Zagreb	+	+

gezeigt, daß die verwilderten, spontan wachsenden Pflanzen im Adriagebiete¹ Jugoslawiens stets ohne Eiweißspindeln sind.

Was die Eiweißspindeln von *Opuntia tomentosa* aus angeführten botanischen Gärten betrifft, befanden sich diese in verschaffenen Exemplaren nicht immer reichlich und in großer Anzahl, sondern blieben manchmal aus unbekanntem Gründen sehr selten. Daß einige spindelfreien Exemplare aus St. Jean-Cap-Ferrat und Monaco doch imstande waren, Eiweißspindeln zu bilden, zeigt ein Pfropfungsversuch, währenddessen als Unterlage die spindelführenden Exemplare und als Reis die genannten spindelfreien Pflanzen verwendet wurden. Nach drei Monaten in den vorher spindelfreien Pflanzen wurde eine große Anzahl von Eiweißspindeln wahrgenommen.

Was die hexagonalen Kristalle anbelangt, waren diese bei einigen Exemplaren ziemlich häufig. Demgegenüber in den Pflanzen aus Paris und Monaco konnten wir diese sehr selten finden, so daß wir lange Zeit meinten, daß diese Pflanzen ohne Kristalle sind. Später haben wir auch in diesen Pflanzen Kristalle gefunden, waren aber in sehr kleiner Anzahl anwesend. In einigen Exemplaren aus St. Jean-Cap-Ferrat konnten wir doch diese nicht wahrnehmen, obwohl ein reichliches Material durchmustert wurde.

Obwohl uns die bisherigen Untersuchungen nicht gestatten, über die Natur der Kristalle etwas mit Sicherheit zu beschließen, meinen wir doch, daß es wahrscheinlicher ist, daß die hexagonalen Kristalle normale Zelleinschlüsse sind. Wir halten also, daß diese Kristalle vom Virus nicht bedingt sind. Es ist außerdem ganz ausgeschlossen, daß die hexagonalen Kristalle Aggregate vom Kakteenvirus sind, weil die langen Partikeln dieses Virus nicht imstande sind, solche polyedrische Kristalle zu bilden.

¹ Im letzten Gebiete, und zwar bei Split und Šibenik, hat sich in besonders großer Exemplarenanzahl eine kleine *Opuntia* entwickelt, die von Visiani (1842) als *Opuntia nana* benannt wurde. Wir haben diese Art unter dem Einfluß von Hayek (1927) mit dem ungeeigneten Namen *Opuntia humifusa* bezeichnet (Miličić, 1956 b). Der neuere Name dieser Art ist *Opuntia compressa* (Sal.) Macbr. (vgl. Backeberg, 1958). Die Art ist imstande Eiweißspindeln zu bilden, wie dies uns ein Infektionsversuch gezeigt hat.

Diskussion

Gelegentlich dieser Untersuchungen hatten wir die Absicht neben anderem festzustellen, in welchem Zellteil verschiedene Arten von Kakteen-Eiweißkristallen lokalisiert sind. Die Beobachtungen wurden an den rhombenförmigen Plättchen von *Opuntia inermis*, an den Stachelkugeln von *Opuntia monacantha* und an den hexagonalen Kristallen von *Opuntia tomentosa* durchgeführt. Auf Grund verschiedener Versuche konnten wir konstatieren, daß sich die rhombenförmigen Plättchen und die Stachelkugeln regelmäßig in den Vakuolen befinden, die hexagonalen Kristalle dagegen sind nur teilweise in der Vakuole teilweise im Cytoplasma und Zellkern lokalisiert.

Wenn wir diesen Kristallen noch Eiweißdrusen hinzuzählen, die sich nach den Versuchen von Miličić und Plavšić (1956) im Zellsafte immer befinden, können wir konstatieren, daß die Eiweißkristalle der Kakteen ziemlich oft in den Vakuolen liegen. Sonst ist die Lokalisation der Proteinkristalle in den flüssigen Vakuolen bei anderen Pflanzen sehr selten, so daß bisher mit Sicherheit nicht festgestellt wurde, daß Eiweißkristalle in solchen Vakuolen vorkommen.

Außerdem haben wir Untersuchungen über die Natur dieser Kristalle begonnen. Da in Kakteenzellen häufig Eiweißspindeln, d. h. Aggregate von Virus-Makromolekeln, anwesend sind, beabsichtigten wir zuerst festzustellen, ob nicht auch die von uns untersuchten Kristalle von einer Virusinfektion bedingt sind. Die erzielten Ergebnisse werden wir im Folgenden besprechen.

Die rhombenförmigen Plättchen, deren Eiweißnatur Miličić (1956 a) bewiesen hat, wurden bis jetzt nur in der Blattepidermis von *Opuntia inermis* beobachtet, in anderen Organen dieser Pflanze und in anderen Kakteenarten konnten sie nicht gefunden werden. Sonst sind diese Kristalle in der Sippe *Opuntia inermis* ziemlich verbreitet, weil wir diese nicht nur in den Exemplaren aus Rovinj, sondern auch in den spindelfreien Exemplaren aus verschiedenen anderen Lokalitäten finden konnten. Da die rhombenförmigen Plättchen durch Samen übertragbar sind, scheinen sie keine Viruskörper, sondern normale Zellbestandteile zu sein. Es ist ganz sicher, daß die Plättchen vom spindelbildenden Virus nicht bedingt sind, weil sie auch in jenen Exemplaren vorkommen, die stets ohne Spindeln sind.

Während fast gewiß ist, daß die Plättchen einen normalen Charakter besitzen, ist die Natur der Stachelkugeln und der hexagonalen Kristalle sehr wenig bekannt. Die Stachelkugeln kommen bei den spindelhaltigen *Opuntia monacantha*-Pflanzen vor; die spindelfreien Exemplare dieser Art scheinen, in Zusammenhang mit den Eiweißkristallen bis jetzt nicht untersucht worden zu sein. Es wäre in erster Linie notwendig, aus Samen gezogene *Opuntia monacantha*-Pflanzen auf die Anwesenheit der Stachelkugeln zu erforschen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß diese Exemplare — wie dies sich auch bei den aus Samen gezogenen *Opuntia inermis*-Pflanzen gezeigt hat — ohne Spindeln sein werden. Wenn auch in spindelfreien

Pflanzen die Stachelkugeln gefunden werden werden. dann wird es gewiß sein, daß diese mit dem Kakteenvirus nichts Gemeinsames haben und sehr wahrscheinlich einen normalen Eiweißkörper darstellen.

Wie wir gesehen haben, befindet sich bei den Kakteen eine größere Anzahl verschiedener Eiweißkristalle. Heute ist schon ganz sicher, daß dieser Polymorphismus vom spindelbildenden Virus in allen Fällen nicht abhängig ist. Nach den angeführten Ergebnissen stellt eine Kristallart (rhombenförmige Plättchen) nicht nur keine Ansammlung von elementaren Partikeln dieses Virus dar, sondern steht gewiß in keinem Zusammenhang mit diesem Virus. Gleichermassen ist es ganz sicher, daß die hexagonalen Kristalle von Makromolekeln des spindelbildenden Virus nicht ausgebaut sind, weil seine langen und gekrümmten Partikeln nicht imstande sind, Kristalle solcher Form zu bilden. Außerdem ist nicht sicher, daß die Stachelkugeln bzw. die Proteindrüsen in irgend welchem Zusammenhang mit demselben Virus stehen. Demzufolge müssen wir auf Grund dieser Tatsachen beschließen, daß die Eiweißkristalle der Kakteen verschiedenen Charakter und Herkunft besitzen.

Wenn die Stachelkugeln, die rhombenförmigen Plättchen und die hexagonalen Kristalle Viruskörper wären, dann könnten diese Körper die Fähigkeit besitzen, nicht nur in einer Pflanzenart, sondern in mehreren Pflanzen in derselben Form vorzukommen. So z. B. erscheinen die hexagonalen Plättchen von Tabakmosaikvirus, die Eiweißspindeln der Kakteen und die Nadelbüschel von *Alliaria*-Virus (Miličić, Panjan, Bilanović und Katić, 1958) in ihrer typischen Form in den Zellen von verschiedenen Pflanzenarten. Zur Unterschied von diesen Viruskörpern sind unsere Kristalle viel mehr auf einzelne Kakteenarten gebunden. So z. B. — wieviel uns bis jetzt bekannt ist — kommen die rhombenförmigen Plättchen nur in *Opuntia inermis*, die hexagonalen Kristalle nur in *Opuntia tomentosa* vor. Was die Stachelkugeln betrifft, sie sind in *Opuntia monacantha* gefunden; ihnen sind aber die Eiweißdrüsen von *Epiphyllum* verwandt, die mit Rücksicht auf ihre Morphologie und Lokalisation in der Zelle mit Stachelkugeln völlig übereinstimmen. Deshalb könnten wir diese zwei letzteren Körper als identische Gebilde betrachten, die bei Kakteen ziemlich verbreitet sind. Sie sind aber doch nicht ganz gleich; wir konnten nämlich feststellen, daß sich diese zwei Körper während der Behandlung mit gesättigter alkoholischer Lösung von Sublimat verschiedenartig verhalten; die Stachelkugeln lassen sich in dieser Lösung sehr gut fixieren, die Eiweißdrüsen geben dagegen nicht immer gute und gleichartige Ergebnisse. Welchen Charakter haben diese zwei sonst sehr ähnlichen Körper, ist noch nicht bekannt. In Zusammenhang mit dieser Frage haben Miličić und Plavšić die Meinung vorgeführt, daß die Eiweißdrüsen Viruscharakter besitzen. Der Umstand, daß sich die Eiweißdrüsen regelmäßig in den Vakuolen befinden, in denen bei Kakteen normale Eiweißkristalle (rhombenförmigen Plättchen) vorkommen, zwingt uns zu halten, daß ihre Natur noch nachgeprüft werden müßte.

Auch die Natur der hexagonalen Kristalle dürfte erst gelegentlich der künftigen Untersuchungen genauer erklärt werden. Wir meinen, daß auch in diesem Falle eine Durchmusterung der jungen, aus Samen gezogenen Exemplare von *Opuntia tomentosa* sehr nützlich wäre, und zwar solcher Exemplare, deren Mutterpflanzen hexagonale Kristalle enthielten.

Bei der Beurteilung, ob ein Eiweißkörper Viruscharakter hat, bestehen viele Schwierigkeiten. Die Virus-Eiweißkörper — wie bekannt — besitzen die Fähigkeit, ihre Zellen zu verlassen und in die Zellen anderer Wirtspflanzen einzudringen. Demgegenüber sind die normalen kristallinen Eiweißkörper nicht fähig, in die anderen Pflanzen übertragen zu werden, sondern sie bleiben ständig in ihren Mutterzellen. Diese Eigenschaft der normalen Eiweißkörper ist eine negative Charakteristik, die sich auch nach vielen nicht gelungenen Übertragungsversuchen mit Sicherheit nicht beweisen, sondern nur mehr oder minder wahrscheinlich machen kann. Es ist nämlich möglich immer wieder anzunehmen, daß eine Wirtspflanze besteht, in die der betreffende Eiweißkörper übertragen werden kann. Deshalb sind wir bei der Beurteilung, ob ein Kristall normale Natur oder Viruscharakter besitzt, gezwungen, einige andere wichtige Eigenschaften der Viren bzw. der normalen Eiweißkörper zu nützen, wie z. B. die Unfähigkeit für die Übertragung durch Samen, die Verbreitung in der betreffenden Sippe, die chemische Zusammensetzung u. s. w. (vgl. Thaler, 1955/1956; Weber, 1953/1954 b).

ZUSAMMENFASSUNG

I. Die mechanische Übertragung des Kakteenvirus, das in den Zellen seiner Wirtspflanzen Eiweißspindeln bildet, kann durch Abreibung der Kladodienepidermis mit infektiösem Preßsaft bei Karborundzusatz ausgeführt werden. Bei solcher Übertragung entstehen die ersten Spindeln in den Epidermiszellen schon 6 bis 10 Tage nach der Inokulation. Dasselbe Virus ist durch Samen nicht übertragbar, wie das ein Versuch mit 40 jungen *Opuntia inermis*-Pflanzen gezeigt hat.

II. Die eiweißhaltigen rhombenförmigen Plättchen von *Opuntia inermis* sind regelmäßig in den Vakuolen der Blattepidermis lokalisiert. Ihre Entstehung ist vom spindelbildenden Virus nicht bedingt, so daß die Plättchen sehr wahrscheinlich einen normalen Zellbestandteil darstellen.

III. Die Stachelkugeln von *Opuntia monacantha* befinden sich auch immer im Zellsafte, wie wir dies auf Grund ihrer Verlagerung in der Zelle bei vertikaler Orientierung des Präparates, ihrer Vitalfärbung, der Vakuolenkontraktion u. s. w. beschließen konnten. Ob diese Körper vom spindelbildenden Virus abhängig sind, ist unbekannt geblieben.

IV. Die hexagonalen Eiweißkristalle von *Opuntia tomentosa* können im Cytoplasma, im Zellkern und im Zellsafte lokalisiert sein. Es scheint, daß diese Kristalle vom spindelbildenden Virus nicht bedingt sind.

Für besondere Hilfe während dieser Untersuchung möchte ich auch an dieser Stelle meinen Schülerinnen Fräulein Astrida Heisinger und Fräulein Mirjana Hrs den innigsten Dank aussprechen.

LITERATUR

- Amelunxen, F.*: Beobachtungen über die Entwicklung der Eiweißspindeln bei Cactaceen. *Protoplasma* **45**, 164 (1956 a).
- Amelunxen, F.*: Über die Strukturanalyse der Eiweißspindeln der Cactaceae. *Protoplasma* **45**, 228 (1956 b).
- Amelunxen, F.*: Die Virus-Eiweißspindeln der Kakteen. *Naturwiss.* **44**, 239 (1957).
- Amelunxen, F.*: Die Virus-Eiweißspindeln der Kakteen. Darstellung, elektronenmikroskopische und biochemische Analyse des Virus. *Protoplasma* **49**, 140 (1958).
- Backeberg, C.*: Die Cactaceae. Band I. Jena 1958.
- Bawden, F. C.*: Plant viruses and virus disease. Waltham, Mass. 1950.
- Blattny, C.*, und *V. Vukolov*: Mosaik bei *Epiphyllum truncatum*. *Gartenbauwissenschaft* **6**, 425 (1932).
- Goldin, M.*: Vključenija u Ivan-da-Mary (= Zelleinschlüsse in *Melampyrum*). *Dokl. AN SSSR* **99**, 855 (1954).
- Goldin, M.* i *V. L. Fedotina*: Elektronomikroskopičeskoe issledovanie tkanej balzamina na naličie virusopodobnih častic (= Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Gewebe von *Impatiens balsamina* auf die Anwesenheit der virusähnlichen Partikeln). *Dokl. AN SSSR* **108**, 953 (1956 a).
- Goldin, M.* i *V. L. Fedotina*: Rasprostranenie belkovih (virusnih) vključenii v raznyh vidov kaktusov (= Die Verbreitung der Eiweiß-(Virus-)Einschlußkörper in verschiedenen Kakteen). *Bjull. Gl. bot. sada* **26**, 80 (1956 b).
- Hayek, A.*: *Prodromus Florae peninsulae Balcanicae*. Band I. Dahlem bei Berlin 1927.
- Höfler, K.*: Plasmolyse mit Natriumkarbonat. *Protoplasma* **40**, 426 (1951).
- Kalmus, H.*, and *B. Kassanis*: The use of abrasives in the transmission of plant viruses. *Ann. Appl. Biol.* **32**, 230 (1945).
- Kenda, G.*, *I. Thaler* und *F. Weber*: Eiweißkristalle in den Zellkernen der Drüsenhaare von *Saintpaulia* *Österr. bot. Z.* **103**, 365 (1956).
- Miličić, D.*: Viruskörper und Zellteilungsanomalien in *Opuntia brasiliensis*. *Protoplasma* **43**, 228 (1954).
- Miličić, D.*: Eiweißkristalloide in *Opuntia inermis*. *Österr. bot. Z.* **103**, 365 (1956 a).
- Miličić, D.*: Rasprostranjenje kakteja s virusnim tijelima u primorskim krajevima Jugoslavije (= Die Verbreitung der Viruskörper-führenden Kakteen an der jugoslawischen Meeresküste). *Biol. glasnik* **9**, 21 (1956 b).
- Miličić, D.*: Virus-Zelleinschlüsse in *Alliaria officinalis*. *Protoplasma* **47**, 341 (1956 c).
- Miličić, D.*, *M. Panjan*, *D. Bilanović* und *B. Katić*: Viruskrankheit von *Alliaria officinalis*. *Acta Bot. Croatica* **17**, 159 (1938).
- Miličić, D.* und *B. Plavšić*: Eiweißkristalloide in Kakteen-Virussträgern. *Protoplasma* **46**, 547 (1956).
- Molisch, H.*: Über merkwürdig geformte Proteinkörper in den Zweigen von *Epiphyllum*. *Ber. dtsch. bot. Ges.* **3**, 195 (1885).
- Molisch, H.*: *Mikrochemie der Pflanze*. 2. Aufl. Jena 1913.
- Reiter, L.*: Eiweißwürfel in *Solanum demissum*. *Protoplasma* **45**, 633 (1956).
- Roland, G.*: L'histotropisme des virus. *Parasitica* **13**, 31 (1957).
- Rosenzopf, E.*: Sind Eiweißspindeln Virus-Einschlußkörper? *Phyton* **3**, 95 (1951).

- Schramm, G.: Aufbau und Vermehrung phytopathogener Viren. Nova Acta Leopoldina **19** (134), 29 (1957).
- Steere, R. L., and R. C. Williams: Identification of crystalline inclusion bodies extracted intact from plant cells infected with tobacco mosaic virus. Amer. Jour. Bot. **40**, 81 (1953).
- Suhov, K. S.: Virusy. Moskva 1956.
- Suhov, K. S. i G. S. Nikiforova: Virusopodobnye časticy v soku rastenij *Epiphyllum*, nesuščih v kletkah belkovye kristally (= Virusähnliche Partikeln im Saft der Eiweißspindeln-führenden *Epiphyllum*-Pflanzen). Dokl. AN SSSR **103**, 721 (1955).
- Thaler, I.: Eiweißspindeln von *Valerianella*. Österr. bot. Z. **101**, 566 (1954).
- Thaler, I.: Eiweißspindeln in der Epidermis von *Scutellaria*. Phyton **6**, 89 (1955/1956 a).
- Thaler, I.: Eiweißkristalle in der Epidermis von *Scindapsus aureus*. Phyton **6**, (1955/1956 b).
- Thaler, I.: Eiweißkristalloide von *Lilium tigrinum*. Protoplasma **45**, 486 (1956 a).
- Thaler, I.: Proteinspindeln und anomale Zellwandbildung in der Epidermis viruskranker *Impatiens Holstii*-Pflanzen. Protoplasma **46**, 755 (1956 b).
- Visiani, R.: Flora dalmatica. Lipsiae 1842.
- Weber, F.: Eiweißkristalle in *Lilium Henryi*. Phyton **5**, 277 (1953/1954 a).
- Weber, F.: Sind alle Pflanzen mit Cytoplasma-Eiweißspindeln Virusträger? Phyton **5**, 189 (1953/1954 b).
- Weber, F.: Virus-Kristalle in *Lilium*. Protoplasma **44**, 373 (1955 a).
- Weber, F.: Stomata-Zellen als Idioblasten. Österr. bot. Z. **102**, 436 (1955 b).
- Weber, F.: Eiweißspindeln und -kristalle in *Scutellaria*. Protoplasma **45**, 478 (1956).
- Weber, F., G. Kenda und I. Thaler: Viruskörper in Kakteen-Zellen. Protoplasma **41**, 277 (1952 a).
- Weber, F., G. Kenda und I. Thaler: »Stachelkugeln« in *Opuntia*. Phyton **4**, 98 (1952 b).

S A D R Ź A J

DA LI SU RAZLIČITI BJELANČEVINASTI KRISTALI KAKTEJA VIRUSNA TIJELA?

U posljednje su se vrijeme dosta često istraživali bjelančevinasti kristali raznih biljaka, a naročito mnogo kristali kakteja. Među posljednjima posebni su interes privukla parakristalinična proteinska vretena, koja su vrlo česta u epidermi raznih vrsta *Epiphyllum* i *Opuntia*.

Bjelančevinasta vretena kakteja otkrio je koncem prošlog stoljeća M o l i s c h i smatrao ih za rezervne tvari. Godine 1951. R o s e n z o p f o v a je preispitala karakter ovih tijela, pa je cijepljenjem i inokulacijom inficiranoga soka dokazala, da su tijela ovisna o virusnoj infekciji. Poslije toga u stanicama inficiranih kakteja W e b e r i suradnici otkrili su X-tijela, a drugi su autori pomoću elektronskog mikroskopa pronašli produžene i savitljive elementarne virusne čestice. U pogledu poznavanja značenja proteinskih vretena naročito su vrijedna istraživanja A m e l u n x e n a (1956 b i 1958), koji je ustanovio, da su proteinska vretena agregati

virusnih čestica i da virus sadrži pored bjelančevine još i ribonukleinsku kiselinu, t. j. da se po kemijskom sastavu ne razlikuje od drugih virusa viših biljaka.

Prilikom istraživanja proteinskih vretena otkriveni su kod raznih kakteja i drugi bjelančevinasti kristali. Većinu ovih kristala razni autori dovodili su u vezu s proteinskim vretenima i smatrali ih ovisnim o virusnoj infekciji. To su slijedeći kristali: rompske pločice kakteje *Opuntia inermis* DC., bodljikaste kugle vrste *Opuntia monacantha* Haw., proteinske druze kakteje *Epiphyllum* te heksagonski kristali vrste *Opuntia tomentosa* S. D. Budući da mišljenja o virusnoj prirodi ovih kristala nisu bila poduprta eksperimentalnim dokazima, započeli smo ovom radnjom istraživanja u tom smjeru.

Da bi se točnije upoznali ovi kristali, važno je bilo i znati, u kojem se dijelu stanice nalaze. Već je u jednom prijašnjem izvještaju bilo objavljeno, da se proteinske druze nalaze redovno u staničnom soku (M i l i č i ć i P l a v š i ć, 1956). U ovom izvještaju možemo tome dodati, da su i rompske pločice i bodljikaste kugle uvijek smještene u vakuolama. Osim toga smo ustanovili, da i heksagonski kristali imaju katkada intravakuolarnu lokalizaciju. Prema tome razni bjelančevinasti kristali kod kakteja često se nalaze u staničnom soku. Budući da prema dosadašnjim podacima iz literature nije bilo sa sigurnošću poznato, da proteinski kristali mogu postojati i u tekućim vakuolama, ima ovaj nalaz posebnu važnost.

Da su spomenuti kristali lokalizirani u staničnom soku, bilo je dokazano slijedećim pokusima i zapažanjima. Intravakuolarni kristali bojili su se vitalnim bojama neutralnim crvenilom i metilenskim modrilom; isti su kristali u horizontalnom mikroskopu prilikom vertikalne orijentacije preparata mijenjali svoj položaj u stanici, prilikom traumatske vakuolarne kontrakcije nalazili su se redovno u smanjenoj vakuoli, a pored toga su često pokazivali Brownovo gibanje. Naročito je slijedeće zapažanje bilo vrlo ubjedljivo: Bodljikaste kugle poslije vitalnog bojanja s neutralnim crvenilom intenzivno su upijale boju; pritom je dolazilo u vakuoli do rastavljanja staničnog soka u dvije tekuće faze, od kojih je jedna bila mnogo viskozija. Posljednja je faza imala oblik malenih kapljica, vrlo intenzivno crveno obojenih. Crveno obojene kapljice prislanjale su se postepeno na površinu bodljikaste kugle i uskoro je tako dobro prekrile, da se bodlje više nisu raspoznavale, pa je na taj način površina kugle postala glatka. Pojava, da su viskozne kapljice pokrile u debelom sloju površinu kugle, svjedoči, da se kugle nalaze u vakuoli, jer bi inače — kad bi kugle imale intraplazmatsku lokalizaciju — protoplazma priječila, da se kapljice prislone uz bodljikaste kugle.

Dok smo na osnovi navedenih zapažanja mogli ustanoviti, da je pretežni dio kristala smješten u vakuolama, detaljnija istraživanja na heksagonskim kristalima pokazala su, da se samo jedan njihov dio nalazi u vakuoli, a drugi dio u citoplazmi i vrlo rijetko u jezgri.

Od navedenih kristala do sada smo najbolje istražili rompske pločice iz vrste *Opuntia inermis*. Da bismo ustanovili, da li su ove pločice ovisne o virusu, koji obrazuje proteinska vretena, nastojali smo pribaviti što veći broj neinficiranih primjeraka ove vrste, t. j. primjerke bez proteinskih vretena. To smo postigli tako, da smo iz sjemenki uzgojili 40 mladih biljaka, od kojih ni jedna nije imala virusnih uklopina. Moramo napomenuti, da su mlade biljke potjecale od sjemenki sabranih sa primjeraka, koji su bili inficirani virusom proteinskih vretena. Budući da se virusi u velikoj većini ne prenose sjemenkama na potomstvo, dobiveni su i u ovom slučaju od inficiranih roditelja zdravi potomci, koji nisu sadržavali virusne uklopine. Time je ujedno bilo dokazano, da se ni virus proteinskih vretena ne prenosi sjemenkama na potomstvo.

Prema tome, ako se kakteje uzgajaju iz sjemena, dobiveno potomstvo bit će zdravo, t. j. neće imati proteinskih vretena. Nasuprot tome, ako se kakteje razmnažaju pomoću bolesnih sadnica, virus će preći na nove biljke.

Mlade biljke bile su detaljno mikroskopski istražene, pa su pritom gotovo kod svih primjeraka nađene rompske pločice. Na osnovi toga moglo se zaključiti, da pojavljivanje rompskih pločica nije ovisno o prisustvu proteinskih vretena. Prema tome vrlo je vjerojatno, da rompske pločice predstavljaju normalne i redovne sastavne dijelove stanica kod vrste *Opuntia inermis*.

Analogne pokuse s vrstama, koje sadrže bodljikaste kugle, proteinske druze i heksagonske kristale, nismo mogli izvršiti, jer nismo imali na raspolaganju klijave sjemenke dotičnih vrsta. Vrlo je vjerojatno, da bi se i kod tih vrsta iz sjemenki dobili zdravi egzemplari bez vretena. Ako bi mlade biljke bile bez vretena, a sadržavale navedene kristale, onda bi se moglo zaključiti, da kristali nisu ovisni o virusu iz proteinskih vretena.

Što se tiče bodljikastih kugli i proteinskih druzi, tim je kristalima također bio pripisan virusni karakter, ali to mišljenje nije se zasnivalo na eksperimentalnim dokazima. Okolnost, da se ta tijela nalaze redovno u vakuolama isto kao i rompske pločice, ukazuje na mogućnost, da ni ona ne predstavljaju virusne tvorevine.

Od tih se kristala već po samoj lokalizaciji u stanici razlikuju heksagonski kristali kakteje *Opuntia tomentosa*. Da bismo saznali, kako su rasprostranjeni heksagonski kristali kod te vrste, nabavili smo veći broj primjeraka ove biljke iz raznih botaničkih vrtova u Evropi. Primjerci su bili detaljno pregledani, jer smo očekivali, da bi nam raspodjela kristala u tim primjercima mogla dati neke indicije o prirodi kristala. Ako su kristali virusne prirode, onda se moglo očekivati, da će se naći samo u nekim, t. j. inficiranim primjercima, a da će u neinficiranim posvema izostati; nasuprot tome, ako su kristali normalne tvorevine, morali bi se nalaziti u svim primjercima bez razlike. Suglasno tome proteinska vretena, koja predstavljaju virusna tijela, nalazila su se samo u jednom dijelu dobivenih primjeraka, dok su drugi primjerci bili bez njih. Što se tiče heksagonskih kristala, nismo mogli dobiti jasnu sliku o njihovoj raspodjeli. Čini se, da ih imaju svi dobiveni primjerci. Neki su ih primjerci

sadržavali u vrlo malenom broju, pa je to otežalo ocjenjivanje. Svakako je posve sigurno, da ovi kristali ne predstavljaju neki posebni kristalni oblik virusa, koji producira proteinska vretena, jer produžene elementarne čestice toga virusa ne mogu obrazovati heksagonske kristalne onakvog tipa, kakav se nalazi u kakteji *Opuntia tomentosa*.

Polimorfizam proteinskih kristala kod kakteja nije prema tome uvijek ovisan samo o virusu proteinskih vretena, nego o tome, što se pored virusnih kristala (proteinskih vretena) pojavljuju — katkad u istoj stanici — još i kristali drugog karaktera, koji su vjerojatno redovni stanični dijelovi dotične vrste.

Prilikom ovih zapažanja uspjeti smo konstatirati, da se virus proteinskih vretena mnogo brže mehanički prenosi na zdrave biljke, i to već kroz 6 do 10 dana, ako se upotrebi kao pomoćno sredstvo karborundski prašak. Inače je kod prijašnjih načina prenošenja »inkubacija« trajala obično preko mjesec dana.