

VIRUSKÖRPER IN DEN ZELLEN VON  
MATTHIOLA INCANA R. BR.

Mit einer Textabbildung und zwei Tafeln

DAVOR MILIČIĆ

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Zagreb)

Einleitung

Unlängst wurden mehrere Arbeiten veröffentlicht, die sich mit den Virus-Zelleinschlüssen der Kruziferen befassen. In erster Linie sei hier eine Arbeit von Rubio (1956) erwähnt, in der Virusinklusionen beschrieben sind, die höchstwahrscheinlich unter dem Einfluß des Virus der Schwarzringfleckigkeit des Kohls (cabbage black ring spot, turnip virus 1) entstanden waren. Diese Inklusionen wurden von Rubio auch einer eingehenden elektronenmikroskopischen Analyse unterzogen. Unabhängig davon hat Miličić (1956) eine Publikation veröffentlicht, in der er die Morphologie der amorphen und kristallinen Einschlüsse aus *Alliaria*-Zellen dargestellt hat. Später wurde dasselbe Virus aus *Alliaria officinalis* von Miličić, Panjan, Bilanović und Katić (1958) auf einige Testpflanzen übertragen, deren Zelleinschlüsse dann eingehend erforscht wurden. Auf diese Weise ist die Formveränderlichkeit der Einschlüsse in mehreren Wirtspflanzen gut erkannt worden; das ist immer unbedingt notwendig zu erreichen, wenn man die Einschlußform als Charakteristik einer Viruskrankheit verwenden will. Fast gleichzeitig wurden von Reiter und Weber (1959) die Einschlußkörper untersucht, die unter dem Einfluß eines Virus in *Hesperis*-Pflanzen erscheinen. Die Ergebnisse der letzten Untersuchungen stimmten mit jenen von Miličić, Panjan, Bilanović und Katić (1958) so überein, daß es sehr wahrscheinlich ist, daß die Veränderungen vom ähnlichen oder sogar identischen Virus verursacht wurden.

In dieser Mitteilung haben wir die Absicht, unsere weiteren Untersuchungen über Kruziferen-Viruskörper darzustellen. Im vorigen Frühling hatten wir nämlich Gelegenheit Viruseinschlüsse in den Zellen von *Matthiola incana* (Levkoje) zu finden. Die kranken Exemplare dieser Pflanze stammten aus Dalmatien, so daß ihr Fundort von jenem der

viruskranken *Alliaria*-Pflanzen, die in der Umgebung von Zagreb gesammelt wurden, ziemlich entfernt war (vgl. Miličić, Panjan, Bilanović und Katić 1958). Deshalb meinten wir, daß es interessant wäre, das Virus aus *Matthiola* auf eine Reihe von Wirtspflanzen zu übertragen und ihre Zelleinschlüsse zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden wir hier vorführen.

Es sei hier erwähnt, daß vor längerer Zeit Gigante (1936) in Italien eine Mosaikkrankheit von *Matthiola incana* entdeckt hat, die bei ihm aber nicht genauer determiniert wurde. Bei dieser Gelegenheit fand auch er in den Blattparenchymzellen dieser Pflanze 4,5 bis 10,5  $\mu$  große X-Körper.

### Erste Beobachtungen

Im Anfang des Jahres 1960 wurden auf den Markt in Zagreb mehrere Exemplare von *Matthiola incana* gebracht, die sich mit bunten Blüten auszeichneten. Während die normalen Blüten dieser Pflanze gewöhnlich einfarbig sind, konnten wir bei den Exemplaren auf dem Markte an den dunkelvioletten Kronblättern hellviolette oder sogar weiße Flecke und Streifen beobachten (Taf. 1). Da die Buntstreifigkeit der Blüten eine sehr häufige Erscheinung bei viruskranken Pflanzen ist, haben wir vermutet, daß es sich um eine solche Erkrankung handelt. Deshalb wurden an *Matthiola* einige Beobachtungen und Versuche ausgeführt, um die Virusnatur der Erkrankung zu beweisen.

Die auf dem Markte beschafften buntstreifigen *Matthiola*-Pflanzen stammten aus dem Ort Podstrana bei Split. In der Umgebung von Split, wie auch in anderen Gebieten Dalmatiens, werden verschiedene frühblühende Blumensorten gezogen, die man im späten Winter und im frühen Frühling in kälteren nördlichen Gebieten Jugoslawiens gut verkaufen kann. So wurden auch die buntstreifigen *Matthiola*-Pflanzen auf den Markt in Zagreb gebracht. Sonst besitzen nach den Angaben aus der Literatur (Klinkowski 1958, Ushedraweit und Valentin 1957) die bunten *Matthiola*-Pflanzen kleineren Marktwert als die einfarbigen Exemplare.

Im Februar des nächsten Jahres 1961 haben wir jene Gebiete am Küstenlande besucht, wo die Blumenzucht entwickelt ist. Dabei haben wir beobachtet, daß die Kultur von *Matthiola incana* in Split, Dubrovnik und in Umgebung dieser Städte stark verbreitet ist. Besonders viele *Matthiola*-Pflanzen fanden wir in Kultur in Mlini bei Dubrovnik, von wo diese Pflanzen in andere Gebiete Jugoslawiens versandt werden. Da sich viele Levkojen während des Besuches im Blühen befanden, konnten wir konstatieren, daß 20 bis 40% von Exemplaren buntstreifige Blüten besitzen. Demnach muß eine sehr große Anzahl dieser Pflanzen viruskrank sein.

Da uns bekannt war, daß in den Zellen viruskranker Kruziferen sehr häufig X-Körper und kristalline Einschlüsse entstehen (Köhler und Klinkowski 1954, Smith 1958, Reiter und Weber 1959 u. a.), wurde die mikroskopische Untersuchung der kranken Pflanzen

durchgeführt. Zuerst wurden mikroskopisch die Kronblätter untersucht, die nach einer mit der Wasserstrahlpumpe gemachten Wasserinfiltration ziemlich durchsichtig werden, so daß sich dann ihre Epidermis ohne Bereitung der Flächenschnitte leicht beobachten läßt. In dieser Zellschicht konnten wir fast in jeder Zelle X-Körper finden, die ungefähr so groß wie die Zellkerne waren (Abb. 1). Die Form der X-Körper, die sich häufig im Kontakt mit den Zellkernen befanden, war ziemlich verschiedenartig, ihre Struktur fast immer feinkörnig. Neben den Körnern konnte man

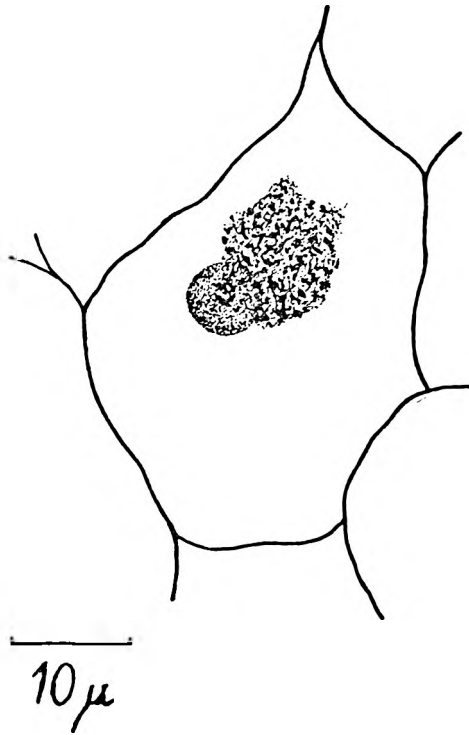


Abb. 1. *Matthiola incana*. Eine Epidermiszelle des Kronblattes. In der Zelle neben dem Zellkern befindet sich ein X-Körper.

manchmal in einigen X-Körpern auch nadelförmige Gebilde wahrnehmen, die wahrscheinlich einen kristallinen Bau besaßen. Die Entdeckung dieser Körper brachte uns ein starkes Argument für die Virusnatur der Buntstreifigkeit von *Matthiola*, weil die X-Körper nur in jenen kranken Pflanzen vorkommen, die an Virosen leiden.

In letzter Zeit wurde den X-Körpern und kristallinen Gebilden aus viruskranken Pflanzen mehr Aufmerksamkeit gewidmet, besonders als festgestellt wurde, daß viele Virus-Einschlußkörper Aggregate von Viruspartikeln sind. So ist aus den elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Brandes (1956) bekannt, daß die nach Infektion mit Tabak-

mosaikvirus (TMV) entstandenen X-Körper völlig mit unregelmäßig geordneten Viruspartikeln ausgefüllt sind. Außerdem wissen wir aus den Arbeiten an hexagonalen Prismen, die regelmäßig in mit TMV infizierten Pflanzen vorkommen, daß diese Kristalle kristallisiertes Tabakmosaik-Virus sind (vgl. Steere und Williams 1953, Goldin 1954, Wehrmeyer 1957). Unlängst sind auch die Forschungen von Amelunxen (1956, 1958) und Rubio (1956) veröffentlicht, aus denen uns wohlbekannt ist, daß auch kristalline fibrilläre Körper von viruskranken Kakteen und Kruziferen aus Viruspartikeln aufgebaut sind. Demnach scheint es, daß die Virus-Zelleinschlüsse wenigstens häufig aus Viruspartikeln bestehen. Einige Angaben aus der Literatur, wonach gewisse Virus-Zelleinschlüsse nicht aus Virusteilchen aufgebaut sind, müßten noch nachgeprüft werden (vgl. Richter und Klinkowski 1960).

### Einige Wirtspflanzen und ihre Viruskörper

Das Virus aus bunten Levkojen ließ sich mechanisch durch Abreibung der Blätter mit Karborundzusatz leicht auf geeignete gesunde Pflanzen übertragen. Da uns gesunde Levkojen nicht zur Verfügung standen, haben wir versucht, das Virus auf junge *Hesperis matronalis*-Pflanzen zu übertragen. Die Übertragung wurde so ausgeführt, daß mit dem aus bunten Levkojen-Blüten ausgepreßten Gewebesafte die Blätter von *Hesperis* abgerieben wurden. Nach einigen Tagen erschienen auf den neuen jungen Blättern der inokulierten Exemplare grüngelbe Flecke, die sehr viel an eine Virusfleckigkeit erinnerten.

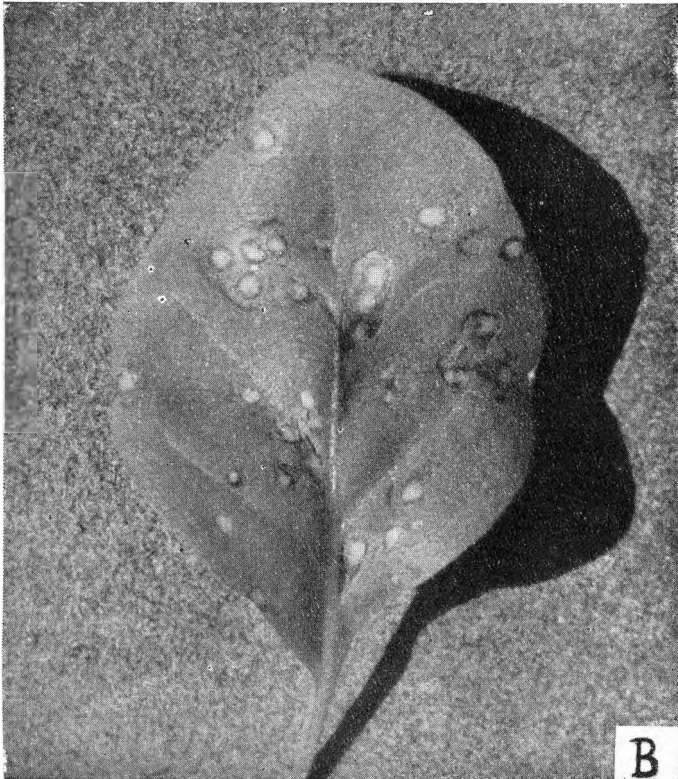
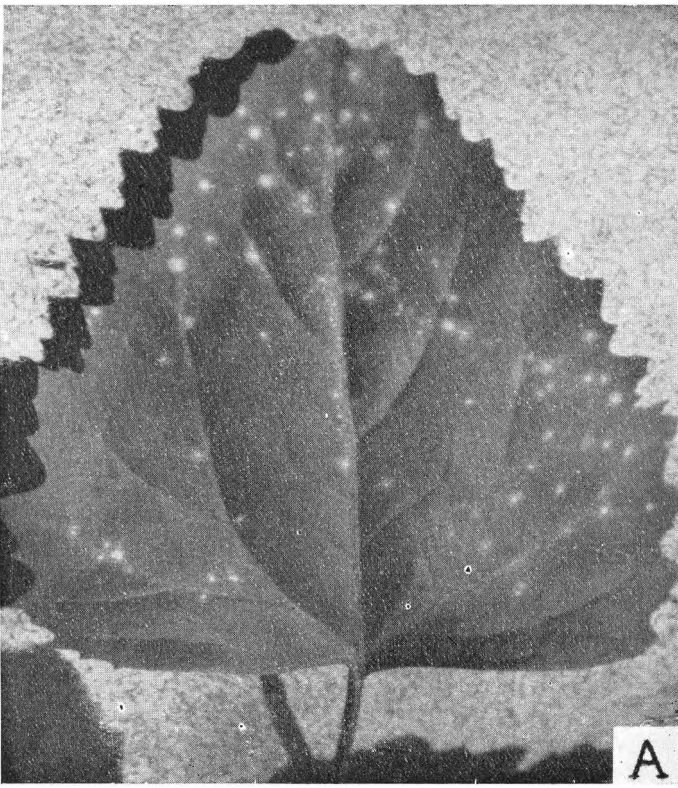
Daß diese Flecke vom Virus verursacht wurden, konnten wir durch mikroskopische Untersuchung der *Hesperis*-Blätter bestätigen. Dabei wurden besonders die chlorotischen Blatteile geprüft, und zwar in erster Linie die oberen Epidermiszellen, wo viele X-Körper gefunden wurden. Auch in diesen kranken Blättern befand sich in jeder Zelle gewöhnlich je ein X-Körper, der eine rundliche Form und eine feine körnige Struktur enthielt. In lebenden Zellen waren diese Körper ziemlich schlecht sichtbar, aber nach Behandlung mit Jodjodkali traten sie scharf hervor. Unter dem Einfluß dieses Reagens färbten sich nämlich die X-Körper stark braun, so daß man sie dann von den gelbbraun gefärbten Zellkernen leicht unterscheiden konnte.

Die infizierte *Hesperis matronalis*-Pflanze, bei der die Krankheit einen systemischen Charakter besaß, diente uns als Ausgangsmaterial für die Virusübertragung auf andere Testpflanzen. Zuerst wurde das Virus mit Erfolg auf *Chenopodium amaranticolor* übertragen, wo es eine lokale Infektion verursachte (vgl. Hollings 1956, 1957). Auf den verimpften Blättern dieser Pflanze entstanden bald viele Lokalläsionen (Tafel IIA), die eine charakteristische Form enthielten. Jede einzelne Läsion besaß 14 Tage nach der Inokulation folgende Teile: In der Mitte befand sich ein rundlicher und weißer Fleck, der einen Durchmesser von 0,5 bis 1 mm hatte. Dieser zentrale Fleck war vollständig von einem roten Ring umgeben, der ungefähr 0,5 mm dick war. Zuletzt konnte vielmals



Tafel I. *Matthiola incana* mit buntstreifigen Blüten.

Tafel II. Lokalläsionen an den Blättern von *Chenopodium amaranticolor* (A) und *Nicotiana tabacum* Sorte Samsun (B), die unter dem Einfluß des aus *Matthiola incana* isolierten Virus entstanden sind. Die Läsionen in A befinden sich noch in einem frühen Entwicklungsstadium.



um den roten Ring noch ein chlorotischer Hof wahrgenommen werden, der sich infolge seiner gelbgrünen Farbe von den normalgrünen Blattspreiteilen leicht unterscheiden ließ. Auch dieser chlorotische Hof hatte gewöhnlich eine Dicke von 0,5 mm. In anderen Fällen war dieser letzte Läsionsteil schwächer entwickelt oder konnte gar nicht beobachtet werden.

Durch eine mikroskopische Untersuchung der Lokalläsionen von *Chenopodium amaranticolor* konnten wir feststellen, daß der zentrale weiße Fleck aus abgestorbenen Zellen aufgebaut ist. Zwischen diesen Zellen befanden sich große mit Luft gefüllte Räume. An der Grenze zwischen den Zellen und den Räumen kommt es zu einer Totalreflexion des Lichtes, wodurch die weiße Anfärbung des zentralen Fleckes teilweise verursacht worden ist.

Zum Unterschied vom weißen Fleck sind in allen anderen Läsionsteilen hauptsächlich lebende Zellen vorhanden. Die rote Anfärbung des ersten Ringes stammt von der Anwesenheit des Anthozyans; die gelbgrüne Anfärbung des chlorotischen Hofes aber ist höchstwahrscheinlich durch Veränderungen in den Chloroplasten hervorgerufen.

Was die Entwicklung der Lokalläsionen anbelangt, können wir sagen, daß die ersten Veränderungen an den inokulierten Blättern 4 bis 6 Tage nach der Verimpfung wahrgenommen werden konnten. Dann ist der rote Ring noch nicht vorhanden, so daß die Läsionen in diesem Stadium das Aussehen eines kleinen gelbgrünen Fleckes besitzen (Tafel II A). Ungefähr zehn Tage nach der Verimpfung beginnt sich in den Lokalläsionen das Anthozyan zu bilden. Der Farbstoff entsteht zuerst in den Zellen, die sich unmittelbar neben dem nekrotischen Zentrum befinden. Während der folgenden Tage erscheint das Anthozyan auch in den Zellen, die vom Mittelpunkt der Lokalläsion weiter entfernt sind, so daß der rote Ring allmählich deutlicher sichtbar wird.

In der Zeit, in welcher sich das Anthozyan erst zu bilden beginnt, besitzt die Läsion größtenteils einen chlorotischen Charakter, d. h. sie ist hauptsächlich aus lebenden Geweben aufgebaut und gelbgrün gefärbt. Wenn wir solche Lokalläsionen im durchfallenden Lichte beobachten, zeichnen sie sich durch starke Durchsichtigkeit aus. Wenn sich später in lebenden Bereichen der Läsion das Anthozyan ansammelt, verlieren sie dann diese Eigenschaft. Auf diese Weise bildet sich allmählich die schon beschriebene definitive Form der Lokalläsionen, die erst 14 Tage nach der Verimpfung in Erscheinung tritt.

Die schon formierten Lokalläsionen besitzen einen Durchmesser von 2 bis 3 mm, der jedoch nicht dauernd gleich groß bleibt, sondern mit der Zeit größer wird. Insofern sich die Läsionen im Bereiche der Blattnerve befinden, verlieren sie häufig ihre rundliche Form, weil sie sich dann besonders stark in der Richtung des Nervenverlaufes verlängern. Die Länge solcher Läsionen betrug oft über 5 mm.

Demgegenüber waren die Läsionen an den Blättern von *Chenopodium album* viel einfacher und besaßen fast ausschließlich einen chlorotischen Charakter. Sie hatten das Aussehen unregelmäßiger gelber

Flecke, die von gesundem Gewebe nicht scharf begrenzt waren. Sehr häufig flossen mehrere Läsionen miteinander zusammen, wodurch die Zählung dieser Gebilde schwieriger wurde.

Da die Kruziferenviren auch bei *Nicotiana tabacum* charakteristische Symptome verursachen (vgl. Klinkowski 1958), wurde der Tabak (Sorte »Samsun«) als weitere Testpflanze verwendet. Das Virus wurde auf sehr junge Exemplare übertragen. Drei bis vier Tage nach der Inokulation entstand auf den Tabakblättern eine ziemlich große Anzahl von Lokalläsionen. Sie besaßen stark ausgeprägten nekrotischen Charakter, so daß die aus lebendem Gewebe aufgebauten chlorotischen Ringe, die bei Läsionen von *Chenopodium* vorhanden waren, hier nicht wahrgenommen werden konnten. Die nekrotischen Läsionen vergrößerten sich allmählich in den folgenden Tagen. Dabei wurde ein schwarzbrauner Ring besser sichtbar, der das hellere Zentrum der Läsion umgab (Tafel II B). Dieser Ring war, wie die mikroskopische Untersuchung der Läsion gezeigt hat, auch aus nekrotischem Gewebe aufgebaut. Demnach bestanden diese Läsionen 6 bis 7 Tage nach der Verimpfung aus einem helleren Zentrum und einem dunkleren Ring um das Zentrum; diese beiden Teile hatten einen nekrotischen Charakter. Sehr ähnliche Läsionen entwickelten sich auch an den Blättern von einigen *Nicotiana tabacum*-Pflanzen, die der Sorte »White Burley« angehörten.

Auf eine besondere Weise verhielt sich gegen dieses Virus *Nicotiana rustica*. Einige Tage nach der Inokulation erschienen auf den verimpften Blättern gelbgrüne Lokalläsionen. Diese waren unregelmäßig rundlich und hatten einen chlorotischen Charakter. Mit Hilfe des Mikroskopes konnten wir feststellen, daß sie aus lebenden Geweben aufgebaut sind. Im Laufe dieser Untersuchungen konnten wir in den lebenden, im Bereiche der Läsionen befindlichen Zellen, X-Körper wahrnehmen. Daß X-Körper und sogar kristalline Viruseinschlüsse in Lokalläsionen vorkommen können, haben unlängst Miličić und Udbinac (1960) an *Chenopodium*, die mit TMV bzw. mit Kakteenvirus infiziert waren, wahrgenommen. Wie in anderen ähnlichen Fällen, so auch bei *Nicotiana rustica* konnten die X-Körper in Blattzellen außerhalb der Lokalläsionen nicht beobachtet werden. Diese Beobachtung weist deutlich darauf hin, daß die Läsionen im Zusammenhang mit einer Virusinfektion entstanden sind.

Die Infektion bei *Nicotiana rustica* blieb nicht auf die inokulierten Blätter beschränkt, sondern verbreitete sich später auch auf andere Blätter. Wir konnten nämlich einige Tage nach dem Erscheinen der Lokalläsionen auch auf den nicht verimpften Blättern Anzeichen der Infektion beobachten. Diese sekundären Symptome äußerten sich in Form von rundlichen gelbgrünen Flecken, die manchmal mit einem engen nekrotischen Ring umgeben waren. Daß diese ziemlich seltenen Flecke eine Folge der Infektion waren, konnten wir auf Grund der Entdeckung der X-Körper in ihren Zellen beweisen. Die X-Körper befanden sich am häufigsten in den Epidermiszellen. Später aber, als sich auch die oberen Blätter von *Nicotiana rustica* entwickelt hatten, konnten wir in diesen



die Flecke nicht mehr wahrnehmen. Da wir auf Grund dieser Symptome nicht wußten, ob die genannte *Nicotiana*-Pflanze lokal oder systemisch infiziert ist, haben wir mit dem aus ihren oberen Blättern ausgepreßten Gewebesafte einige Testpflanzen zu infizieren versucht. Diese Pflanzen sind auch nach längerer Zeit gesund geblieben, so daß wir schließen konnten, daß der Saft keine Infektionsfähigkeit besaß und daß *Nicotiana rustica* nur lokal infiziert war.

Auf sehr ähnliche Weise wie *Nicotiana rustica* reagierten nach der Infektion auch *Nicotiana longiflora* und *N. sanderae*. Auch in Lokalläsionen der letzten zwei Arten haben wir X-Körper gefunden.

Wie aus obiger Darstellung hervorgeht, verursacht unser aus *Matthiola* isoliertes Virus bei einer Reihe von Testpflanzen verschiedene Krankheitssymptome. Dabei war sehr auffallend, daß diese Symptome mit jenen Veränderungen gänzlich übereinstimmten, die auf denselben Testpflanzen durch das von Miličić (1956) und Miličić, Panjan, Bilanović und Katić (1958) aus *Alliaria* isolierte Virus auftraten. So z. B. rufen diese beiden Viren bei *Hesperis matronalis*, bei *Nicotiana*- und *Chenopodium*-Arten dieselben Veränderungen hervor. Auch die bei *Chenopodium*- und *Nicotiana*-Arten auftretenden Lokalläsionen besitzen die gleiche morphologische Charakteristik. Aber nicht nur die äußeren Symptome, sondern auch die intrazellularen Einschlüsse stimmen sehr gut überein. So z. B. rufen *Matthiola*- und *Alliaria*-Virus bei *Nicotiana*-Arten dieselben intrazellularen Einschlüsse, und zwar ausschließlich amorphe X-Körper hervor.

Da uns aus früheren Untersuchungen des *Alliaria*-Virus bekannt war (Miličić 1956; Miličić, Panjan, Bilanović und Katić 1958), daß dieses Virus bei *Sinapis alba* neben amorphen X-Körpern noch auch sehr charakteristische Ansammlungen von Eiweißnadeln bildet, haben wir versucht, auch das aus *Matthiola* isolierte Virus auf diese Testpflanze zu übertragen. Die Übertragung gelang uns, so daß ungefähr 20 Tage nach Inokulation die erkrankten Exemplare von *Sinapis alba* mikroskopisch untersucht werden konnten; dabei wurden in ihnen neben den X-Körpern auch charakteristische Ansammlungen von Kristallnadeln gefunden, die sehr gut mit jenen übereinstimmten, die das Virus aus *Alliaria* in derselben Pflanze verursacht (vgl. Miličić, Panjan, Bilanović und Katić (1958)). Das ist ebenfalls ein starkes Argument dafür, daß die Viren aus *Alliaria* und *Matthiola* sehr verwandt sind.

## Besprechung

Unsere bisherigen Beobachtungen über die Krankheit von *Matthiola* zeigen, daß es sich ohne Zweifel um eine Kreuziferen-Virose handelt. Nach den Angaben von K l i n k o w s k i (1958) ist es bekannt, daß *Matthiola* an folgenden Virosen leiden kann: der Buntstreifigkeit der Levkoje, der Schwarzringfleckigkeit des Kohls, dem Gurkenmosaik, dem Kräuselmosaik des Rapses, dem Blumenkohlmosaik, dem Anemonenmosaik und der Bronzefleckenkrankheit der Tomate. Da wir bisher das Virus aus

*Matthiola* nicht auf eine genügend große Anzahl von Testpflanzen übertragen haben, können wir hier nur Vermutungen über seine Identität äußern.

Auffallend ist die Ähnlichkeit der beschriebenen Veränderungen mit Symptomen, die auf denselben Pflanzen das Virus aus *Alliaria* hervorruft. So z. B. verursachen beide Viren gleiche Krankheitssymptome auf *Nicotiana tabacum* (»Samsun« und »White Burley«), *N. rustica*, *N. sanderae*, *N. longiflora*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium album* und *Hesperis matronalis*. Da das Virus aus *Alliaria* schon zweimal Gegenstand unserer Untersuchungen war (Miličić 1956; Miličić, Panjan, Bilanović und Katić 1958), ist sein Verhalten nicht nur gegenüber den angeführten, sondern auch gegenüber einigen anderen Pflanzenarten ziemlich gut bekannt. Mit Rücksicht auf sein Verhalten gegenüber einigen *Hesperis*-Arten stimmt das Virus aus *Alliaria* sehr gut auch mit einem Virus überein, das krankhafte Veränderungen an *Hesperis*-Pflanzen, welche unlängst von Reiter und Weber (1959) in Österreich untersucht wurden, hervorruft.

Als wir zum ersten Mal das Virus von *Alliaria officinalis* auf einige Testpflanzen übertrugen (Miličić, Panjan, Bilanović und Katić 1958), haben wir es vorläufig als *Alliaria*-Virus bezeichnet. In der Zwischenzeit haben aber auch viele andere Autoren die Pflanze *Alliaria officinalis* als Virusträger erkannt. So haben unlängst U sch d r a w e i t und V a l e n t i n (1957) in Deutschland eine Viruskrankheit auf *Alliaria officinalis* beobachtet (vgl. auch S c h w a r z 1959). Eine eingehende Analyse dieser Virose hat gezeigt, daß ihr Erreger eine Variante des turnip virus 1 ist. Unser Virus unterscheidet sich in einigen Eigenschaften von diesem Virus. Doch ist nicht ausgeschlossen, daß auch unser Virus derselben Gruppe von turnip virus 1 angehören könnte. S m i t h (1957) hat hervorgehoben, daß auf turnip virus 1 und Tabakmosaikvirus (TMV) die Testpflanzen *Nicotiana tabacum* und *N. glutinosa* in entgegengesetzter Weise reagieren. Wie bekannt, ruft das TMV auf Tabak eine systemische und auf *N. glutinosa* eine lokale Infektion hervor; demgegenüber verursacht das turnip virus 1 auf der ersten Pflanze eine lokale und auf der zweiten eine systemische Infektion. Unser Virus verhält sich gegenüber diesen zwei Wirtspflanzen wie turnip virus 1. Doch ist es uns noch nicht bekannt, ob unser Virus auf *Brassica oleracea*, die eine wichtige Wirtspflanze von turnip virus 1 ist, übertragbar wäre. Die Übertragbarkeit dieses Virus auf *Brassica* wird in unseren folgenden Untersuchungen geprüft werden. Wenn dabei konstatiert wird, daß unser Virus den Kohl nicht anfallen kann, dann könnte sich um *Matthiola* virus 1 handeln. Für das letzte Virus ist — wie es scheint — charakteristisch, daß es nicht imstande ist, *Brassica oleracea* zu infizieren.

Neben U sch d r a w e i t und V a l e n t i n (1957) hat vor kurzem auch W e i l (1957) ein Virus aus *Alliaria officinalis* isoliert. Der Autor hat dieses Virus als Stamm von *Matthiola* virus 1 bezeichnet. Außerdem haben unlängst B o d e und B r a n d e s (1958) elektronenmikroskopisch die Partikeln eines Stammes von turnip virus 1 geprüft, der auch aus

*Alliaria officinalis* stammte. Aus diesen Angaben kann man schließen, daß *Alliaria* ein häufiger Virusträger ist.

Wie aus obiger Darstellung hervorgeht, waren die aus *Alliaria* isolierten Viren als Stämme von turnip virus 1 und *Matthiola* virus 1 identifiziert. Diese Viren verursachen auf einigen gebräuchlichsten Testpflanzen ähnliche Symptome wie unsere Viren aus *Matthiola* und *Alliaria*. Zu Vergleichszwecken bringen wir hier folgende Tabelle.

Tab. 1. Testpflanzen-Reaktion einiger Kreuziferen-Viren

Wirtspflanze	Virus aus <i>Matthiola</i>	Virus aus <i>Alliaria</i>	Turnip virus 1	Variante des turnip virus 1	<i>Matthiola</i> virus 1
<i>Hesperis matronalis</i>	Systemische Infektion	Systemische Infektion	Systemische Infektion	Systemische Infektion	Systemische Infektion
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Lokale Infektion	Lokale Infektion	Lokale Infektion	?	?
<i>Chenopodium album</i>	Lokale Infektion	Lokale Infektion	+	Lokale Infektion	Systemische Inf.
<i>Nicotiana tabacum</i>	Lokale Infektion	Lokale Infektion	Lokale Infektion	Lokale Infektion	Lokale Infektion
<i>Nicotiana rustica</i>	Lokale Infektion	Lokale Infektion	?	Lokale Infektion	Keine Infektion
<i>Nicotiana glutinosa</i>	?	Systemische Inf.	Systemische Inf.	Keine Infektion	Lokale Infektion
<i>Sinapis alba</i>	Systemische Infektion	Systemische Infektion	Systemische Infektion	Systemische Infektion	?

? = unbekannt; + = infiziert.

Da gelegentlich dieser Untersuchung die intrazellulären Einschlüsse besonders intensiv studiert wurden, werden wir unsere Ergebnisse auf diesem Gebiete kurz besprechen. Während der Untersuchung der Krankheit, an der *Alliaria* litt, wurden von Miličić (1956) und Miličić, Panjan, Bilanović und Katić (1958) neben amorphen auch kristalline Einschlüsse gefunden, die häufig aus einer größeren Anzahl untereinander parallel angeordneter Nadeln bzw. Fibrillen aufgebaut waren. Außerdem haben wir während dieser Arbeit beobachtet, daß in den Kronblättern von *Matthiola* innerhalb der X-Körper manchmal nadelförmige Gebilde auftreten, die wahrscheinlich auch kristallinen

Charakter besitzen. Im Zusammenhang damit sei noch erwähnt, daß Rubio (1956) in den Pflanzen, die an der Schwarzringfleckigkeit des Kohls litten, fibrillenförmige Körper beobachtet und eingehend untersucht hat.

Auf Grund elektronenmikroskopischer Beobachtungen hat Rubio festgestellt, daß diese Fibrillen aus zahlreichen langen und fadenförmigen Viruspartikeln aufgebaut sind, die sich longitudinal und lateral aneinander angeordnet haben. In dieser Hinsicht stimmen Rubios Fibrillen völlig mit den Virusfibrillen überein, deren Struktur bei Kakteen Amelunxen (1956, 1958) studiert hat. Dieser letztere Autor hat nämlich nachgewiesen, daß die Fibrillen auch bei Kakteen Aggregate von verlängerten Viruspartikeln darstellen. Da diese Fibrillen auch optisch anisotrop sind, meint Amelunxen (1958), daß sie eine parakristalline Struktur besitzen.

Im Zusammenhang damit sei hier auch Suhovs (1956) Meinung über die Ursache des Ausbleibens echter Viruskristalle bei erkrankten Kakteen erwähnt (über das Kakteenvirus vgl. Weber, Kenda und Thaler 1952; Amelunxen 1958; Miličić und Udbinac 1960). Dieser Autor ist der Ansicht, daß die Kakteenviruspartikeln infolge ihrer gekrümmten Form echte Viruskristalle zu bilden nicht imstande sind, so daß sie nur parakristalline Eiweißspindeln formieren können. In dieser Hinsicht verhält sich also das Kakteenvirus anders als das TMV, das in Wirtspflanzenzellen nicht nur Parakristalle, sondern auch echte Kristalle (hexagonale Prismen) bilden kann (vgl. Kassanis und Sheffield 1941). Diese Fähigkeit, echte polyedrische Körper aufzubauen, muß das TMV seinen geraden Partikeln verdanken, weil sie sich wegen ihrer regelmäßigen Form gut anordnen können.

Auf jeden Fall zeigen die bisherigen Untersuchungen über Kruziferen-Zelleinschlüsse, daß für eine genaue Bestimmung der Kruziferen-Virosen eine bessere Kenntnis ihrer Einschlüsse sehr nützlich wäre.

### Zusammenfassung

Zu Beginn des Jahres 1960 wurden auf den Markt in Zagreb mehrere Exemplare von *Matthiola incana* gebracht, die sich durch Buntstreifigkeit der Blüten auszeichneten. Die bunten Pflanzen stammten aus den Gärten des Dorfes Podstrana bei Split. Unsere Vermutung, daß es sich um eine Viruskrankheit handelt, wurde durch die Entdeckung von X-Körpern in den Kronblattzellen bestätigt. In den X-Körpern wurden neben vielen Körnchen manchmal auch Nadelkristalle wahrgenommen. Dieses in *Matthiola* gefundene Virus wurde später mechanisch auf *Hesperis matronalis*, *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium album*, *Nicotiana tabacum* (Sorten »Samsun« und »White Burley«), *Nicotiana rustica*, *Nicotiana sanderae* und *Nicotiana longiflora* übertragen. Auch in den Blattepidermiszellen der Wirtspflanzen *Hesperis matronalis*, *Nicotiana rustica*, *N. sanderae* und *N. longiflora* wurden X-Körper beobachtet, die jenen aus

den *Matthiola*-Kronblättern sehr ähnlich waren. Außerdem wurden in den Epidermiszellen der Blätter von *Sinapis alba* gut ausgebildete Ansammlungen von Eiweißnadeln wahrgenommen.

Es wird vermutet, daß dieses aus *Matthiola incana* isolierte Virus der Gruppe turnip virus 1 oder *Matthiola* virus 1 angehört.

## L I T E R A T U R

- Amelunxen, F.*, 1956: Über die Strukturanalyse der Eiweißspindeln der *Cactaceae*. *Protoplasma* 45, 228—240.
- Amelunxen, F.*, 1958: Die Virus-Eiweißspindeln der Kakteen. Darstellung, elektronenmikroskopische und biochemische Analyse des Virus. *Protoplasma* 49, 140—178.
- Bode, O.*, und *J. Brandes*, 1958: Elektronenmikroskopische Untersuchung des Kohlrübenmosaik-Virus (turnip mosaic virus). *Phytopath. Z.* 34, 103—106.
- Brandes, J.*, 1956: Über das Aussehen und die Verteilung des Tabakmosaikvirus im Blattgewebe. *Phytopath. Z.* 26, 93—106.
- Gigante, R.*, 1936: Il mosaico della violaciocca. *Boll. Staz. Pat. veg. Roma, N. S.*, 16, 166—174.
- Goldin, M. I.*, 1954: Virusnye vključenija v rastitelnoj kletke. Moskva.
- Hollings, M.*, 1956: *Chenopodium amaranticolor* as a test plant for plant viruses. *Plant Pathology* 5, 57—60.
- Hollings, M.*, 1957: Reaction of some additional plant viruses on *Chenopodium amaranticolor*. *Plant Pathology* 6, 133—135.
- Kassanis, B.*, and *F. M. L. Sheffield*, 1941: Variations in the cytoplasmic inclusions induced by three strains of tobacco mosaic virus. *Ann. Appl. Biol.* 28, 360—367.
- Klinkowski, M.*, 1958: Pflanzliche Virologie, Bd I-II. Berlin.
- Köhler, E.*, und *M. Klinkowski*, 1954: Viruskrankheiten. In *Sorauers Handb. d. Pflanzenkrankheiten*. Berlin und Hamburg.
- Milčić, D.*, 1956: Virus-Zelleinschlüsse in *Alliaria officinalis*. *Protoplasma* 47, 341—346.
- Milčić, D.*, *M. Panjan, D. Bilanović* und *B. Katić*, 1958: Viruskrankheit von *Alliaria officinalis*. *Acta Bot. Croatica* 17, 159—176.
- Milčić, D.*, und *Z. Udbinac*, 1961: Virus-Eiweißspindeln der Kakteen in Lokal-läsionen von *Chenopodium*. *Protoplasma* 53, 584—596.
- Reiter, L.*, und *F. Weber*, 1960: Einschlußkörper in viruskranken *Hesperis*-Zellen. *Protoplasma* 51, 632—638.
- Richter, J.*, und *M. Klinkowski*, 1960: Das Tabakmosaikvirus (TMV) — Modellobjekt der pflanzlichen Virusforschung. *Zbl. Bakter., Abt. II*, 113, 700—765.
- Rubio, M.*, 1956: Origin and composition of cell inclusions associated with certain tobacco and crucifer viruses. *Phytopathology* 46, 553—556.
- Schwarz, R.*, 1959: Epidemiologische Untersuchungen über einige Viren der Unkraut- und Ruderalflora Berlins. *Phytopath. Z.* 35, 238—270.
- Smith, K. M.*, 1957: A textbook of plant virus diseases. London.
- Smith, K. M.*, 1958: Virus inclusions in plant cells. *Protoplasmatologia* Bd IV, 4a. Wien.
- Steere, R. L.*, and *R. C. Williams*, 1953: Identification of crystalline inclusion bodies extracted intact from plant cells infected with tobacco mosaic virus. *Amer. J. Bot.* 40, 81—84.
- Suhov, K. S.*, 1956: *Virusy*. Moskva.

- Tompkins, C. M.*, 1939: Two mosaic diseases of annual stock. *Jour. Agr. Res.* 58, 63—77.
- Ušchraveit, H. A., und H. Valentin*, 1957: Untersuchungen über ein Kreuziferen-Virus. *Phytopath. Z.* 31, 139—148.
- Weber, F., G. Kenda und I. Thaler*, 1952: Viruskörper in Kakteen-Zellen. *Protoplasma* 41, 277—286.
- Wehrmeyer, W.*, 1959: Entwicklungsgeschichte, Morphologie und Struktur von Tabakmosaikvirus-Einschlußkörpern unter besonderer Berücksichtigung der fibrillären Formen. *Protoplasma* 51, 165.
- Weil, B.*, 1957: Thermale Inaktivierung von zwei Pflanzenviren. Ein Beitrag zur Wärmetherapie pflanzlicher Viruskrankheiten. *Phytopath. Z.* 31, 45—78.

## S A D R Ź A J

### VIRUSNA TIJELA U STANICAMA KRSTASIĆE *MATTHIOLA INCANA* R. BR.

*Davor Miličić*

Početak 1960. godine doneseno je na trg u Zagrebu više primjeraka ljubičine (*Matthiola incana*), koji su se isticali šarenilom cvjetova. Na njihovim tamnoljubičastim laticama nalazile su se svijetloljubičaste ili čak bijele pjege i pruge, pa su se po tome oštro razlikovali od normalnih primjeraka ove vrste, koji imaju obično jednobojne cvjetove. Prema pouzdanim informacijama koje smo dobili na trgu, šarene biljke potjecale su iz Podstrane kod Splita. Budući da je šarenilo cvjetova dosta česta posljedica virusne infekcije, izvršen je niz zapažanja i pokusa da bi se ustanovila virusna priroda ove pojave.

Pomoću mikroskopske pretrage pronađena su u epidermi latica X-tijela, koja se inače pojavljuju dosta često u stanicama virusno bolesnih biljaka i predstavljaju dosta pouzdanu indiciju da je biljka inficirana nekim virusom. X-tijela često su se nalazila u kontaktu s jezgrom i bila su pretežno isto tako velika kao i jezgre. Struktura tih tijela bila je većinom fino zrnasta, ali su se pored zrnaca u pojedinim X-tijelima mogle zapaziti igličaste tvorevine, koje vjerojatno imaju kristaliničnu građu. Budući da su dosadašnja detaljna istraživanja jednog niza virusnih intracelularnih uklopina kod drugih biljaka pokazala da su uklopine agregati virusnih čestica, vrlo je vjerojatno da su X-tijela i igličaste tvorevine kod ljubičine također nakupine virusa.

Da bismo ustanovili da li šarenilo cvjetova ljubičine ima infektivni karakter, pokušali smo na mehanički način prenijeti oboljenje na vrstu *Hesperis matronalis*. Inokulacija je izvršena tako, da su sokom, koji je istisnut iz cvjetova šarenih ljubičina, nakon dodatka karborunda protrljani listovi mladih primjeraka vrste *Hesperis matronalis*. Lagani mozaik koji se nekoliko dana poslije inokulacije pojavio na mladim listovima ove biljke bio je dokaz da je prijenos virusa uspio. Budući da su se mehanički način prenošenja, pa mjesto pojavljivanja i oblik prvih simptoma po svom toku i osobinama potpuno podudarali s odgovarajućim procesima i promjenama kod poznatih virusno bolesnih biljaka, bio je to dalji dokaz za virusnu prirodu šarenila cvjetova ljubičine.

Poslije toga pokušalo se taj virus prenijeti na nekoliko drugih test-biljaka, da bi ga se što tačnije upoznalo. Pri tom je virus na mehanički način bio uspješno prenesen na vrste *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium album*, *Nicotiana tabacum* (sorte Samsun i White Burley), *Nicotiana rustica*, *Nicotiana sanderae* i *Nicotiana longiflora*. Kod svih tih biljaka — za razliku od prije navedenih domadara — prouzrokovao je virus na inokuliranim listovima lokalne lezije. One su bile naročito karakteristične kod vrste *Chenopodium amaranticolor*. Sastojale su se od nekrotičnog središta, koje je bilo bijele boje, zatim od crvenog prstena oko bijelog središta i najzad od još jednog žutozelenog prstena, koji je okruživao crveni prsten. Dok se svijetla centralna pjega sastojala od uginulih stanica, ostali dijelovi lezije bili su izgrađeni od živoga tkiva. Na inokuliranim listovima nalazio se velik broj lezija, koje su prosječno imale promjer od 2 do 3 mm.

Nasuprot tome lezije vrste *Chenopodium album* i pripadnika roda *Nicotiana* bile su jednostavnije. Tako su se npr. lokalne lezije na listovima vrste *Ch. album* sastojale od nepravilnih žutih do žutozelenih pjega, koje nisu bile oštro odijeljene od zdravoga tkiva. Vrlo često se više lezija, koje su inače imale gotovo isključivo klorotični karakter, međusobno stapalo, pa je zbog toga brojenje lezija bilo otežano. Kod vrste *Nicotiana tabacum* (sorta Samsun) pojavljivale su se lokalne lezije već 3 do 4 dana poslije inokulacije i imale su posve nekrotičan karakter. Sastojale su se od svjetlijeg centralnog dijela i jednog tamnijeg prstena, koji je okruživao središte. Slične lezije razvijale su se i na listovima duhana, koji je pripadao sorti White Burley. Kod ostalih spomenutih vrsta roda *Nicotiana* nastajale su na listovima lezije klorotičnog karaktera, koje su bile posve izgrađene od živoga tkiva. Naknadno su se slične klorotične pjege formirale u manjem broju i na nekim neinokuliranim listovima. Budući da su u lokalnim lezijama i u klorotičnim pjegama kod posljednjih vrsta roda *Nicotiana* pronađena X-tijela, sigurno je da su lezije i pjege nastale pod utjecajem virusa. Ipak do sistemične infekcije vrsta *Nicotiana rustica* i *N. sanderae* nije došlo. Gornji dijelovi ovih biljaka nisu, naime, pokazivali nikakvih vanjskih simptoma oboljenja, a isto se tako pokazalo da istisnuti sok iz tih dijelova nema sposobnosti za infekciju.

Prilikom tih istraživanja posebna je pažnja posvećena intracelularnim inkluzijama. U većini slučajeva zapažena su kod bolesnih biljaka amorfna X-tijela, i to kod biljke *Hesperis matronalis* i navedenih vrsta *Nicotiana*. Zanimljivo je da su mikroskopski i makroskopski simptomi na tim test-biljkama bili vrlo slični simptomima koje na istim vrstama izazivlje virus izoliran iz biljke *Alliaria officinalis* (usp. Miličić 1956; Miličić, Panjan, Bilanović i Katić 1958). Okolnost da virusi izolirani iz češnjače (*Alliaria officinalis*) i ljubičine (*Matthiola incana*) kod čitavog niza biljaka izazivlju iste promjene, pokazuje da se radi o vrlo srodnim ili pače identičnim virusima. Posebno je u tom pogledu ujedljiv ovaj pokus. Budući da virus izoliran iz češnjače prouzrokuje kod vrste *Sinapis alba* pored pojave X-tijela još i nastajanje vrlo karakterističnih nakupina kristalnih iglica, inokulirana je ta vrsta i virusom dobivenim iz ljubičine. Taj je virus izazvao kod biljke *Sinapis alba* sistemičnu infek-

ciju i pojavu X-tijela koja su otprilike 20 dana poslije inokulacije sadržavala velik broj kristaliničnih iglica. Ove kristalinične inkluzije posvema su se podudarale s iglicama koje u istoj test-biljci izazivlje virus izoliran iz češnjače. To je vrlo jaka indicija da su virusi izolirani iz češnjače i iz ljubičine vrlo srodni ili identični.

S obzirom na navedene promjene na test-biljkama možemo zaključiti da virus izoliran iz ljubičine predstavlja bez sumnje jedan virus krstašica i da pripada vjerojatno skupini turnip virus 1 ili skupini *Matthiola* virus 1.