

## UNTERSUCHUNGEN ÜBER VIRUS-ZELLEINSCHLÜSSE

DAVOR MILIČIĆ

(Aus dem Institut für Botanik der Universität Zagreb)

### 1. Einleitung

Schon seit langem ist es bekannt, daß in viruskranken Pflanzen kurze Zeit nach der Infektion zwei Arten von Zelleinschlüssen entstehen können: amorphe X-Körper und kristalline Körper. Die ersten sind optisch isotrop und besitzen eine rundliche, ovale oder amöboide Form; sie sind gewöhnlich so groß wie der Zellkern, sind immer nur im Cytoplasma eingebettet und stehen häufig im Kontakt mit dem Zellkern. Demgegenüber sind die letzteren Körper optisch anisotrop und kommen sowohl in der Form von polyedrischen echten Kristallen wie auch in der Form von spindel- bzw. nadelartigen Parakristallen vor. Die kristallinen Körper befinden sich entweder im Cytoplasma oder im Zellkern.

Die beiden Arten von Virus-Zelleinschlüssen sind besonders gut bei den an der Tabakmosaikkrankheit leidenden Pflanzen untersucht worden. Zahlreiche Arbeiten, unter denen besonders die Abhandlungen von Sheffield (1931, 1936) wichtig sind, weisen darauf hin, daß die unter dem Einfluß des Tabakmosaikvirus (TMV) entstehenden X-Körper allmählich in kristalline Inklusionen übergehen können. Dabei sammelt sich in den anfänglich völlig amorphen X-Körpern mit der Zeit das kristalline Material an, so daß sich endlich aus den X-Körpern kristalline Inklusionen bilden. In den mit dem TMV infizierten Pflanzen nehmen diese letzteren am häufigsten die Form von hexagonalen Prismen an. In letzterer Zeit wurden diese Prismen elektronenoptisch eingehend untersucht, wobei festgestellt wurde, daß es sich um echte Viruskristalle handelt, d. h. um Gebilde, die aus Viruspartikeln aufgebaut sind (Wehmer 1959, Hills 1959).

## 2. Über die Natur der X-Körper

Wie aus dem Obigen folgert, zeigen die lichtmikroskopischen Untersuchungen, die an den mit TMV infizierten Pflanzen ausgeführt wurden, daß ein enger genetischer Zusammenhang zwischen den X-Körpern und den kristallinen Inklusionen besteht. Deshalb herrschte bis unlängst im allgemeinen die Meinung, daß sich in den X-Körpern eine große Anzahl von Viruspartikeln befindet. Nach dieser Ansicht sind die Virusteilchen in den X-Körpern anfänglich noch nicht regelmäßig angeordnet, so daß die X-Körper zuerst einen amorphen Charakter besitzen. Erst später ordnen sich in ihnen die Partikeln regelmäßig an, wobei das Virus kristallisiert bzw. kristalline Einschlüsse entstehen.

Nicht nur das TMV, sondern auch einige andere Viren zeigen ähnliche Beziehungen unter den Zelleinschlüssen. So ist es seit Jahren bekannt, daß auch das Kakteenvirus in seinen Wirten zwei Arten von Zelleinschlüssen bilden kann. Der berühmte, unlängst gestorbene österreichische Botaniker Friedl Weber hat diese Einschlüsse eingehend studiert (Weber 1951; Weber, Kenda und Thaler 1952). Auf Grund lichtmikroskopischer Untersuchungen wurde zuerst von Weber und seinen Mitarbeitern konstatiert (Weber, Kenda und Thaler 1952; vgl. auch Miličić 1956, Amelunxen 1956), daß sich die parakristallinen Eiweißspindeln manchmal auch aus X-Körpern, d. h. aus amorphen Einschlüssen, entwickeln können.

In letzter Zeit wurden die unter dem Einfluß eines Kruziferen-Virus entstehenden Einschlüsse eingehender erforscht (Miličić 1956; Miličić, Panjan, Bilanović und Katić 1958; Miličić 1961/62). Den Ergebnissen dieser Untersuchungen nach entstehen die Körper höchstwahrscheinlich durch einen Stamm des Wasser- und Kohlrübenmosaikvirus. Auch in diesem Falle bilden sich zuerst amorphe X-Körper; später entwickeln sich aus diesen kristalline Einschlüsse, die meistens die Form von Nadelaggregaten aufnehmen.

Diese lichtmikroskopischen Untersuchungen, die auf einen engen Zusammenhang zwischen den X-Körpern und kristallinen Einschlüssen hinweisen, erwiesen sich vor kurzem als ziemlich bedeutend. Unlängst sind nämlich mehrere Arbeiten veröffentlicht worden, deren Autoren in den X-Körpern die Anwesenheit der Viruspartikeln nicht beweisen konnten (Rawlins, Weierich und Schlegel 1956, Matsui 1959 u. a.; vgl. dagegen Brandes 1956). Die Ergebnisse dieser Arbeiten stehen nicht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen, daß die Viruskristalle aus den X-Körpern durch allmähliche Kristallisation entstehen. Wenn in den X-Körpern keine Virusteilchen vorhanden wären, dann konnten sich aus ihnen keine Viruskristalle aufbauen. Die Meinungen verschiedener Autoren über die Natur der X-Körper stimmen also noch immer nicht überein (vgl. Richter und Klinkowski 1960). Jedoch zeigen die angeführten Untersuchungen über Entstehung der kristallinen Einschlüsse des Kakteenvirus und Wasser- und Kohlrübenmosaikvirus, daß X-Körper höchstwahrscheinlich Aggregate von Viruspartikeln darstellen.

### 3. Kakteen-Eiweißspindeln in den Angehörigen der Familien *Chenopodiaceae* und *Caryophyllaceae*

In den Zellen vieler Kakteen wurden von Molisch (1885) die spindelförmigen Eiweißeinschlüsse entdeckt, die heute unter dem Namen Eiweißspindeln allgemein bekannt sind. Molisch war der Ansicht, daß diese kristallinen Körper Reservestoffe vorstellen. Edith Rosenzopf (1951), eine Schülerin von Friedl Weber, hat mittels Übertragungsversuche festgestellt, daß die Eiweißspindeln keine normalen Zellbestandteile, sondern Virus-Zelleinschlüsse sind. Nach diesen ersten Versuchen wurden die Eiweißspindeln noch von anderen Forschern genauer untersucht (Weber, Kenda und Thaler 1952; Miličić 1954; Amelunxen 1958), wobei die Angaben von Rosenzopf bestätigt werden konnten.

Mit der Struktur der Eiweißspindeln befaßte sich besonders Amelunxen (1956, 1958), der festgestellt hat, daß diese Körper von elementaren Viruspartikeln aufgebaut sind. Nach der Ansicht dieses Autors entstehen die Eiweißspindeln durch die lineare und die laterale Aggregation der länglichen Virusteilchen; demnach sind die Eiweißspindeln nach ihrer Struktur höchstwahrscheinlich Parakristalle.

Bis unlängst waren die Wirtspflanzen des Eiweißspindeln bildenden Virus nur aus der Familie *Cactaceae* bekannt. Vor kurzem gelang es Miličić und Udbinac (1961), dieses Virus auf einige Pflanzen zu übertragen, die nicht den Kakteen angehörten. Das sind folgende Pflanzenarten: *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium album*, *Beta vulgaris* und *Agrostemma githago*. Das Virus wurde dabei mechanisch mit Hilfe von Karborundpuder übertragen. In allen diesen Arten sind 10 bis 45 Tage nach der Inokulation in den behandelten Blättern Eiweißspindeln entstanden, die ebenso gut entwickelt waren wie bei *Zygocactus*, *Opuntia* und anderen Kakteen. Außer den typischen Spindeln befanden sich da auch Körper, die den Raphiden, Nadeln oder Fäden ähnlich waren, so daß ihre Form sehr variabel war, wie das der Fall auch bei Kakteen ist.

Es ist interessant, daß bei allen angeführten Pflanzen das Kakteenvirus in den inokulierten Blättern lokalisiert blieb. Dabei entstanden bei *Beta vulgaris* und *Agrostemma githago* auf den inokulierten Blättern keine Krankheitssymptome, so daß die Infektion nicht nur lokalisiert, sondern auch latent war. Demgegenüber bildeten sich auf den *Chenopodium*-Blättern charakteristische Lokalläsionen, die ungefähr 4 mm groß und bei Vergilbung der Blätter von einem grünen Hof umgeben waren.

#### 4. Virus-Zelleinschlüsse in Lokalläsionen

In dem im Bereiche der Lokalläsionen befindlichen Zellen von *Chenopodium* haben wir also, viele unter dem Einfluß des Kakteenvirus entstandene Zelleinschlüsse entdeckt. Es muß hier betont werden, daß die Virus-Zelleinschlüsse bei früheren Untersuchungen in den unter nor-

malen Bedingungen entstehenden Lokalläsionen nie aufgefunden worden sind. Da das Vorkommen der Einschlüsse in Lokalläsionen für die Kenntnis des Mechanismus, der die Lokalisierung des Virus im Bereiche der Läsionen reguliert, von Belang sein könnte, haben wir auch Untersuchungen an den von verschiedenen Viren verursachten Läsionen ausgeführt.

Die Virus-Zelleinschlüsse in Lokalläsionen scheinen ziemlich häufig zu sein. So konnten wir z. B. diese Körper außer in dem schon erwähnten Falle noch in Lokalläsionen entdecken, die sich unter dem Einfluß des TMV auf *Datura stramonium* bildeten (Miličić 1962). In der Mitte dieser Läsionen befand sich ein nekrotisches Gewebe, das von einem engen lebenden chlorotischen Hof umgeben war. Gerade in diesem lebenden Läsionsteile haben wir typische hexagonale Prismen beobachtet. Da diese Prismen echte Viruskristalle sind, kann man auf Grund ihrer Anwesenheit darauf schließen, daß im lebenden Teile der Lokalläsionen eine große Menge von Viruspartikeln vorhanden ist.

Auch in den Blättern von *Chenopodium amaranticolor* bilden sich unter dem Einfluß des TMV Lokalläsionen (Miličić und Udbinac 1961). In diesen konnten wir einige Tage nach der Inokulation ziemlich große X-Körper wahrnehmen, in denen sich später das kristalline Material ansammelte.

Die Virus-Zelleinschlüsse haben wir auch in Lokalläsionen aufgefunden, die sich nach Infektion mit einem Stamm des Wasser- und Kohlrübenmosaikvirus auf den Blättern von *Chenopodium amaranticolor* und *Gomphrena globosa* entwickelt haben (Miličić 1962). Dieser Stamm rief bei den erwähnten Pflanzen Lokalläsionen hervor, die mit einem nekrotischen Zentrum versehen waren. Auch in diesen Läsionen konnten wir X-Körper auffinden, und zwar in ihren lebenden Teilen, die sich um das nekrotische Zentrum befanden.

Wie aus dieser Darstellung ersichtlich ist, ist das Vorkommen der Virusinklusionen in Lokalläsionen ziemlich häufig. Dabei sind die Einschlüsse in der Regel in den chlorotischen Teilen der Läsionen zu finden; demgegenüber kann man diese Körper in nekrotischen Teilen nicht mehr bemerken. Im allgemeinen kann man sagen, daß das Vorkommen der Einschlüsse und der Virusteilchen in Lokalläsionen sehr reichlich ist. Außerhalb der Läsionen, im gesunden Blattgewebe, konnten wir niemals Viruseinschlüsse wahrnehmen. Das weist darauf hin, daß sich das Virus bei den beschriebenen Lokalinfektionen nur in den Läsionen vermehren kann.

## 5. Viruskörper in der Vakuole

Gelegentlich unserer mikroskopischen Untersuchungen haben wir manchmal in den Zellen, die schon erwähnte Viruseinschlüsse enthielten (X-Körper und kristalline Einschlüsse), noch besondere Körper beobachtet, die in den Vakuolen lokalisiert waren. Demgegenüber befanden sich die oben beschriebenen amorphen und kristallinen Einschlüsse immer im Cytoplasma oder — sehr selten — im Zellkern. Da diese neuen

Körper in einem anderen Zellteil eingebettet lagen, haben wir einige Beobachtungen an ihnen ausgeführt (vgl. Miličić 1962).

Besonders eingehend konnten wir diese Körper bei *Capsicum annum* und *Datura stramonium* studieren. Diese beiden Pflanzen waren mit einem TMV-Stamm infiziert, der aus einer Tomatenpflanze isoliert worden ist. In *Capsicum annum*-Pflanzen, die systemisch erkrankt waren, wiesen die Vakuolenkörper die Form von Nadelbündeln auf. Sie befanden sich regelmäßig nur in den Zellen, wo auch die hexagonalen Prismen vorhanden waren. Daß die Nadelbündel die intravakuoläre Lokalisation enthielten, konnten wir aus ihrer sehr lebhaften Brownschen Bewegung schließen, wie auch auf Grund ihrer Verlagerung im horizontalen Mikroskop.

Wir sind der Ansicht, daß die Nadelbündel Viruskörper sind, d. h. daß sie Gebilde darstellen, die unter dem Einfluß der Virusinfektion entstehen. Diese Folgerung ergeht einerseits aus der Beobachtung, daß sich die Nadelbündel nur in jenen *Capsicum annum*-Pflanzen befinden, die mit TMV infiziert sind, wogegen sie in gesunden Exemplaren der gleichen Art gänzlich fehlen; andererseits erscheinen bei Übertragung des die Bildung der Nadelbündel verursachenden TMV-Stammes von *Capsicum annum* auf *Datura stramonium* die gleichen Körper auch in den Vakuolen der letzteren Pflanze. Sie sind da in *Datura* nur in den schon erwähnten chlorotischen Höfen lokalisiert, die die nekrotischen Läsionszentren umgeben, niemals aber in gesunden Bereichen der inokulierten Blätter. Gleicherweise fehlten diese Körper immer gänzlich in gesunden Exemplaren der gleichen Art. Diese charakteristische Verteilung der Bündel, wie auch ihre Übertragungsfähigkeit zeigen unzweifelhaft darauf, daß es sich um Viruskörper handelt.

Ähnliche unter dem Einfluß verschiedener Viren entstehende Vakuolenkörper wurden von Miličić und Plavšić (1956), von Kenda (1961) und Miličić (1963) schon beschrieben.

Die angeführten Untersuchungen über Virus-Zelleinschlüsse zeigen deutlich, daß das Studium der virusinfizierten Zellen nicht erschöpft ist und daß es unsere Kenntnisse über Viren noch auch weiterhin bereichern kann.

### Zusammenfassung

1. In letzter Zeit wurden in der Literatur widersprechende Angaben über den Charakter der amorphen Virus-Zelleinschlüsse (der X-Körper) vorgeführt. Deshalb sind hier einige wenig beachtete Untersuchungen angeführt, die die klassische Ansicht über die Natur der X-Körper unterstützen, nach der diese Körper Aggregate von Viruspartikeln vorstellen.

2. Die schönen parakristallinen Virus-Zelleinschlüsse der Kakteen, die unter dem Namen Eiweißspindeln wohlbekannt sind, wurden bis unlängst nur in den Angehörigen der Familie *Cactaceae* aufgefunden; vor kurzem aber wurde das Kakteenvirus auf *Chenopodium*, *Beta* und

*Agrostemma* übertragen, wo es die Entstehung ebenso gut entwickelter Virus-Eiweißspindeln verursacht.

3. Die Virus-Zelleinschlüsse wurden früher nur in den systemisch infizierten Pflanzen untersucht. Erst in den letzten Jahren wurde es bewiesen, daß die Einschlüsse auch in den von verschiedenen Viren (TMV, Kakteenvirus und Wasser- und Kohlrübenmosaikvirus) verursachten Lokalläsionen vorkommen können.

4. Mehrere Beobachtungen weisen darauf hin, daß auch im Zellsafte virusinfizierter Pflanzen besondere kristalline eiweißhaltige Körper entstehen können, die von einer Virusinfektion abhängig sind.

## L I T E R A T U R

- Amelunxen, F.*, 1956: Beobachtungen über die Entwicklung der Eiweißspindeln bei Cactaceen. *Protoplasma* 45, 146—172.
- Amelunxen, F.*, 1958: Die Virus-Eiweißspindeln der Kakteen. Darstellung, elektronenmikroskopische und biochemische Analyse des Virus. *Protoplasma* 49, 140—178.
- Brandes, J.*, 1956: Über das Aussehen und die Verteilung des Tabakmosaikvirus im Blattgewebe. *Phytopath. Z.* 26, 93—106.
- Hills, C. J.*, 1959: Partial cristallization of tobacco mosaic virus. *Virology* 7, 239—240.
- Kenda, G.*, 1961: Einschlusskörper in den Epidermiszellen von *Chlorophytum comosum*. *Protoplasma* 53, 305—319.
- Matsui, C.*, 1959: Fine structure of X-body. *Virology* 9, 306—313.
- Miličić, D.*, 1954: Viruskörper und Zellteilungsanomalien in *Opuntia brasiliensis*. *Protoplasma* 43, 228—236.
- Miličić, D.*, 1956 a: Eiweißkristalloide in *Opuntia inermis*. *Österr. bot. Z.* 103, 365—375.
- Miličić, D.*, 1956 b: Virus-Zelleinschlüsse in *Alliaria officinalis*. *Protoplasma* 47, 341—346.
- Miličić, D.*, 1961/1962: Viruskörper in den Zellen von *Matthiola incana*. *Acta bot. Croatica* 21/22, 21—34.
- Miličić, D.*, 1962: Virus-Einschlusskörper in Lokalläsionen. *Phytopath. Z.* 44, 282—294.
- Miličić, D.*, 1963: Viruskörper im Zellsafte. *Protoplasma* 57, 601—610.
- Miličić, D.*, und *B. Plavšić*, 1956: Eiweißkristalloide in Kakteen-Virussträgern. *Protoplasma* 46, 547—555.
- Miličić, D.*, und *Z. Udbinac*, 1961: Virus-Eiweißspindeln der Kakteen in Lokalläsionen von *Chenopodium*. *Protoplasma* 53, 574—596.
- Miličić, D.*, *M. Panjan*, *Đ. Milanović* und *B. Katić*, 1958: Viruskrankheit von *Alliaria officinalis*. *Acta bot. Croatica* 17, 159—176.
- Mölsch, H.*, 1885: Über merkwürdig geformte Proteinkörper in den Zweigen von *Epiphyllum*. *Ber. dtsh. bot. Ges.* 3, 195—202.
- Rawlins, T. E.*, *A. J. Weierich* und *D. E. Schlegel*, 1956: A histochemical study of certain plant viruses by means of the Sakaguchi reaction for arginine. *Virology* 2, 308—311.
- Richter, J.*, und *M. Klinkowski*, 1960: Das Tabakmosaikvirus (TMV) — Modellobjekt der pflanzlichen Virusforschung. *Zbl. Bakt., Abt. II*, 113, 700—765.

- Rosenzopf, E., 1951: Sind Eiweißspindeln Virus-Einschlußkörper?. *Phyton* 3, 95—101.
- Sheffield, F. M. L., 1931: The formation of intracellular inclusions in solanaceous host infected with aucuba mosaic of tomato. *Ann. Appl. Biol.* 18, 471—493.
- Sheffield, F. M. L., 1936: The susceptibility of the plant cell to virus disease. *Ann. Appl. Biol.* 23, 498—505.
- Weber, F., 1951: Trypanoplasten-Viruskörper von *Rhipsalis*. *Phyton* 3, 273—275
- Weber, F., 1953: Gibt es Virusträger unter den Kakteen? *Ber. ötsch. bot. Ges.* 65, 319—320.
- 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—196.

## S A D R Ź A J

### ISTRAŽIVANJA VIRUSNIH STANIČNIH INKLUZIJA

*Davor Miličić*

(Iz Instituta za botaniku Sveučilišta u Zagrebu)

1. U posljednje vrijeme susreću se u literaturi oprečni podaci o karakteru amorfnih virusnih inkluzija (X-tijela) u biljnim stanicama. Dok neki autori smatraju da se X-tijela sastoje od virusnih čestica, drugi negiraju da se u njima nalazi virus. Zbog toga smo u ovom referatu iznijeli rezultate nekih prilično slabo zapaženih istraživanja koja podupiru prvo shvaćanje o prirodi X-tijela, tj. klasično shvaćanje, prema kojemu amorfne inkluzije predstavljaju agregate virusnih čestica.

2. Lijepe parakristalinične virusne inkluzije u stanicama raznih kakteja, koje su poznate pod imenom proteinskih vretena, istraživale su se sve donedavna isključivo na kaktejama. Pripadnici ove familije dosta su nepodesan objekt za detaljna istraživanja virusa kakteja. Zbog toga uspješan prijenos ovoga virusa na rodove *Chenopodium*, *Beta* i *Agrostemma* može znatno olakšati daljnja istraživanja. Interesantno je da se u navedenim biljkama obrazuju poslije infekcije isto tako velika i pravilna vretena kao i kod kakteja.

3. Virusne stanične inkluzije proučavale su se redovno na biljkama koje su bile sistemično inficirane. Nije se uopće znalo da inkluzije nastaju i u lokalnim lezijama. Tek smo nedavno ustanovili da se inkluzije pojavljuju i u lokalnim lezijama pod utjecajem raznih virusa (virusa mozaika duhana, virusa kakteja i virusa mozaika postrne repe).

4. Veći broj zapažanja pokazuje da se i u staničnom soku biljaka koje su inficirane virusima obrazuju naročita kristalična bjelančevinasta tijela koja su očito posljedica infekcije.