

Kontraktion des Zellsaftes (Synärese) in den mit Holmes' ribgrass virus infizierten Pflanzenzellen

D. MILIČIĆ, L. NIKOLIĆ und M. WRISCHER

*Botanisches Institut der Universität und Institut
"Rudjer Bosković" Zagreb*

EINLEITUNG

Holmes' ribgrass strain von Tabakmosaikvirus oder kurzum Holmes' ribgrass virus (HRV) ist in verwandtschaftlichen Beziehungen von dem gewöhnlichen Stamm des Tabakmosaikvirus (TMV) so sehr entfernt, dass das HRV für eine besondere Virusart betrachtet werden kann [6]. Wie Goldin [2], Miličić [8] und Juretić u. a. [4] festgestellt haben, bildet das HRV intrazelluläre kristalline Einschlüsse nicht in Form von hexagonalen Prismen, die für den gewöhnlichen und für manche andere TMV-Stämme charakteristisch sind, sondern solche in Form von sog. rundlichen Plättchen. Die Struktur dieser Plättchen ist jener der hexagonalen Prismen so ähnlich, dass bei den HRV-Wirtspflanzen die Prismen durch die rundlichen Plättchen ersetzt zu werden scheinen [9].

In den mit HRV infizierten Tabakzellen haben Miličić u. a. [9] noch eine besondere Erscheinung beobachtet. Bei Zusatz von Pikrinsäure entsteht in ihnen eine charakteristische Kontraktion des Zellsaftes, die besonders schön an der Blattepidermis — und Haarzellen studiert werden kann. Die Kontraktion kann gewöhnlich nur in jenen Blattbereichen wahrgenommen werden wo die rundlichen Plättchen reichlich anwesend sind, nicht aber in anderen Bereichen. Sie entsteht auch in den mit gewöhnlichem TMV-Stamm infizierten Tabakzellen, der Prozess aber verläuft in diesen Zellen nicht so regelmässig wie in jenen, die mit HRV infiziert sind. Zum Unterschied davon bleibt die Kontraktion des Zellsaftes bei ganz gesunden Tabakpflanzen völlig aus.

Dieser Kontraktionsprozess ähnelt sehr den in Boraginaceen- Blüten entstandenen Veränderungen, die entweder spontan erscheinen oder durch Säuren und durch Vitalfärbung induziert werden können [3, 5]. Der Prozess verläuft in der Weise, dass sich der Zellsaft nach dem Zusatz von Pikrinsäure zuerst in zwei Phasen verteilt, und zwar in eine feste Phase und eine flüssige Phase. Dann kontrahiert sich die feste Phase allmählich, dabei daurend die verkleinerte Form der Zelle behaltend, in der sie sich befindet (Abb. 1). Ausserdem wird aus der festen Phase während der Kontraktion eine flüssige Phase ausgeschieden, die dann den Raum

zwischen dem kontrahierten Zellsaft und den wandständigen Protoplasmabelag ausfüllt. Während der Kontraktion behält der Protoplasmabelag weiter seine Stelle an der Zellwand und ändert sein Volumen nicht. Viele Autoren meinen, dass es sich bei diesem Prozesse um echte Synärese handelt (vgl. [12]).

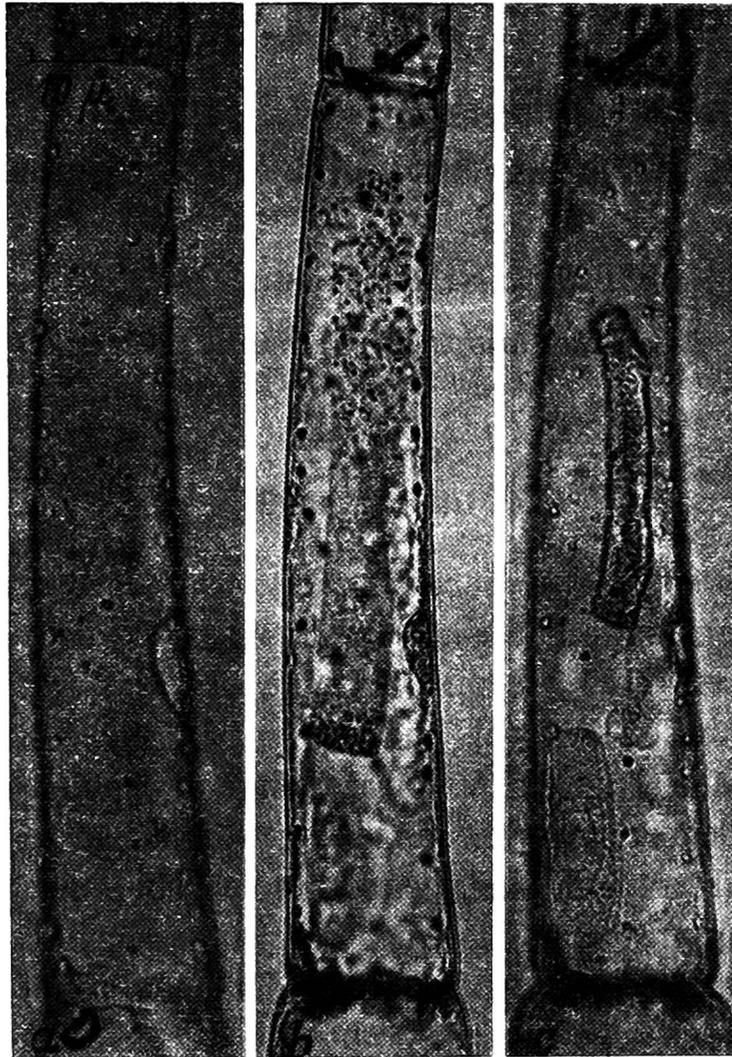


Abb. 1. Verlauf der Kontraktion des Zellsaftes in einer mit HRV infizierten Haarzelle von *Nicotiana tabacum*. *a* — lebendige Zelle vor Behandlung mit Pikrinsäure, *b* — unter dem Einfluss des Reagens beginnt sich Zellsaft zu kontrahieren, *c* — Endstadium der Kontraktion. Nach Miličić u. a. [9].

Wie bekannt, entsteht eine synäretische Kontraktion nur in jenen kolloidalen Lösungen, die einen Gel-Charakter besitzen. Dass der Zellsaft in den mit HRV infizierten Tabakzellen Eigenschaften der Gele manchmal besitzt, haben Miličić u. a. [9] gezeigt. Ausserdem wurde von diesen Autoren eine Reihe von mikrochemischen Reaktionen ausgeführt, auf Grund dessen angenommen werden konnte, dass die kontrahierte Vakuole Eiweisstoffe enthält. Die vorliegenden Untersuchungen bringen weitere Beiträge zur Kenntnis der Vakuolenkontraktion HRV-infizierter Pflanzen.

MATERIAL UND METHODE

Die vorliegenden Untersuchungen wurden hauptsächlich mit dem Isolat HRV-Y durchgeführt, das nach den Befunden von Juretić u. a. [4] dem typischen HRV nahe verwandt ist. Für Vergleichszwecke benützten wir das gewöhnliche TMV

und das typische HRV, die uns Herr Dr J. Brčak (Prag) liebenswürdigerweise zur Verfügung gestellt hat.

Die Kontraktion wurde durch eine gesättigte wässrige Lösung von Pikrinsäure hervorgerufen, die direkt den lebendigen Flächenschnitten zugesetzt wurde. Die hier beigefügten Zeichnungen wurden mit Zeichenapparat ausgeführt.

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden kleine Blattstücke in eine mit Cacodylat (pH 7,2) gepufferten 3% Glutaraldehyd-Lösung fixiert, mit gepufferter 1% OsO₄-Lösung postfixierung und in Araldit eingebettet. Die Schnitte wurden zuerst mit 5% Uranylacetat-Lösung und dann mit Bleicitrat [11] kontrastiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Siemens Elmiskop I des Biologischen Institutes der Universität Zagreb gemacht.

ERGEBNISSE

Die unter dem Einfluss der Pikrinsäure entstandene Zellsaft- Kontraktion lässt sich lichtmikroskopisch leicht verfolgen. Sobald diese Lösung in die Zelle eindringt, verliert der Zellkern seinen hyalinen Charakter und wird stärker lichtbrechend. Gleichzeitig ändern sich stark auch die rundlichen Plättchen: sie zerfallen in mehrere, häufig nadelartige Teile. Erst später verändert sich auch der Zellsaft, der unter dem Einfluss des Reagens feinkörnig und gelbbraun wird. Unmittelbar nachher sondert sich die feste Phase von dem Tonoplasten ab und beginnt sich gegen die Zellmitte zu kontrahieren. In der Abb. 1 ist der Verlauf des Kontraktionsprozesse dargestellt. Die Kontraktion dauert verschiedenartig lang, gewöhnlich weniger als 7 Minuten. Verläuft dieser Prozess weniger regelmässig, so dauert er meistens länger. Bei den regelmässigen Kontraktionen konnten wir durch Vermessung feststellen, dass sich die feste Phase anfangs schneller kontrahiert, später allmählich langsamer (Abb. 2).

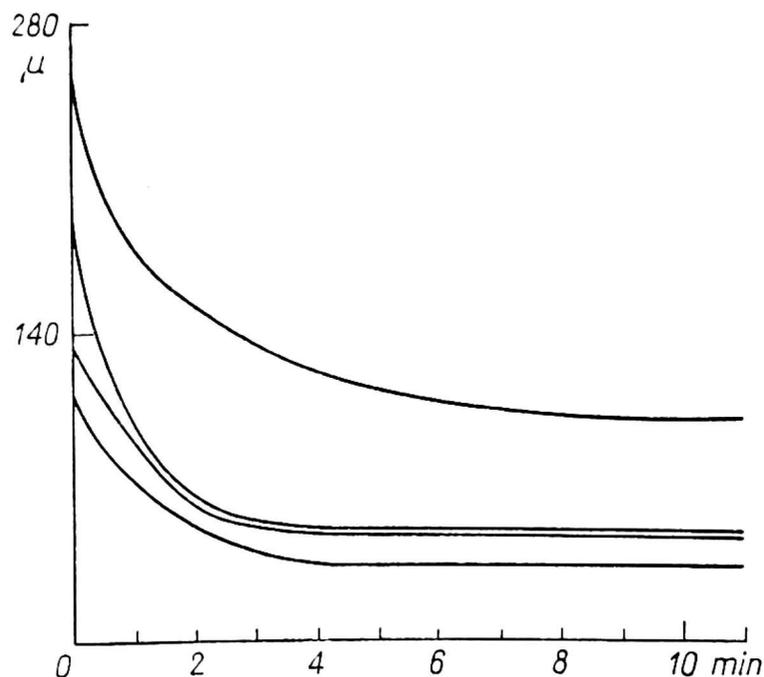


Abb. 2. Verkürzung der festen Phase in vier verlängerten Haarzellen während des Kontraktionsprozesses. Ordinate: Länge des Gels; Abszisse: Dauer des Prozesses.

Unter den regelmässigen Kontraktionen verstehen wir solche Prozesse, bei denen sich die feste Phase in allen Richtungen gleichmässig kontrahiert, so dass sie dauernd die Form ihrer Zelle behält. Manchmal entstehen auch unregelmässige Kontraktionen, die sich besonders in verlängerten Zellen gut beobachten lassen. Hierbei kontrahiert sich die feste Phase hauptsächlich seitlich, d. h. sie verjüngt sich, wobei sie sich gar nicht oder nur sehr wenig verkürzt. Die Folge der unregelmässigen Kontraktion ist, dass die kontrahierte Phase die Form der Zelle nicht beibehält, sondern die Form einer engen sich längs der ganzen Zelle erstreckenden Schnur annimmt.

In den meisten Fällen aber gehört die Kontraktion dem regelmässigen Typus an. Dass hier die feste Phase die Form der Zelle gut bewahrt, ist bei den gewöhnlichen Haaren besonders schön zu sehen, weil bei ihnen die Spitzenzelle kegelförmig ist und die anderen Zellen zylinderförmig sind. Nach der Kontraktion nehmen auch die kontrahierten Gele charakteristische Formen dieser Zellen an (Abb. 3b). Die Bewahrung der Form ist auffallend auch bei jenen Epidermiszellen, die wellenförmige Seitenwände besitzen (Abb. 3d, e).

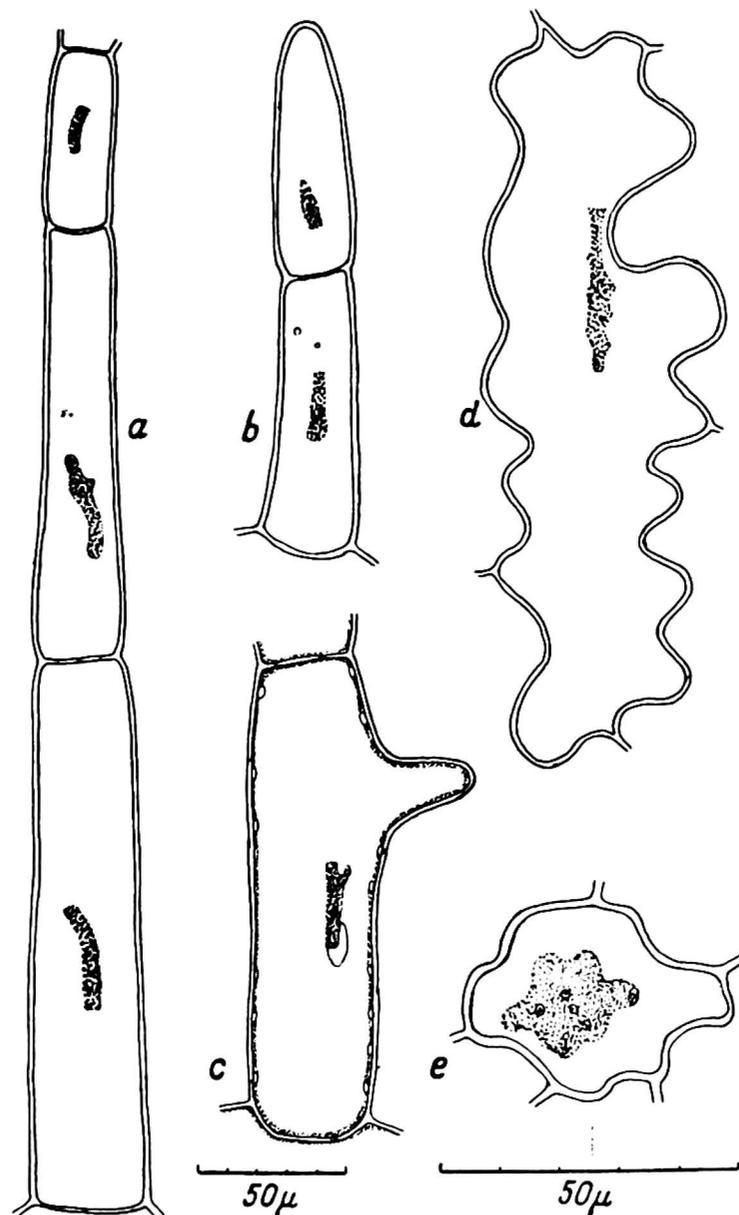


Abb. 3. Abhängigkeit der Form des kontrahierten Gels von der Zellform. a—c — Haarzellen, d — epidermale Zelle von *Nicotiana tabacum*, e — epidermale Zelle von *Ciphomandra betacea*.

Bei der Kontraktion teilt sich meistens die feste Phase an allen Stellen vom Tonoplasten leicht ab, so dass sie endlich in die Mitte der Zelle gelangt (Abb. 3). Wenn aber der Kontakt zwischen dem Tonoplasten und der festen Phase an einer Stelle etwas enger ist, kann die Phase an dem wandständigen Protoplasma bleiben.

Schon früher haben Milicić u. a. [9] auf Grund des Ausbleibens der Brown'schen Bewegung bei den in Vakuolen befindlichen Calciumoxalat-Kristallen geschlossen, dass sich der Zellsaft der kontraktionsfähigen Zellen im festen Gel-Zustand befindet. Dass dieser Zell-, „Saft“ wenigstens nach der Einwirkung der Pikrinsäure gallertig wird, ist daraus ersichtlich, dass er während der Kontraktion den verkleinerten Umriss der Zelle dauernd behält. Wenn die kontrahierende Phase flüssig wäre, müsste sie früher oder später eine rundliche Form annehmen. Sie ist nämlich von allen Seiten mit einer währigen Lösung umgeben, die nicht verhindern kann, dass die Oberflächen-Spannungskräfte diese Phase abrunden. Demzufolge, wenn diese Phase flüssig wäre, würde sie sich wie ein Oltropfen verhalten, der infolge der Oberflächen-Spannungskräfte im Wasser eine rundliche Form annimmt.

Um weitere Beweise zu bringen, dass sich der Zellsaft manchmal im Gel-Zustand befindet, wurde folgender Versuch ausgeführt. Als Objekt dienten uns die verlängerten unter den Hauptnerven, gestellten Blattepidermiszellen von *Nicotiana tabacum* (White Burley). Es wurden zuerst dünne, einige mm² grosse Flächenschnitte bereitet. Jeder Schnitt wurde dann wieder mit vertikal orientiertem Messer halbiert und nach kurzer Zeit in die Pikrinsäure gelegt. Es wurde dabei festgestellt, dass die Kontraktion nicht nur in den intakten, sondern auch in den stark beschädigten Zellen, die beim Schneiden halbiert wurden, entsteht (Abb. 4). Dieser Versuch zeigt, dass der Zellsaft gallertig ist, weil ein flüssiger Zellsaft aus den zerschnittenen Zellen ausfließen würde.

Die angeführten Versuche wurden meistens mit *N. tabacum* ausgeführt. Es wurde aber festgestellt, dass es auch in den Blättern von *Petunia hybrida* und *Ciphomandra betacea* zu einer Kontraktion unter dem Einfluss von Pikrinsäure kommt. Es ist wahrscheinlich, dass dieser Prozess auch bei vielen anderen HRV-Wirten vorkommen kann. Die Kontraktion wurde bisher nur in den Epidermis- und Haarzellen von Blättern beobachtet.

Milicić u. a. [9] haben auf Grund des positiven Ergebnisses einiger Reaktionen konstatiert, dass die kontrahierte Phase Eiweissstoffe enthält. Nachträglich haben wir einen Verdauungsversuch mit Pepsin ausgeführt, wobei festgestellt wurde, dass sich das kontrahierte Gel im Pepsin nach Zeit löst, während es im Kontrollversuch ohne Pepsin gänzlich ungelöst bleibt. Ausserdem lässt sich das Gel in einer 2% KOH-Lösung lösen. Auch diese positiven Versuche zeigen, dass sich im Gel Eiweissstoffe befinden.

Auf Grund des positiven Ergebnisses dieser Reaktionen und des Umstandes, dass in gesunden Kontrollpflanzen keine Kontraktion vorkommt, sondern nur in infizierten Pflanzen, und zwar ausschliesslich in jenen Bereichen, wo die Viruskonzentration hoch ist, konnte vermutet werden, dass da Virus die direkte oder indirekte Ursache des Prozesses ist [9].



Abb. 4. Epidermis von *Nicotiana tabacum*. Nach dem Durchschneiden der kontrahierten Phase fließt der Zell, „Saft“ nicht aus.

Um einen Einblick in den Feinbau der Zellen mit kontrahierendem Zellsaft zu bekommen, wurden ultradünne Schnitte durch die Epidermis der mit HRV infizierten Tabakblättern hergestellt. Die Schnitte wurden durch jene Blatteile getan, wo vordem lichtmikroskopisch konstatiert wurde, dass dort Zellsaft-Kontraktion entstehen kann.

Bei den Untersuchungen dieser Schnitte konnte im Bereiche der Zentralvakuole die Anwesenheit von Virusteilchen festgestellt werden (Abb. 5). Die in der Vakuole vorkommenden Virusteilchen sind darin regellos orientiert, liegen also parallel, schräg oder senkrecht zur Schnittebene (Abb. 5). Manchmal zeigen sie eine Tendenz, sich untereinander mehr oder weniger parallel zu ordnen. Es ist auffallend, dass die Zellen, deren Vakuolen Virusteilchen enthalten, Schädigungen im Plasmabelag aufweisen. Je stärker diese Schädigungen sind, desto höher ist erfahrungsgemäss auch die Zahl der Virusteilchen im Zellsaftraum.

In ultradünnen Schnitten, die von Blatteilen hergestellt wurden, die keine Kontraktion aufwiesen, waren die Vakuolen Virusfrei. In den kontraktionsfähigen Vakuolen wurden ausser den Virusteilchen auch feine Partikeln vorgefunden, wie sie auch in den Kontrollschnitten vorkommen.



Abb. 5. Elektronenmikroskopische Aufnahme einer mit HRV infizierten Epidermiszelle von *Nicotiana tabacum*. Links Zellwand mit wandständigem Plasmabelag, rechts Zentralvakuole mit vielen eingebetteten Viruspartikeln. Tonoplast ist gut sichtbar. 48000 \times vergrößert.

DISKUSSION

Aus dem oben dargelegten geht hervor, dass sich in den Vakuolen der infizierten Pflanzen, die für eine synäretische Kontraktion fähig sind, Eiweisstoffe befinden. Im Zusammenhang damit sei betont, dass aus den lichtmikroskopischen Untersuchungen von Milicić [7] ersichtlich ist, dass die Viren eine Ansammlung von Eiweisstoffen in den Vakuolen verursachen können. Dass Eiweisstoffe Synärese verursachen können, ist schon lange bekannt.

Esau und Cronshaw [1] haben elektronenmikroskopisch festgestellt, dass Viruspartikeln in die Zentralvakuole eindringen können. Diese Forscher meinen, die Viren seien fähig, durch den Tonoplasten und andere cytoplasmatischen Membranen von einem Zellteil in den anderen zu gelangen. Demgegenüber geht aus den Untersuchungen von Milne [10] hervor, dass die intravakuoläre Lokalisation der Viruspartikeln auch eine Folge der Fixation sein kann.

Es besteht nun die Frage, ob die in Abb. 5 dargestellten HRV-Partikeln in der

Vakuole der lebenden Zelle vorkommen, oder ob sie dorthin erst nachträglich bei der Präparation der Gewebe vor der Fixierung gelangen. Für das Einwirken des letzteren Faktors würden auch die beobachteten Zellschädigungen sowie ihr Zusammenhang mit der Zahl der Viruspartiklen sprechen.

ZUSAMMENFASSUNG

In *Nicotiana tabacum* und einigen anderen mit Holmes' ribgrass virus infizierten Pflanzenarten kommt es in jenen Blattbereichen, wo die Viruseinschlusskörper besonders reichlich vorhanden sind, zu einer Kontraktion des gallertigen Zellsaftes unter dem Einfluss der Pikrinsäure. Der Kontraktionsprozess, der hier eingehend beschrieben worden ist, ist einer Synärese sehr ähnlich. Aus dem positive Ergebnis einiger mikrochemischen Reaktionen geht hervor, dass das kontrahierte Gel Eiweißstoffe enthält, von denen seine Fähigkeit zur Kontraktion abhängig sein könnte.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Dünnschnitten durch kontraktionsfähige Gewebepartien lassen die Anwesenheit von Viruspartiklen im Zellsafttraum erkennen. Ob die Viruspartiklen in der Zentralvakuole in lebenden Zellen vorkommen, oder ob sie dort nachher als Folge der Präparation der Gewebe vor der Fixierung gelangen, lässt sich z. Z. nicht entscheiden.

LITERATUR

1. Esau K., Cronshaw J., 1967 Relation of tobacco mosaic virus to the host cells. *J. Cell Biol.* **33**: 665-678.
2. Goldin M. I., 1953. Das Wegerich-Mosaik (russisch). *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **88**: 933-935.
3. Hofmeister L., 1941. Mikrurgische Studien an Borragninoideen-Zellen. I. Mikrodisektion. *Protoplasma* **35**: 65-94.
4. Juretić N., Wrischer M., Polák Z., 1969. A strain of Holmes ribgrass virus occurring in Yugoslavia. *Biol. plant.* Praha (im Druck).
5. Kenda G., Weber F., 1952. Rasche Vakuolen-Kontraktion in Centriche-Blütenzellen. *Protoplasma* **41**: 458-466.
6. Kovachevsky I. Ch., 1963. Untersuchungen über das Wegerichmosaik in Bulgarien. *Phytopathol. Z.* **49**: 127-146.
7. Miličić D., 1963. Viruskörper im Zellsafte. *Protoplasma* **57**: 601-610.
8. Miličić D., 1968. Zelleinschlüsse von Holmes' ribgrass virus, eines Verwandten des Tabakmosaikvirus. *Naturwissenschaften* **55**: 90-91.
9. Miličić D., Štefanac Z., Juretić N., Wrischer M., 1968. Cell inclusions of Holmes'ribgrass virus. *Virology* **35**: 356-363.
10. Milne R. G., 1966. Multiplication of tobacco mosaic virus in tobacco leaf palisade cells. *Virology* **28**: 79-89.
11. Reynolds E. S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**: 208-212.
12. Strugger S., 1949. Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanzen. 2. Aufl. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen—Heidelberg.