

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Virusforschung der Biologischen
Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig

Über Möglichkeiten und Grenzen der Elektronen- mikroskopie bei morphologischen Untersuchungen an Pflanzenviren*)

Von

O. Bode

Für bestimmte Untersuchungen bei Viren hat das Elektronenmikroskop in den letzten Jahren eine ähnliche Bedeutung erlangt wie seit langem das Lichtmikroskop in der Mikrobiologie. Durch die Verwendung von Elektronen zur Abbildung ist es möglich geworden, den Bereich der Auflösung um 2 Zehnerpotenzen zu erweitern und dadurch die Viruspartikeln sichtbar zu machen, auf deren Gestalt und Form bis dahin nur durch indirekte Methoden Rückschlüsse gezogen werden konnten.

Bei elektronenoptischen Untersuchungen ist jedoch stets zu berücksichtigen, daß grundlegende Unterschiede gegenüber den Präparationsmethoden der Lichtmikroskopie bestehen, durch die z. T. auch eine Begrenzung gesetzt ist. Während im Lichtmikroskop die Objekte in weitgehend natürlicher Umgebung und unter günstigen Bedingungen beobachtet werden können, werden die Präparate im hohen Vakuum des Elektronenmikroskops vollkommen eingetrocknet, so daß nicht unerhebliche Belastungen durch Oberflächenspannungen während des Trocknungsprozesses auftreten, die zu Strukturveränderungen führen können. Dann aber kann sich die während des Trocknens steigende Salzkonzentration des Mediums ebenfalls ungünstig auswirken, und es darf auch nicht übersehen werden, daß durch die Absorption der energiereichen Elektronen im Objekt selbst enorme Energien frei werden, die dort Temperaturen von einigen 100° hervorrufen. Die Bilder, die schließlich beobachtet werden, haben nichts mehr mit dem ursprünglichen Objekt zu tun, sondern stellen das Abbild von Artefakten, von Kohlenstoffgerüsten, dar.

Das Arbeiten in dem weitgehend unbekanntem und unerforschten Größenbereich bereitet auch dadurch besondere Schwierigkeiten, daß eine Deutung der Aufnahmen infolge fehlender Vergleichsmöglichkeiten nicht immer gegeben werden kann. Weniger Schwierigkeiten bestehen bei solchen Viren, die biophysikalisch genügend charakterisiert und weitgehend gereinigt werden können. Dagegen sind für bisher nicht untersuchte und in ihren Eigenschaften unbekanntem Viren stets Kontroll-

*) Gekürzte Wiedergabe eines auf der Botanikertagung 1956 in Hann.-Münden gehaltenen Vortrages.

untersuchungen gesunder Wirtspflanzen einzuschalten und aus den Unterschieden gegenüber infizierten oder aus Ähnlichkeiten zu bekannten Viren Folgerungen zu ziehen. Es ist wichtig, sich stets über die Vorgänge bei der Präparation und während der Untersuchung klar zu werden, um zu einer richtigen Deutung und Beurteilung der Bilder zu gelangen und nicht, wie leider zu oft, in Spekulationen zu verfallen.

Da die Dicke der Folie, die als Objektträger dient, in der gleichen Größenordnung liegt wie die Dicke der Virusteilchen selbst und auch wie diese eine Eigenabsorption aufweist, bestand anfangs in den Aufnahmen ein so geringer Kontrast, daß die Erkennung der Partikeln und ihrer Umrisse außerordentlich erschwert war. Eine Abhilfe wurde erst durch die Einführung der Schrägbedampfung mit Edelmetallen geschaffen, die es gestattet, die Objekte dreidimensional zu erkennen und dann, wenn der Bedampfungswinkel bekannt ist, aus der Schattenlänge sogar ihre Höhe zu bestimmen, da auf Grund der geradlinigen Ausbreitung des Bedampfungsmaterials einfache geometrische Relationen bestehen. Allerdings ist es auch möglich, daß die Bedampfungsschicht von etwa 5–6 Å einerseits evtl. vorhandene feine Oberflächenstrukturen verdecken, andererseits aber auch solche vortäuschen kann.

Erst in den letzten Jahren konnte nachgewiesen werden, daß auch die Art der Präparation nicht ohne Einfluß auf die Gestalt der untersuchten Virusteilchen bleibt. Früher war es üblich, Preßsäfte aus infizierten Pflanzen nach der für chemische Untersuchungen üblichen Art zu fällen und hochtourig zu zentrifugieren. Jedoch konnte gezeigt werden, daß es durch diese außerordentlich rohe Behandlung bei stäbchenförmigen Viren einmal zu Brüchen der Partikeln, dann aber auch wiederum zu unregelmäßigen Längsaggregationen kommt, die eine exakte Bestimmung von Teilchenlängen unmöglich machen oder zumindest erschweren. Dagegen enthalten Präparate, die schonend und schnell hergestellt werden, wie etwa nach der von Johnson (1951) beschriebenen Exsudatmethode, einen sehr hohen Anteil von Teilchen gleicher Längen. Nach Erkenntnis dieser Tatsachen konnte, vor allen Dingen in den letzten Jahren, festgestellt werden, daß jeder Virusart konstante, wohl definierte Dimensionen ihrer Partikeln zukommen, die auch nach den bisher durchgeführten Untersuchungen für die jeweiligen Varianten dieses Virus gültig sind (Tabelle S. 149). Es ist zu erwarten, daß die Kenntnis dieser Teilchengrößen neben den anderen Eigenschaften eine wertvolle Hilfe bei der Aufstellung einer zukünftigen Virussystematik darstellen kann.

Ein besonderes Interesse wurde in der Virusforschung seit je dem Feinaufbau der Teilchen gewidmet. Durch Röntgenstrukturuntersuchungen am Tabakmosaik-Virus konnte nachgewiesen werden (Franklin 1955), daß einerseits der Proteinanteil schraubenförmig aufgebaut ist, und daß andererseits die Nukleinsäure von ihm umschlossen wird, so daß ein Vergleich mit dem Docht einer Kerze naheliegt. Schramm und Zillig (1955), die den Zerfall der Partikeln auf Grund schwach alkalischer Reaktion verfolgten, gelang es, die Nukleinsäure als Fäden

Teilchengröße verschiedener Viren

Virus	Teilchengröße
Stengelbuntvirus	70 u. $180 \times 20 \text{ m}\mu$ (Paul u. Bode 1955)
Tabakmosaikvirus	$300 \times 15 \text{ m}\mu$ (Williams 1953)
Kartoffel-X-Virus	$515 \times 10 \text{ m}\mu$ (Bode u. Paul 1955)
Kartoffel-Aucuba-Virus	$580 \times 11 \text{ m}\mu$ (Paul u. Bode 1956)
Kartoffel-S-Virus	$652 \times 12 \text{ m}\mu$ (Wetter u. Brandes 1956)
Kartoffel-A-Virus	$740 \times 11 \text{ m}\mu$ (Paul u. Bode 1956)
Kartoffel-Y-Virus	$758 \times 12 \text{ m}\mu$ (Bode u. Paul 1956)
Rüben-Yellows-Virus	$1250 \times < 10 \text{ m}\mu$ (Brandes u. Zimmer 1955)

in solchen Teilchen, die teilweise das Protein verloren hatten, zu photographieren, ja es gelang sogar, an Proteinscheibchen, die in der Aufsicht aufgenommen waren, ein zentrales Loch, das dem Durchmesser der Ribonukleinsäure entspricht, zu zeigen.

Durch Erarbeitung besonderer Fixierungs-, Einbettungs- und Schneidverfahren, ist es gelungen, Dünnschnitte von etwa 0,1 μ Dicke herzustellen. Diese Schnitttechnik hat dazu geführt, daß nicht nur in Säften suspendierte und nachträglich eingetrocknete Teilchen, sondern auch in situ im pflanzlichen Gewebe untersucht werden können. Während eine Erkennung gestreckter Teilchen leicht möglich ist, sind die sphärischen oft schwierig von Mikrosomen und anderen globularen Plasmaeinschlüssen zu unterscheiden und erst durch Vergleich von Präparaten aus gesunden und infizierten Geweben möglich.

Erste erfolgreiche Aufnahmen wurden von Black, Morgan und Wyckoff (1950) sowie von Smith (1954) veröffentlicht, die eine unerwartet hohe Konzentration von Virusteilchen in der Wirtszelle erkennen lassen. Einen nicht unwesentlichen Fortschritt stellen die Untersuchungen ultradünner Mikrotomschnitte durch Tabakblätter, die vom Tabakmosaik-Virus infiziert waren, durch Brandes (1956) dar. Es gelang ihm, auch Schnitte durch Einschlußkörper, X-bodies und Kristalle, zu führen, die eindeutig erkennen lassen, daß auch erstere im wesentlichen aus Virusteilchen bestehen, die regellos gelagert sind, daß aber die Teilchen in letzteren, wie schon nach früheren polarisationsoptischen Untersuchungen zu erwarten war, eine klare Parallellagerung aufweisen. Auch ist in diesen Aufnahmen bei den X-bodies eine vermutlich aus cytoplasmatischen Bestandteilen gebildete membranartige Hülle erkennbar. Während in den Einschlußkörpern das Virus in starker Zusammenballung auftritt, wurden aber auch Zellen beobachtet, in denen die Viruspartikeln in hoher Konzentration über das ganze Zellvolumen verteilt sind. Die Chloroplasten in diesen durch die gelbgrünen Zonen des infizierten Blattes geführten Schnitten sind degeneriert und weisen große Stärkeeinschlüsse auf.

Durch diese Arbeiten sind bereits wesentliche Fortschritte zur Kenntnis der Viren erzielt, die unser bisheriges Wissen erweitern. Künftige

Untersuchungen müssen darauf gerichtet sein, die Aufnahme, Vermehrung und Wanderung der Viren in der Pflanze, dann aber auch im übertragenden Insekt zu klären. Es bestehen in der Übertragung durch Insekten für die einzelnen Viren große Unterschiede, die aus ihren morphologischen und chemophysikalischen Eigenschaften nicht zu erklären sind. Die Bearbeitung dieser Fragen ist bereits von verschiedenen Seiten in Angriff genommen und dürfte, nachdem die Untersuchungen an Pflanzenschnitten die Möglichkeit hierzu gezeigt haben, bald zu weiterer Aufklärung beitragen und einen tieferen Einblick in das Wesen der Viren erlauben.

Literatur

- Black, L. M., C. Morgan and R. W. G. Wyckoff, Visualisation of tobacco mosaic virus within infected cells. *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.* **73**, 119—122, 1950.
- Bode, O., und H. L. Paul, Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Kartoffelviren. I. Vermessungen an Teilchen des Kartoffel-X-Virus. *Biochim. et Biophys. Acta* **16**, 343—345, 1955. — III. Vermessung der Teilchen des Kartoffel-Y-Virus. *Phytopath. Z.* **26**, 1956, im Druck.
- Brandes, J., und K. Zimmer, Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die viröse Vergilbungskrankheit der Rübe (beet yellows). *Phytopath. Z.* **24**, 211—215, 1955.
- , Über das Aussehen und die Verteilung des Tabakmosaikvirus im Blattgewebe. *Phytopath. Z.* **26**, 93—106, 1956.
- Franklin, R. E., Structure of tobacco mosaic virus. *Nature* **175**, 379—381, 1955.
- Johnson, J., Virus particles in various plant species and tissues. *Phytopathology* **41**, 78—93, 1951.
- Paul, H. L., und O. Bode, Elektronenoptische Untersuchungen über Kartoffelviren. II. Vermessung der Teilchen von drei Stämmen des Rattle-Virus. *Phytopath. Z.* **24**, 341—351, 1955. — IV. Vermessung der Teilchen des Kartoffel-A-Virus. *Phytopath. Z.* **26**, 1956, im Druck. — V. Vermessung der Teilchen des Kartoffel-Aucuba-Virus. *Phytopath. Z.* **26**, 1956, im Druck.
- Schramm, G., und W. Zillig, Über die Struktur des Tabakmosaikvirus. IV. Mitteilung. Die Regeneration des nukleinsäure-freien Proteins. *Z. Naturforschg.* **10 b**, 493, 1956.
- Smith, K. M., Some aspects of the behaviour of certain viruses in their hosts, and of their developments in the cell. *Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B.* **142**, 196—207, 1954.
- Wetter, C., und J. Brandes, Untersuchungen über das Kartoffel-S-Virus. *Phytopath. Z.* **26**, 81—92, 1956.
- Williams, R. C., The shapes and sizes of purified viruses as determined by electron microscopy. *Cold Spring Harbour Symposia, Quant. Biol.* **18**, 185—195, 1953.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Angewandte Botanik - Zeitschrift der Vereinigung für angewandte Botanik](#)

Jahr/Year: 1956

Band/Volume: [30](#)

Autor(en)/Author(s): Bode O.

Artikel/Article: [Über Möglichkeiten und Grenzen der Elektronenmikroskopie bei morphologischen Untersuchungen an Pflanzenviren 147-150](#)