

## Literatur

- Brandenburg, E., Eibner, R., und Tostmann, R.: Untersuchungen über die Eisenfleckigkeit-Pfropfenbildung der Kartoffel als bodengebundene Viruskrankheit. Mitt. Biol. Bundesanst. **97**. 1959, 37—51.
- Cadman, C. H.: Potato stem mottle disease in Scotland. Europ. Potato J. **2**. 1959, 165—175.
- Köhler, E.: Über eine reversible, durch die Jahreszeit induzierte Virulenzänderung beim Tabak-Rattle-Virus.

Nachrichtenbl. Deutsch. Pflanzenschutzdienst (Braunschweig) **8**. 1956, 93—94.

- Lihnell, D.: Investigations on spraing. Proc. 3rd Conf. Potato Virus Dis. Lisse-Wageningen 1957. Wageningen 1958, p. 184—188.
- Noordam, D.: Waardplanten en toetsplanten van het ratelvirus van de tabak. Tijdschr. Plantenziekt. **62**. 1956, 219—225.

Eingegangen am 12. Januar 1960

DK 632.38.093.38

# Bedeutung und Technik der Reindarstellung von Pflanzenviren

Von Hans-Ludwig Paul

Biologische Bundesanstalt, Institut für Landwirtschaftliche Virusforschung, Braunschweig

Die Erforschung einer Pflanzenvirose beginnt im allgemeinen mit dem Studium der Symptomatologie sowie der Übertragungsmöglichkeiten und des Wirtspflanzenkreises ihres Erregers. Läßt sich die Virose mechanisch durch Einreiben geeigneter Organe mit dem Virus auf eine Pflanze übertragen, dann können auch die Inaktivierungstemperatur, die Lebensdauer und der Verdünnungsendpunkt des Erregers im Preßsaft einer Wirtspflanze festgestellt werden. Bei derartigen Versuchen wird kein gereinigtes, konzentriertes Präparat des betreffenden Virus benötigt. Sollen aber zu seiner näheren Beschreibung und Identifizierung chemische und physikalische Untersuchungen angeschlossen werden, dann ist eine Reindarstellung und Konzentrierung unerlässlich. Den erforderlichen Grad der Reinheit bestimmt dabei die Art der geplanten Versuche. Bei Analysen der Aminosäurezusammensetzung o. ä. muß er möglichst hoch getrieben werden, während ein nur teilweises Säubern des Virus von Wirtspflanzensubstanzen für manche anderen Zwecke, z. B. für die Herstellung von Antisera, ausreichen kann. Da somit für viele Versuche gereinigte und konzentrierte Viruspräparate notwendig sind, ist die Reindarstellung ein zentrales Problem. Das macht es verständlich, daß die leicht und in größeren Mengen in reiner Form zu gewinnenden Viren, wie etwa das Tabakmosaikvirus, das Gelbmosaikvirus der Wasserrübe oder das Südliche Bohnenmosaikvirus, auch die am besten untersuchten sind, während diejenigen, deren Reindarstellung bislang nicht gelungen ist, meist nur in den eingangs erwähnten Punkten erforscht sind.

Soweit bisher bekannt, stellen die phytopathogenen Viren reine Ribonukleoproteide dar. Der Träger des genetischen Code, der zur Vermehrung des Virus in einer Wirtszelle nötig ist, dürfte die Ribonukleinsäure sein, da sie allein genügt, um eine Infektion zu erzeugen. Dem Protein wird nach dem Stande unseres heutigen Wissens lediglich eine Schutzfunktion zugeschrieben. Wie oftmals bei biologischem Material, sind die meisten Viren wärmeempfindlich und verlieren ihre Infektiosität auch bei längerem Aufbewahren und bei groben chemischen oder physikalischen Eingriffen. Die Darstellungsmethoden müssen diese Faktoren berücksichtigen, aber doch ermöglichen, die Viren von den oft recht ähnlichen pflanzeigenen Substanzen zu trennen. Ein Reinigungsschema, das immer in gleicher Weise angewendet werden kann, gibt es nicht; in jedem Falle bestimmen Virus und Wirtspflanze die Einzelheiten der Verarbeitung. Es sollen deswegen auch nicht die zahlreichen Präparationsanleitungen für die bislang erfolgreich behandelten Viren aufgeführt (hierfür s. z. B. die neue Zusammenstellung von Steere, 1959), sondern nur allgemeine Anhaltspunkte über die wesentlichen, fast stets notwendigen Schritte gegeben werden. Daran seien dann einige kritische Bemerkungen über den erreichbaren Grad der Reinheit angeschlossen.

Schon vor der Präparation sind, wenn es das Material erlaubt, folgende Punkte zu beachten: a) Es sollen möglichst nur solche Wirtspflanzen gewählt werden, in denen sich das Virus gut vermehrt und eine hohe Konzentration erreicht; b) die Wirtspflanzen sollen leicht zu kultivieren sein, rasch wachsen und wenig holzige oder faserige Gewebe enthalten; c) die Wirtspflanzen sollen möglichst keine inaktivierenden Substanzen (z. B. Gerbstoffe), Schleime, melaninbildende Stoffe oder virusähnliche Nukleoproteide enthalten. Lassen sich diese Forderungen nicht erfüllen, dann wird die Präparation erschwert, und es müssen besondere Maßnahmen ergriffen werden, die eine Reindarstellung ermöglichen oder zu große Verluste an Virus verhüten. Die Reinigung selbst beginnt mit dem Auspressen oder Homogenisieren des Wirtspflanzengewebes (meist Blätter), denn das Virus läßt sich nur durch Zerstören der Zellen aus dem Gewebe herauslösen. Beim Auspressen des Gewebes ist oft ein vorheriges Einfrieren und Tauen vorteilhaft, denn hierdurch kann nicht nur der Saft leichter gewonnen werden, sondern es werden zugleich mancherlei pflanzeigene Stoffe zerstört und lassen sich später einfacher vom Virus abtrennen. Es ist aber zu bedenken, daß manche Viren dadurch ebenfalls geschädigt werden oder daß u. U. die Virusausbeute verringert wird. Beim Homogenisieren ist hingegen frisches Gewebe vorteilhafter. Welches von beiden Verfahren zu bevorzugen ist, hängt außer von der Virus-Wirt-Kombination auch von der Menge des zu verarbeitenden Materials ab.

Im Preßsaft bzw. Homogenisat befindet sich das Virus nicht mehr in seiner natürlichen Umgebung, sondern ist zahlreichen schädigenden Einflüssen ausgesetzt. Zwar gibt es einige robuste Virusarten, denen diese nicht abträglich sind, doch die Mehrzahl der Viren ist labiler und wird bald inaktiviert. Aus diesem Grunde empfiehlt es sich, den Preßsaft schnell und, wenn nötig, bei Temperaturen unter 10°C zu verarbeiten. Zusätze von Pufferlösungen, Enzymblockierenden Stoffen oder Antioxydantien wirken häufig günstig, indem sie die Reinigung erleichtern oder die Beständigkeit des Virus im Saft erhöhen.

Der trübe, meist grüne Saft muß zuerst von groben Verunreinigungen befreit werden. Das kann durch Zentrifugation oder Filtration geschehen. Anschließend werden die grünen Farbstoffe und zugleich ein Teil der Eiweiße der Wirtspflanzen entfernt. Am einfachsten gelingt das bei temperaturstabilen Viren (z. B. Tabakmosaikvirus, Rattlevirus). Der virushaltige Saft braucht lediglich im Wasserbad für einige Minuten auf etwa 60°C erhitzt zu werden, dann koagulieren die Farbträger und ein Teil der Eiweißstoffe und flocken aus. Nach dem Abkühlen wird das Präzipitat abzentrifugiert. Der bräunliche Überstand enthält das Virus, während das Sediment verworfen wird. Bei temperaturlabilen Viren hat sich neben anderen Verfahren besonders das Aus-

schütteln des Saftes mit wasserunlöslichen organischen Flüssigkeiten (z. B. Chloroform, Butanol, Pentanol, Äther u. ä. rein oder in Gemischen wie Chloroform-Butanol) bewahrt. Die Farbstoffe lösen sich in der organischen Phase, das Virus bleibt in der wäßrigen, und die Eiweiße flocken z. T. aus. Durch Zentrifugation können die Phasen und das denaturierte Eiweiß voneinander getrennt werden. Außer dem Virus enthält der nunmehr vorgereinigte Saft noch Salze, Eiweiße, bräunliche oder grünliche Farbstoffe und — nach dem Ausschütteln — auch Reste der organischen Flüssigkeiten. Sofern es die Haltbarkeit des Virus nicht verbietet, kann eine „Alterung“ des Saftes abgeschlossen werden. Er wird zu diesem Zweck  $1/2$ —1 Tag bei Zimmertemperatur oder im Kühlraum stehengelassen. Labile Pflanzenstoffe präzipitieren währenddessen und können abzentrifugiert werden. Obgleich diese ersten Schritte der Präparation einfach erscheinen, so können u. U. gerade sie große Schwierigkeiten bereiten. Für manche Viren müssen besondere Verfahren ausgearbeitet werden, da sie offenbar leicht in den denaturierten Substanzen haften und beim Zentrifugieren im Sediment verlorengehen. Die Verwendung spezieller Organika und bestimmter pH-Bereiche beim Ausschütteln kann dann zu besseren Ergebnissen führen. Auch die Dauer der Vorreinigung spielt eine Rolle. Verluste an infektiösem Material lassen sich allerdings niemals vermeiden.

Das in dem vorgereinigten Saft suspendierte Virus wird jetzt von niedermolekularen Stoffen und restlichem Eiweiß befreit und zugleich konzentriert. Hierfür stehen im Prinzip 2 Methoden zur Verfügung: a) die chemischen und b) die physikalischen. Von den chemischen Verfahren wird das Fällen des Virus durch Aussalzen bevorzugt, da es die Infektiosität im allgemeinen kaum mindert, trotzdem aber Pflanzeneiweiße unlöslich werden läßt. Zu dieser bewährten und schon seit langer Zeit benutzten Prozedur benötigt man ein Salz, dessen Ionen stark fällend wirken und das außerdem gut löslich ist, damit hohe Konzentrationen gewählt werden können. Diese Eigenschaften besitzt z. B. Ammoniumsulfat. Man fügt dem vorgereinigten Saft eine bestimmte Menge (meist  $1/2$  Vol.) gesättigter Ammoniumsulfatlösung zu und wartet ab, bis sich ein Präzipitat bildet, das abzentrifugiert wird. Der klare, aber gefärbte Überstand wird verworfen. Das Sediment, das das Virus enthält, wird in einer kleinen Menge Pufferlösung ( $1/2$ — $1/10$  des Saftvol.) aufgenommen, wobei sich das Virus löst<sup>1)</sup>, während die denaturierten Eiweiße ungelöst bleiben. Eine Zentrifugation trennt diese sodann von der Virususpension. Das Virus kann erneut mit Ammoniumsulfat gefällt und die Prozedur mehrmals wiederholt werden. Auf diese Art lassen sich schrittweise eine Reinigung und der gewünschte Grad der Konzentrierung erzielen. Die letzten Reste von Ammoniumsulfat werden durch Dialyse aus dem gereinigten Präparat entfernt. Außer diesem klassischen Verfahren mit Ammoniumsulfat gibt es für bestimmte Viren noch andere Fällungsmethoden, z. B. Fällung am isoelektrischen Punkt, mit Azeton, Alkohol, Schwermetallionen oder anderen Salzen. Diese Varianten haben allerdings kaum noch Bedeutung.

Das wesentlichste physikalische Verfahren, das heutzutage eine immer weitere Verbreitung findet, macht sich den Tatbestand zunutze, daß die Pflanzenviren Riesmoleküle<sup>2)</sup> mit einem Molekulargewicht von etwa 4 bis  $100 \times 10^6$  sind. Diese Partikeln können von niedermolekularen durch Zentrifugation aus dem vorgereinigten Saft abgeschleudert werden. Da die Zentrifugalkräfte normaler Zentrifugen hierfür nicht ausreichen,

müssen besonders hochtourige Geräte benutzt werden, die Fliehkraftfelder in der Größenordnung von  $10^5$  mal Erdschwerebeschleunigung erzeugen können. Unter ihrem Einfluß sedimentieren die Viren und natürlich auch hochmolekulare Pflanzeneiweiße. Während aber die empfindlichen Eiweiße durch die bei der Behandlung auftretenden großen Kräfte teilweise unlöslich werden, widersteht das Virus diesen meistens und läßt sich aus dem Sediment wieder herauslösen. Durch Verwendung einer entsprechenden Menge Lösungsmittel kann der gewünschte Grad der Konzentrierung erreicht werden, jedoch sollten zunächst keine zu hohen Konzentrationen gewählt werden, damit die Reinigung nicht durch die erhöhte Viskosität erschwert wird. Eine nachfolgende Zentrifugation bei niedriger Tourenzahl trennt das Virus vom Unlöslichen. Auch bei diesem Verfahren wird die Prozedur mehrfach wiederholt und dadurch der Grad der Reinheit schrittweise erhöht. Die Konzentrierung kann nach dem letzten Sedimentieren in der Ultrazentrifuge beliebig gewählt werden.

Eine besondere Art der Zentrifugation, die Dichtegradienten-Zentrifugation, hat seit einigen Jahren auch in der Virusforschung (B r a k k e, 1951) Bedeutung erlangt. Bei ihr werden die Zentrifugenröhrchen mit einer wäßrigen Lösung von Zucker, Glycerin oder Eiweiß gefüllt, deren Dichte von unten nach oben stetig abnimmt. Diese Lösung, die einen Dichtegradienten besitzt, wird mit der Viruslösung überschichtet und das Virus durch den Gradienten geschleudert. Die einzelnen Teilchen sedimentieren so lange, bis sie eine Zone des Gradienten erreicht haben, dessen Dichte gleich der eigenen ist. Bei genügend langer Dauer der Zentrifugation sammeln sich Teilchen gleicher Dichte in einer bestimmten Zone an (Gleichgewichtszustand), bei kürzerer Dauer spielt außer der Dichte auch noch die Schnelligkeit der Sedimentation eine Rolle. Auf diese Weise haben sich Viren von virusähnlichen Proteinen trennen lassen. Mit Hilfe der besonderen Dichtegradienten-Zentrifugation von M e s e l s o n et al. (1957) haben sich geringfügige Dichtedifferenzen bei verschiedenen Stämmen des Tabakmosaikvirus (S i e g e l und H u d s o n, 1959) und sogar Verschiedenheiten innerhalb der Ribonukleinsäure enthaltenden Teilchen des Gelbmosaikvirus der Wasserrübe (M a t t h e w s, 1959) nachweisen lassen.

Eine weitere physikalische Reinigungsmethode befindet sich der präparativen Elektrophorese bzw. Dichtegradienten-Elektrophorese (B r a k k e, 1955). Hierbei werden die Teilchen nach der Größe ihrer elektrischen Ladungen aufgetrennt. Beide Verfahren wurden jedoch nur in besonderen Fällen zur Säuberung von Pflanzenviren angewendet. Weitere spezielle moderne Techniken, wie die Reinigung mit Hilfe von Ionenaustauschern oder mittels Papierchromatographie, seien nur erwähnt.

Nachdem die allgemeinen Schritte der Reinigungsverfahren genannt worden sind, bleibt die Frage nach ihrer Wirksamkeit zu beantworten. Auch hier läßt sich keine allgemein verbindliche Aussage machen, vielmehr bedingt die Virus-Wirt-Kombination Ausbeute und erreichbaren Grad der Reinheit. Die größten Verluste an Virusmaterial dürften bei seiner Extraktion aus dem Gewebe entstehen. Da es aber bislang kein Mittel gibt, diesen Verlust sicher zu messen, kann nichts über seine Größe ausgesagt werden. Der nächste Schritt, das Vorreinigen des Pflanzensaftes z. B. mittels eines Gemisches von Chloroform und Butanol (1:1), kann ebenfalls eine starke Minderung der Virusmenge verursachen. Während in eigenen Versuchen verschiedene Kugelviren (Tabakringfleckenvirus, Gelbmosaikvirus der Wasserrübe, Südliches Bohnenmosaikvirus) nur geringe Einbußen erlitten, konnte die Mengenminderung beim Kartoffel-X-Virus bis zu 50% betragen und bei anderen Viren (z. B. Kartoffel-Y-Virus) noch höher sein (Verluste spektralphotometrisch gemessen). Es muß des-

<sup>1)</sup> Der Einfachheit halber wird der Ausdruck „lösen“ benutzt. Streng genommen müßte jedoch von resuspendieren gesprochen werden. Auch die Viruslösungen sind Suspensionen.

<sup>2)</sup> Molekül im Sinne der Proteinchemie.

wegen gerade der Vorreinigung Aufmerksamkeit geschenkt werden, damit sie möglichst verlustarm gehalten werden kann. Vergleicht man die weiteren chemischen und physikalischen Reinigungsmethoden, so dürfen letztere als die schonenderen und verlustärmeren bezeichnet werden. Neuerdings hat sich deswegen auch der Gebrauch gekühlter, hochtouriger Zentrifugen allgemein eingeführt. Allerdings kann eine Präparation mit Hilfe der Ultrazentrifuge allein den Nachteil haben, daß sie gewisse Fremdstoffe (z. B. Deoxyribonukleinsäure, Ribonukleasen, Zellphosphorproteide) nicht genügend beseitigt (Pirie, 1956). Stören auch geringfügige Verunreinigungen dieser Art, dann sollen nach Pirie Kombinationen der Reinigung durch Zentrifugieren mit einer Fällung mit Ammoniumsulfat oder Inkubation mit Zitrat bzw. Azetat günstig wirken. Der höhere Grad der Reinheit wird allerdings oft durch einen größeren Verlust an aktivem Virus erkauft. Bezüglich der normalen Verunreinigungen mit Eiweiß ist dagegen die Reinigung durch Zentrifugieren derjenigen durch Ammoniumsulfat überlegen. Ammoniumsulfatfällungen allein genügen meistens nicht, sondern müssen mit Inkubationen mit Enzymen, Fällungen am isoelektrischen Punkt oder Zentrifugationen gekoppelt werden (Steeere, 1959).

Ob eine vollständige Reinigung des Virus von allen Fremdstoffen möglich ist, muß bezweifelt werden, selbst wenn es von einigen Viren schon sehr hoch gereinigte, ja kristallisierte Präparate gibt. Es ist außerdem recht schwierig zu entscheiden, ob ein in Spuren vorkommender Stoff eine Verunreinigung darstellt oder Bestandteil des Virus ist. Überraschungen dieser Art zeigten Untersuchungen über das Vorkommen von Cu, Mg und Ca im Tabakmosaikvirus (Loring und Waritz, 1957). Noch schwieriger als die chemische Reinheit ist bei gestreckten Virusformen die physikalische Homogenität zu erreichen, da diese Viren bei der Präparation leicht aggregieren oder zerbrechen. Unerreicht ist bislang die Forderung nach einer biologischen Homogenität des Materials geblieben, denn hierzu müßten alle Teilchen infektiös und genetisch völlig identisch sein. Daß indes niemals alle Partikeln infektiös sind, steht nach zahlreichen Untersuchungen verschiedener Autoren fest. In welchem Prozentsatz die aktiven Teilchen vorhanden sind, hat sich bisher nur grob schätzen lassen. Über die

Identität aller Teilchen in struktureller und genetischer Hinsicht ist dagegen nichts Sicheres bekannt, da es noch keine Verfahren zur Prüfung dieser Frage gibt. Es muß somit festgestellt werden, daß bei der Reindarstellung von Pflanzenviren das Endprodukt zwar im besten Falle frei von Verunreinigungen und physikalisch homogen sein kann, daß aber die strukturelle und biologische Identität kaum zu erreichen ist. In den meisten Fällen werden sogar die beiden ersten Forderungen nur teilweise erfüllbar sein. Glücklicherweise brauchen die Ansprüche an die Reinheit und Homogenität eines Viruspräparates meist nicht so außerordentlich hoch getrieben zu werden, denn es konnte — die Literatur beweist es — auch mit den normalen Reinpräparaten eine Fülle von Erkenntnissen gewonnen werden, wenn dabei die durch das Präparat gesteckten Grenzen beachtet wurden.

#### Summary

Studies on the physical and chemical properties of plant viruses can be made with purified virus preparations only. A general survey of the purification techniques is given and some critical remarks on the purity and homogeneity of the preparations are made.

#### Literatur

- Brakke, M. K.: Density gradient centrifugation a new separation technique. *J. Amer. chem. Soc.* **73**. 1951, 1847—1848.  
 Brakke, M. K.: Zone electrophoresis of dyes, proteins, and viruses in density gradient columns of sucrose solutions. *Arch. Biochem. Biophys.* **55**. 1955, 175—190.  
 Loring, H. S., and Waritz, R. S.: Occurrence of iron, copper, calcium, and magnesium in tobacco mosaic virus. *Science* **125**. 1957, 646—648.  
 Meselson, M., Stahl, F. W., and Vinograd, J.: Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **43**. 1957, 581—588.  
 Matthews, R. E. F.: Turnip yellow mosaic virus nucleoprotein particles with differing biological and physical properties. *Nature (London)* **184**. 1959, 530—531.  
 Pirie, N. W.: Some components of tobacco mosaic virus preparations made in different ways. *Biochem. J.* **63**. 1956, 316—325.  
 Siegel, A., and Hudson, W.: Equilibrium centrifugation of two strains of tobacco mosaic virus in density gradients. *Biochim. biophys. Acta* **34**. 1959, 254—255.  
 Steere, R. L.: The purification of plant viruses. *Advances Virus Res.* **6**. 1959, 1—70 (dort auch weitere Literatur).

Eingegangen am 7. November 1959

DK 632.951.2.024.2 DDT:638.158

## Beitrag zur Frage der Bienenschädlichkeit des Dichlordiphenyltrichloräthan-Kaltnebelbelages

Von Fritz Lukoschus, Lehr- und Versuchsanstalt für Bienenzucht, Bad Segeberg, und Ernst Stein, Biologische Bundesanstalt, Institut für Getreide-, Ölfrucht- und Futterpflanzenkrankheiten, Kiel-Kitzeberg

Die Kohlschotenmücke, *Dasyneura brassicae* Winn., ist trotz ihrer großen wirtschaftlichen Bedeutung bisher nur schwer durch Bekämpfungsmaßnahmen zu erfassen, da sie zu einem Zeitpunkt erscheint, an dem die zu schützenden Ölfrüchte bereits voll erblüht sind. Zur Bekämpfung können daher nur bienenunschädliche Präparate herangezogen werden. An diese Mittel ist gleichzeitig die Forderung einer möglichst langen Wirkungs-dauer zu stellen, da sich Flug und Eiablage der Kohlschotenmücke über eine längere Zeit erstrecken. Diese letztgenannte Bedingung wird in Verbindung mit einer ausreichenden Wirksamkeit gegen Gallmücken besonders von dem Dichlordiphenyltrichloräthan-Kaltnebel erfüllt, wie gute Bekämpfungserfolge gegen die Weizen-gallmücke gezeigt haben (Waede 1957). Es bestand daher ein Interesse festzustellen, ob dieses Präparat

bienenverträglich ist, so daß es auch in blühenden Rapsbeständen eingesetzt werden kann.

Nach früheren Untersuchungen mit Spritz- und Stäubemitteln gilt Dichlordiphenyltrichloräthan als bienenschädliches Insektizid mit negativem Temperaturkoeffizienten der Wirkung (Häfliger 1948, Kaeser 1948). Es liegen aber bereits erste Erfahrungen vor, nach denen ein Dichlordiphenyltrichloräthan-Kaltnebelbelag unter bestimmten Bedingungen bienenverträglich ist. Nach Goetze (1954) traten bei einer Kirschfruchtfliegenbekämpfung im Juni 1954 keine Bienenschäden auf, obwohl die Trachtflora wenigstens zum Teil mit dem Nebel in Berührung kam.

Zur weiteren Untersuchung der Bienenverträglichkeit eines Dichlordiphenyltrichloräthan-Kaltnebels wurden im Rahmen von Bekämpfungsversuchen gegen die Kohl-