

Isolierung und Morphologische Charakterisierung des Kartoffelblattrollvirus (PLRV)

Isolation and Morphological Characterization of the Potato Leafroll Virus (PLRV)

J. Blessing

Virologische Abteilung des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar, und

S. Sarkar

Institut für Phytomedizin der Universität Hohenheim, D-7000 Stuttgart 70, Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **36 c**, 884–887 (1981); received May 23, 1979/May 18, 1981

Potato Virus, Icosahedron, Electron Microscopy

In spite of its very low concentration, the potato leafroll virus (PLRV) can be enriched from leaf-homogenates of the infected host plant *Physalis floridana* by a series of separation steps and purified by ultracentrifugation through layers of cesium chloride of defined density. Under the present experimental conditions the virus accumulates as an invisible band in a region where the density of CsCl is $1.39 \pm 0.01 \text{ g/cm}^3$. In negatively stained preparations, the virions show a diameter of 23 nm and some morphological criteria indicate an icosahedral symmetry.

Einleitung

Die Blattrollkrankheit der Kartoffel war schon am Anfang dieses Jahrhunderts als eine Virose erkannt ([1] siehe Zusammenfassung bei [2]), jedoch konnte das Virus erst in den 60er Jahren von Peters elektronenmikroskopisch demonstriert werden [3]. Peters isolierte die Viruspartikel (Virionen) aus der grünen Pfirsichblattlaus (*Myzus persicae* Sulz.), dem natürlichen Vektor dieses Virus. Es gelang dann Kojima *et al.* (1969) [4] das PLRV, trotz seiner sehr niedrigen Konzentration, aus infizierten Wirtspflanzen zu extrahieren. Zur Gewinnung von PLRV wurden die Präparate in Saccharose-Dichtegradienten zentrifugiert; eine Methode, die auch früher von Day und Zaitlin [5] erfolgreich verwendet wurde, um dem Erreger der Blattrollkrankheit auf die Spur zu kommen. Day und Zaitlin [5] konnten zwar den infektiösen Charakter der mit Saccharose gereinigten Extrakte nachweisen, waren jedoch nicht in der Lage, die Virionen für eine zweifelsfreie elektronenmikroskopische Darstellung ausreichend zu konzentrieren.

Nach unseren Erfahrungen kann das PLRV durch den Saccharose-Gradienten zudem nicht ausreichend von Proteinen und anderen Inhaltsstoffen der Wirtspflanze befreit werden. Für exakte chemische und strukturelle Untersuchungen des Virus war es

daher notwendig, eine Methode auszuarbeiten, welche die Gewinnung von sauberem Virus in ausreichenden Mengen ermöglicht. In dieser Arbeit berichten wir über einen Cäsiumchlorid-Stufengradienten der es ermöglichte hochkonzentrierte und reine Viruspräparate darzustellen. Außerdem konnten wir eine Reihe von morphologischen Charakteristika der Virionen ermitteln, die darauf hinweisen, daß die PLRV-Partikel eine Ikosaeder Struktur besitzen.

Material und Methoden

Vermehrung und Reinigung der Viren

Kartoffelblattrollvirus (PLRV Isolat Nr. 4) wurde in *Physalis floridana* Rydb. Pflanzen vermehrt [7]. Blätter und junge Sprossen wurden in 0,1 M Phosphatpuffer (NKP – Natrium-Kalium-Phosphat nach Sörensen) pH 7,4 unter Zusatz von 0,1% Natrium-dithionit und 10^{-3} M β -Mercaptoäthanol bei 0–4 °C homogenisiert [6]. Für die Zerkleinerung von gefrorenen Blättern erwies sich ein elektrisch betriebener Fleischwolf als sehr geeignet. Für frisches Material ist ein Mixer (Atomix, Waring Blender, u. ä.) jedoch eher zu empfehlen. Das Verhältnis zwischen Frischgewicht des Pflanzenmaterials und Volumen der Pufferlösung soll nicht zu klein sein, sondern etwa 1:4 oder 1:5 betragen. Die Behandlung mit *n*-Butanol und Chloroform soll möglichst in der Kälte erfolgen, obwohl eine kurzfristige Erhöhung der Temperatur der Emulsion auf ca. 15 °C keine Nachteile

Sonderdruckanforderungen an Dr. J. Blessing, Abteilung Virologie, Medizinisches Landesuntersuchungsamt, Wiederholdstr. 15, D-7000 Stuttgart 1.

0341-0382/81/0900-0884 \$ 01.00/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

auf die Virusausschüttung zu haben scheint. Bei der Fällung mit Polyäthylenglykol (PEG 6000) kann die Konzentration von NaCl von 1,0 M auf 0,1 M reduziert werden. Die PEG-Lösung soll vorgekühlt sein und eine zu große lokale PEG-Konzentration soll beim Mischen mit dem Pflanzenextrakt vermieden werden. Die Fällung des Virus kann zweckmäßigerweise über Nacht im Kühllabor erfolgen. Das mit einem Überschuß an Pflanzenproteinen gefällte Virus geht wieder in Suspension, wenn das im Sediment verbliebene PEG ausreichend mit Pufferlösung (z. B. 0,05 M Phosphatpuffer, pH 6,5) verdünnt wird. Daher soll das Sediment mehrmals mit steigenden Puffermengen extrahiert werden, wobei im ersten Schritt sehr wenig Pufferlösung verwendet werden soll, um einerseits einen Teil des PEG zu entfernen und andererseits das Virus noch im Sediment zurückzuhalten.

CsCl-Dichtegradienten. Die Anfertigung des Gradienten ist in Abb. 1 dargestellt. Zentrifugiert wurde 5 Stunden lang im SW 65- oder SW 50 Rotor der präparativen Spinco Ultrazentrifuge bei einer Umdrehungszahl von 45000 rpm. Da zu tiefe Temperaturen Kristallbildungen im höher konzentrierten Bereich der CsCl-Lösung fördern, wurde bei einer Rotortemperatur von 6 °C gefahren. Nach dem Lauf wurden die Röhrchen am Boden perforiert und das Material in Portionen zu 5–6 Tropfen gesammelt. Zur Entfernung von CsCl wurden die Proben 24 Stunden lang gegen 0,05 M NKP (pH 6,5) bei 4 °C dialysiert. Die Dialysate wurden für 1,5 Std. bei 35000 rpm in einem 40er Festwinkelrotor in der Spinco Ultrazentrifuge zentrifugiert. Die Sedimente wurden in jeweils 0,2 ml NKP von pH 6,5 aufgenommen und elektronenmikroskopisch auf ihren Virusgehalt geprüft. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß es möglich ist, das Virus in den Dialysaten auch ohne vorherige Konzentration durch Ultrazentrifugation elektronenmikroskopisch zu identifizieren.

Präparation der Proben für elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für *Negativkontrastierungen* wurde jeweils ein Tropfen aus den Proben entnommen und auf ein Formvar-beschichtetes und kohlebedampftes Kupfernetzchen aufgebracht. Die Flüssigkeit wurde nach 1,5 min mit Filtrierpapier abgesaugt und das Material mit 1 Tropfen 2-prozentiger Phosphorwol-

framsäure (PWS) kontrastiert. Der pH-Wert der PWS-Lösung wurde vorher mit 1 N KOH auf 6,1 eingestellt.

Gefriertrocknung. Entsprechend dem von Frank und Nermut angegebenen Verfahren [8] wurden Virussuspensionen für die Gefriertrocknung auf ein mit Pioloform und Kohle befilmtes Kupfernetzchen aufgetropft und nach einer Adsorptionszeit von 1 Minute die Flüssigkeit bis auf einen kleinen Rest abgezogen. Anschließend wurde 2mal mit je 1 Tropfen aq. dest. gewaschen und zuletzt nur bis zum restlichen Verbleiben einer dünnen Flüssigkeitsschicht abgesaugt.

Die Probe wurde anschließend durch Eintauchen in unterkühlten Stickstoff eingefroren und dann auf den auf -150 °C vorgekühlten Objektisch einer

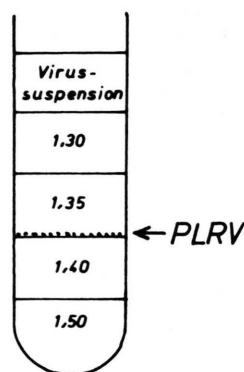


Abb. 1. Cäsiumchlorid Stufengradient. Die verschiedenen Dichtestufen haben jeweils ein Volumen von 1 ml. Die oberste Stufe ($\rho = 1,30 \text{ g/cm}^3$) wurde mit 1 cm³ Virussuspension überschichtet.

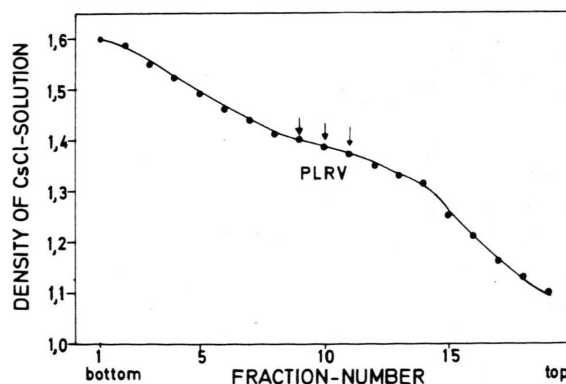


Abb. 2. Position des PLRV-Virus nach der Zentrifugation in einem CsCl-Dichtegradienten. SW 50 Rotor, 45000 rpm, 6 °C, 5 Std.

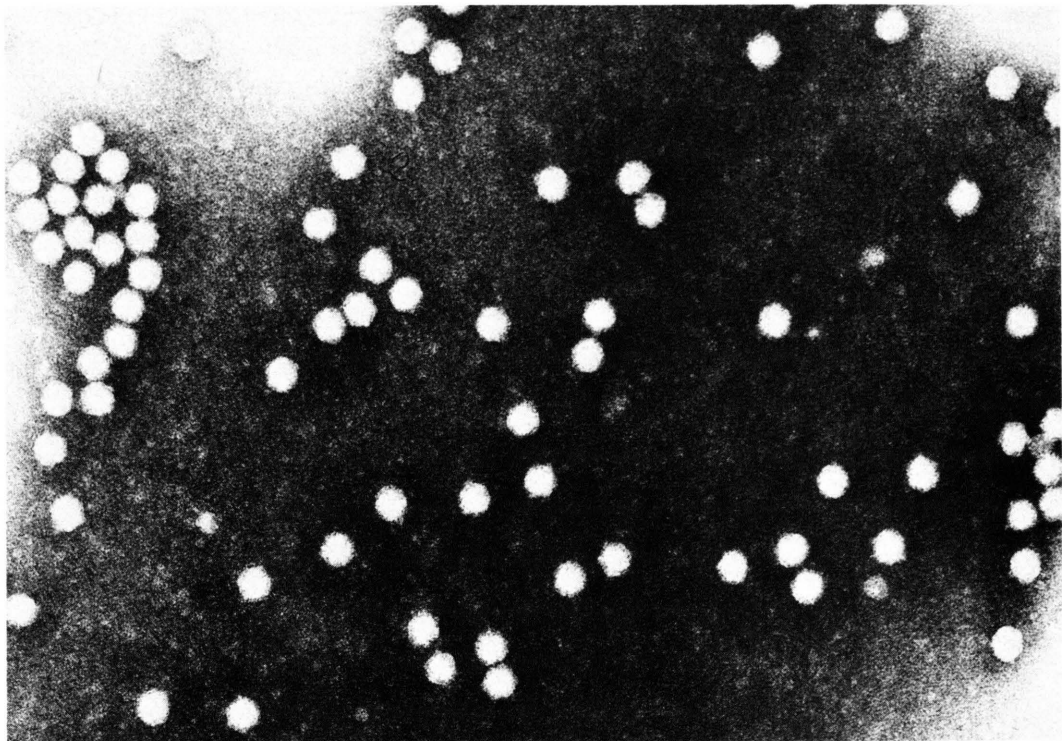


Abb. 3. Elektronenmikroskopische Aufnahme von PLRV aus dem Dichtebereich $\rho = 1,39 \text{ g/cm}^3$ des CsCl Stufengradienten. Die Viren wurden mit 2% PWS pH 6,1 kontrastiert. $\times 120000$.

Balzers Gefrierätzanlage (BA 500 M) aufgebracht. Nach Anlegen des Vakuums wurde die Tischtemperatur auf -82°C erhöht und der Arm des Mikrotommessers auf -150°C gebracht. Bei dieser Temperaturdifferenz wurde 30 Minuten getrocknet und anschließend eine Simultanschrägbedampfung mit C/Pt im Winkel von 45°C durchgeführt. Die Virionen wurden dann in einem Siemens Elmiskop IA auf ihre strukturellen Merkmale hin untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

Durch die dem Dichtegradienten vorausgehenden Trennungsschritte wurde eine partielle Anreicherung des Virus erzielt. Die Reinigung des Materials mit Hilfe des CsCl-Gradienten lieferte eine Ausbeute von ca. 0,5 ml Virussuspension pro Röhrchen. Unter Anwendung eines Schwingrotors mit 3 bzw. 6 Gehängepositionen lassen sich somit etwa 1,5 bis 3,0 ml hochgereinigte Virussuspension pro Lauf gewinnen. Nach vorläufigen Schätzungen beträgt die Anzahl der Partikel im Mittel 5×10^{12} Viren pro ml Virussuspension.

Der Stufengradient, wie er in Abb. 1 dargestellt ist, hat sich für die Reinigung von PLRV als sehr geeignet erwiesen. Die Zentrifugationszeit konnte gegenüber einer Gleichgewichtszentrifugation wesentlich kürzer gehalten werden. Schon nach 5 Stunden bildet das Virus eine ziemlich scharfe, makroskopisch nicht sichtbare Bande an der Grenze der Dichtestufen $\rho = 1,35 \text{ g/cm}^3$ und $1,40 \text{ g/cm}^3$. An die-

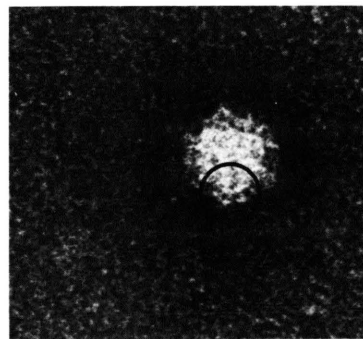


Abb. 4. Ein Capsomer an der Ecke ist von 5 Capsomeren umgeben (Kreis). Negativ-Kontrastverfahren, 2% PWS pH 6,1; $\times 400000$.

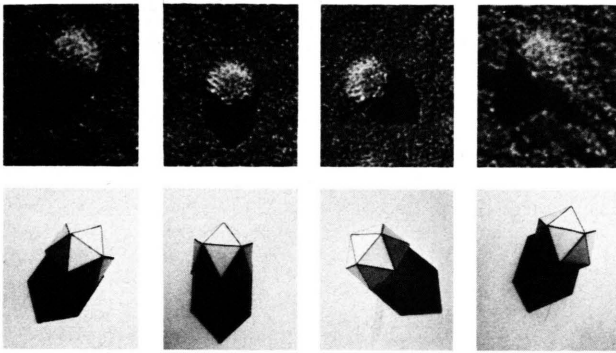


Abb. 5. Durch Gefriertrocknung und 45 °C/Pt Schrägbedampfung dargestellte Viruspartikel. Auf der unteren Zeile sind Photographien eines Icosaeders dargestellt. Die Schattenformen der Virionen und des Icosaeders stimmen weitgehend überein.

tikel eindeutig zu ermitteln. Als aufschlußreicherer Detail der Substruktur des Viruscapsids ließen sich jedoch an einem Partikel die strukturellen Charakteristika eines Pentons zur Darstellung bringen (vgl. Abb. 4). Da die Nachbarschaftsbeziehungen dieses Pentons zu den angrenzenden Capsidbereichen nicht erkennbar sind, können hieraus keine exakten Rückschlüsse auf die Symmetrieverhältnisse der Partikeloberfläche abgeleitet werden. Der eindeutig hexagonale Umriß der Viruspartikel nach Negativkontrastierung und die Schattenform der Partikel nach Gefriertrocknung und Schrägbedampfung deuten jedoch darauf hin, daß die dreidimensionale Struktur der PLRV-Capside eine Icosaederform aufweist.

Danksagung

Wir danken Herrn Dr. H. Frank für die Durchführung der Gefriertrocknung und für seine hilfreiche Diskussion bei der Beurteilung der erzielten Ergebnisse. Frau G. Riedle, Frau R. Kraus und Fräulein R. Holder danken wir für ausgezeichnete technische Mitarbeit.

ser Stelle beträgt die Dichte auf Grund von Refraktometermessungen $\rho = 1,39 \pm 0,01 \text{ g/cm}^3$ (Abb. 2).

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Viren zeigten Partikel mit einem Durchmesser von 230 Å (Abb. 3). Im Negativkontrastverfahren gelang es nicht, die Oberflächensymmetrie der Par-

- [1] H. M. Quanjer, Meded. Landbouwhoogeschool Wageningen (Holland) **10**, 1–138 (1916).
- [2] O. Bode, Angew. Bot. **36**, 86–116 (1962).
- [3] D. Peters, Virology **26**, 159–161 (1965); **31**, 46–54 (1967).
- [4] M. Kojima, E. Shikata, M. Sugawara, and D. Murayama, Virology **39**, 162–174 (1969).

- [5] M. F. Day and M. Zaitlin, Phytopath. Z. **34**, 83–85 (1959).
- [6] S. Sarkar, Virology **70**, 265–273 (1976).
- [7] S. Sarkar and J. Blessing, Naturwissenschaften **60**, 480–481 (1973).
- [8] M. V. Nermut and H. Frank, J. gen. Virol. **10**, 37–51 (1971).