

Elektronenmikroskopische Beobachtungen an Parasiten aus *Scenedesmus*-Massenkulturen

2. * Über Entwicklung und Parasit-Wirt-Kontakt von *Aphelidium* und virusartige Partikel im Cytoplasma infizierter *Scenedesmus*-Zellen **

E. SCHNEFF

Lehrstuhl für Zellenlehre der Universität Heidelberg

E. HEGEWALD und C.-J. SOEDER

Kohlenstoffbiologische Forschungsstation e.V., Dortmund

Eingegangen am 1. August 1970

Electron Microscopic Observations on Parasites of *Scenedesmus* Mass Cultures

2. Development and Parasite-Host-Contact of *Aphelidium* and Virus-Like Particles in the Cytoplasm of Infected *Scenedesmus* Cells

Summary. 1. Encysted *Aphelidium* zoospores penetrate the cell wall of the host, *Scenedesmus armatus*, and develop an endophytic, amoeboid protoplast which phagocytizes the host cytoplasm. The parasite plasmalemma forms compound membranes with parts of the host plasmalemma. These compound membranes may prevent an outflow of disintegrated host cytoplasm when the host plasmalemma is partly degenerated.

2. Zoospore development and resting spore formation are described and discussed with respect to the identification of the organism.

3. In the cytoplasm of a number of *Aphelidium* infected *Scenedesmus* cells rodlike particles (length 35 nm, diameter 10 nm) are found. Their (viral?) nature is discussed.

Zusammenfassung. 1. Encystierte *Aphelidium*-Zoosporen durchdringen die Zellwand ihres Wirtes, *Scenedesmus armatus*, und entwickeln einen endophytischen, amöboiden Plasmakörper, der das Wirtsplasma phagozytiert. Das Parasitenplasmalemma bildet mit Teilen des Wirtsplasmalemmas „compound membranes“. Diese können einen Austritt von abgebautem Wirtscytoplasma verhindern, wenn das Wirtsplasmalemma teilweise zerstört wird.

2. Die Entwicklung der Zoosporen und die Bildung der Dauersporen wird beschrieben und in Hinblick auf die Identifizierung des Organismus diskutiert.

3. Im Cytoplasma einer Anzahl von *Scenedesmus*-Zellen, die mit *Aphelidium* infiziert waren, wurden stabförmige Partikel (Länge 35 nm, Durchmesser 10 nm) gefunden. Ihre (Virus?) Natur wird diskutiert.

* 1. Mitteilung: E. Schnepf, C.-J. Soeder, and E. Hegewald: *Virology* **42**, 482 (1970).

** Herrn Prof. Dr. H. Drawert zum 60. Geburtstag gewidmet.

In der Kohlenstoffbiologischen Forschungsstation Dortmund sind *Scenedesmus*-Massenkulturen angelegt worden, die der Erschließung von neuen Proteinquellen für die menschliche Ernährung dienen sollen. Diese Kulturen werden von verschiedenen Parasiten heimgesucht (Kraut u. Meffert, 1966; Soeder u. Maiweg, 1969; Schnepf et al., 1971; vgl. auch Fott, 1967, und die dort angeführte Literatur).

Einer dieser Parasiten ist aus mehreren Gründen besonders interessant:

Er dringt als nackter Protoplast in die *Scenedesmus*-Zelle ein und zehrt deren Plasma auf, wobei es zu Veränderungen am Plasmalemma des Wirts kommt, die von Bedeutung für das Verständnis der Zellkompartimentierung sind.

Er wird, während er die *Scenedesmus*-Zelle befällt, häufig von einem virusähnlichen, polyedrischen Partikel lysiert (Schnepf et al., 1970).

Außerdem steht er mit der Entwicklung von kleinen, stabförmigen Partikeln im *Scenedesmus*-Plasma in Zusammenhang. Bei diesen Partikeln handelt es sich möglicherweise um ein Virus, der Parasit wäre dann der Vektor.

Die im folgenden dargestellten Untersuchungen zeigen diese Partikel, den Parasit-Wirt-Kontakt und die damit zusammenhängenden Membranveränderungen neben einigen Stadien der Entwicklung des Parasiten. Es handelt sich dabei um einen Organismus, der mit dem von Fott (1957) als *Aphelidium chlorococcarum* beschriebenen Chlorococcalen- (u. a. auch *Scenedesmus*-) Parasiten identisch ist oder ihm sehr nahe steht. Er wird in die Gymnococcaceen (Monadinae, Zoosporae) eingeordnet. Zu dieser Gruppe, die Trégouboff (1963) als Familie der Zoosporida, Ordnung Protomyxidae, als Anhang bei den Heliozoen führt, gehören z.B. auch die Pseudosporeen (Schussnig, 1929), die auf verschiedenen fädigen Algen parasitieren. Sie spielt in den Überlegungen von Scherffel (1925) über die Phylogenie der Phycomyceten eine wichtige Rolle. Eine bessere cytologische Kenntnis dieser Formen ist auch aus diesem Grunde wünschenswert.

Material und Methode

Die Herkunft des Materials, verunreinigte Massenkulturen von *Scenedesmus armatus* (Chod). Smith, wurde bei Schnepf et al. (1970) beschrieben.

Als Fixierungsmittel für die Elektronenmikroskopie dienen Glutaraldehyd (1% in 0,1 mol Phosphatpuffer, gefolgt von 1% OsO₄ + 1,1% K₂Cr₂O₇), OsO₄ (1% + 1,1% K₂Cr₂O₇) und KMnO₄ (1%, ungepufferte wäßrige Lösung). Die Fixierungsdauer betrug etwa 1/2 Std (Zimmertemperatur). Die Einbettung in Epon erfolgte nach Entwässerung mit Alkohol und Überführung in Propylenoxyd. Die Dünnschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert und mit einem Siemens Elmiskop IA untersucht.

Ergebnisse

1. Lichtmikroskopische Beobachtungen

Der Befall von *Scenedesmus armatus* durch *Aphelidium* kann frühzeitig erkannt werden, da bald nach der Infektion einer Wirtszelle in deren Cytoplasma ein auffälliger, chloroplastenfreier Bereich zu sehen ist. Im hyalinen *Aphelidium*-Protoplasten befindet sich stets ein kugelig Körper von orangeroter, seltener gelber Farbe, der aus nichtresorbierten Resten des Wirtsplasmas besteht (Abb.1).

Der *Aphelidium*-Protoplast wächst in dem Maße heran, wie das Wirtsplasma abgebaut wird. Bei unreifen Zoosporangien, welche das ganze Lumen der Wirtszelle ausfüllen, fällt eine stark granuläre Struktur besonders auf. In der Folge wandelt sich der Sporangieninhalt in die Zoosporen um (Abb.1), deren Freisetzung wir noch nicht verfolgen konnten.

Die freischwimmenden Zoosporen sind opisthokont begeißelt und enthalten stets ein einziges, stark lichtbrechendes Körperchen, das in Übereinstimmung mit Fott (1957) als Lipoidtröpfchen angesprochen wurde. Zoosporen, die sich an *Scenedesmus*-Zellen angeheftet haben, vermögen sich auf der Wirtszellwand oder auch auf dem Objektträger amöboid fortzubewegen. Dabei bleibt die Geißel noch erhalten. Nach Infektion der Wirtszelle löst sich die von Parasitenplasma entleerte Zoosporenhülle meist von der *Scenedesmus*-Zelle ab.

Unter nicht näher bekannten Bedingungen geht *Aphelidium* zur Bildung von Dauersporen über (Abb.1). Im Gegensatz zur Zoosporangien-Bildung erfolgt die Dauersporen-Bildung, bevor der ganze Wirtspertoplast abgebaut ist. Die orangerote Masse der vom Parasiten nicht resorbierten Reste des Wirtsplasmas liegt außerhalb der Dauerspore. Das Cytoplasma der Dauerspore läßt im Phasenkontrast zwei Strukturen erkennen: einen rundlichen Körper (Vacuole mit Ingesta-Resten?)

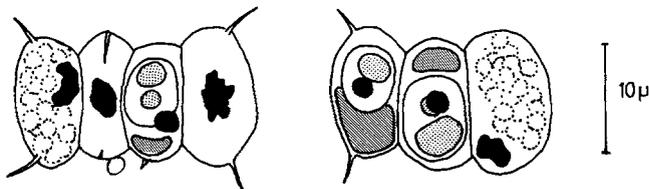


Abb.1. Zoosporangien und Dauersporen von *Aphelidium* in *Scenedesmus armatus*. Links und rechts außen Zoosporangien mit Zoosporen. Dritte, fünfte und sechste Zelle von links mit Dauersporen. Zweite und vierte Zelle von links: entleerte Wirtszellen nach Freisetzung der Zoosporen. Zweite Zelle von links mit anhaftender, entleerter Zoospore. Schraffiert: chlorophyllhaltige Reste von Wirtszellen; schwarz: nichtresorbierte, rotgefärbte Reste der Wirtspertoplasten, außerhalb der Parasiten-Protoplasten liegend; punktiert: im Phasenkontrast erkennbare Einschlüsse der Dauersporen

und ein \pm napfförmiges Gebilde, das mit seiner konvexen Außenseite dem einen Pol der ovalen Spore genähert ist. Das Auskeimen der Dauer-sporen wurde nicht beobachtet.

Der untersuchte *Aphelidium*-Typ ist vermutlich wirtsspezifisch (vgl. jedoch Fott, 1957), da in Mischkulturen von *Scenedesmus armatus* und *Scenedesmus acutus* var. *alternans* 276-3a nur das erstgenannte Objekt infiziert wird.

2. Elektronenmikroskopische Beobachtungen über die Entwicklung des Parasiten

In unserem fixierten Material kommen neben dem Wirt, *Scenedesmus armatus*, und dem hier zu besprechenden Parasiten, *Aphelidium*, der sehr stark vertreten ist, einige andere Parasiten und Kommensalen vor. Es gelang uns daher bislang noch nicht, freischwimmende Schwärmer in unseren Präparaten eindeutig zu identifizieren.

Das erste sicher erkennbare Infektionsstadium sind Zoosporen, die sich auf einer *Scenedesmus*-Zelle festgesetzt und encystiert haben (Abb. 2). Die Cystenwand ist sehr dünn; sie besteht aus einer dunklen äußeren Schicht und einer feinen, hellen, von Fibrillen durchsetzten inneren Lage. An der Anheftungsstelle wird ein flockiges Material aus-geschieden.

Ein charakteristischer Bestandteil der Cyste ist ein großer Lipoid-tropfen, der immer in unmittelbarer Nähe des Zellkernes liegt (Abb. 3). Außerdem trifft man bei Schnitten durch die Cyste meistens einige mito-chondriale Profile sowie ein oder zwei Zisternen des endoplasmatischen Reticulums (ER) an (Abb. 2 und 3), einen „dense body“ (Abb. 2) und das kleine Dictyosom hingegen nur selten.

Wenn die Cyste den Penetrationsschlauch ausbildet, entwickelt sich in ihrem apikalen Teil, in der Regel etwas seitlich, eine Vacuole (Abb. 3). Sie enthält, neben einzelnen kleinen Bläschen, ein lockeres, fibrilläres Material, das sich vermehrt, während die Vacuole an Größe zunimmt (Abb. 8).

Abb. 2. Encystierte Zoospore, die *Scenedesmus*-Zellwand durchbrechend. *B* dense body, *E* Zisterne des endoplasmatischen Reticulums (ER), *N* Zellkern, Pfeil: Fibrillen der inneren Wandschicht der Zoospore. Marke 1 μm . Fix.: KMnO_4

Abb. 3. Encystierte Zoospore, Querschnitt. *E* Zisterne des ER, *L* Lipoidtropfen, *M* Mitochondrien, *N* Zellkern, *V* Vacuole. Marke: 1 μm . Fix.: $\text{OsO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Abb. 4. Infektionstrichter mit Infektionshof bei einem älteren Infektionsstadium. *L* Lipoidtropfen, *x* phagocytiertes *Scenedesmus*-Plasma. Marke: 1 μm . Fix.: $\text{OsO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Abb. 5. Junger *Aphelidium*-Protoplast in einer Wirtszelle. *x* Phagocytose-Vacuolen. Marke: 1 μm . Fix.: $\text{OsO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

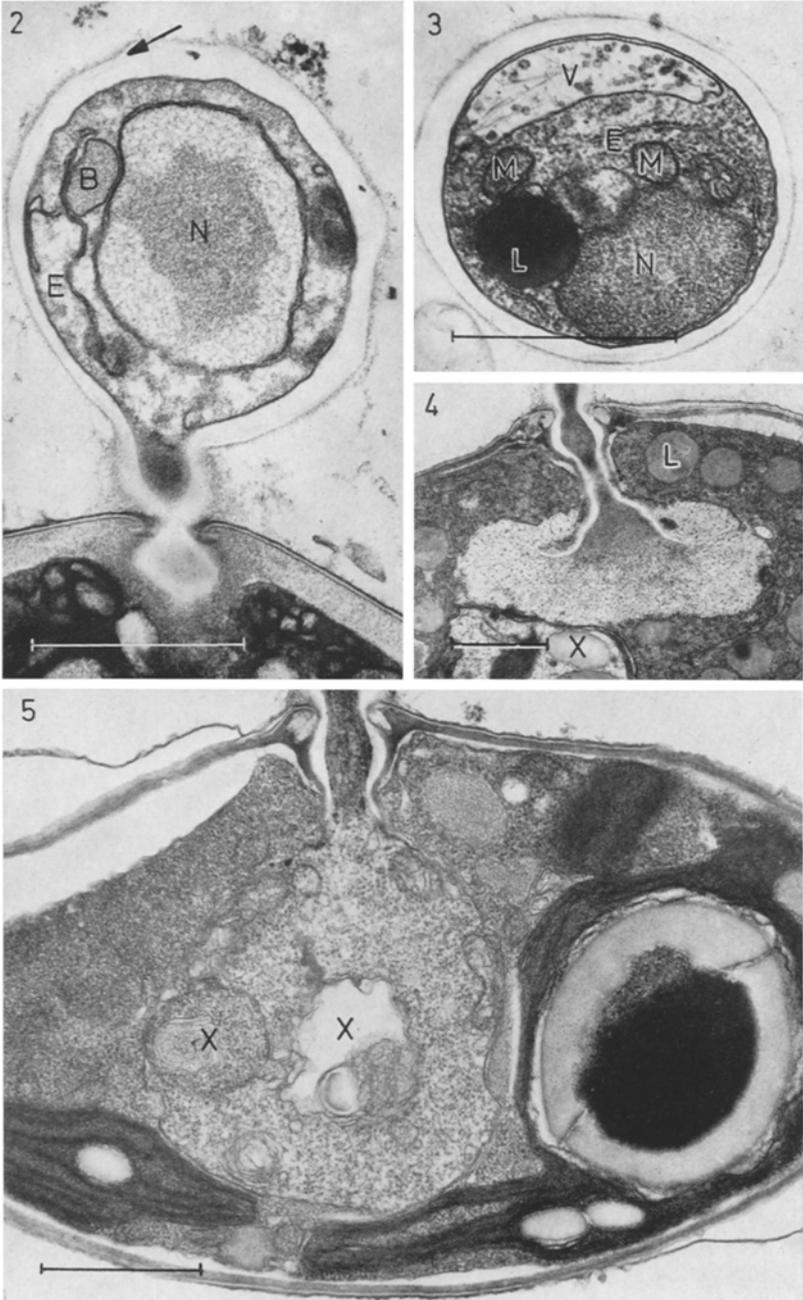


Abb. 2—5

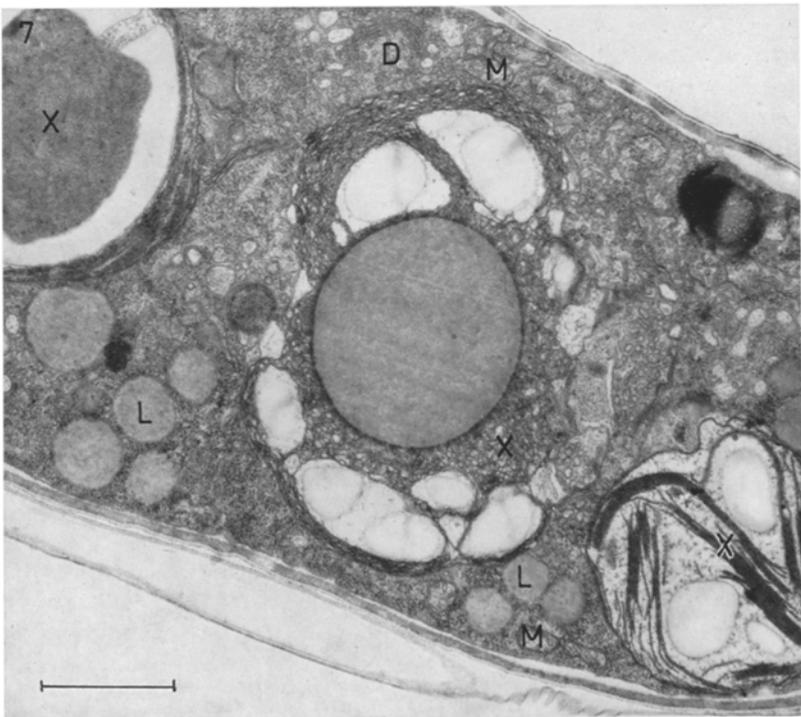


Abb. 6 und 7

Der Penetrationsschlauch wächst häufig zunächst etwas auf der *Scenedesmus*-Zellwand, ehe er sie durchstößt. Diese Zellwand besteht aus vier deutlichen Schichten: eine sehr elektronendichte Außenlage, die sich leicht von der übrigen Wand ablöst, eine helle und eine dunkle Zwischenlage und eine mäßig kontrastierte, dicke Innenlage, die die Hauptmasse der Zellwand darstellt (Abb. 2, 6 und 7; vgl. u. a. auch Bisalputra u. Weier, 1963). Der Penetrationsschlauch durchdringt alle vier Schichten. Um die entstehende Öffnung scheidet das Wirtsplasma Zellwandmaterial aus. Es wird so ein heller, unregelmäßiger Ring gebildet, der in die helle Zwischenlage übergeht, und, nach innen zu, ein kurzes Rohr, das eine Fortsetzung der Innenlage ist (Abb. 4—6 und 8).

Der Parasit dringt durch dieses Rohr in das Zellinnere ein. Die Cystenwand wächst nicht als Ganzes mit in die Wirtszelle ein, nur die innere, helle Schicht umgibt den eindringenden Plasmaschlauch. Sie erweitert sich und setzt sich dann nicht weiter fort, so daß ein offener Trichter entsteht. Dieser Infektionstrichter ist in Abb. 4 besonders deutlich zu erkennen, er ist hier von einem mit feinen Flocken erfüllten Hof umgeben. Es handelt sich dabei um ein älteres Infektionsstadium oder um eine der häufig auftretenden Mehrfachinfektionen.

Die Zellorganellen des Parasiten wandern durch den Penetrationsschlauch in die *Scenedesmus*-Zelle ein. Dabei vergrößert sich die Vacuole in der Cyste und füllt diese schließlich ganz aus (Abb. 8). Der Infektionskanal wird dann, wenigstens manchmal (Abb. 8), durch einen Pfropf aus dichtem Material verstopft. Es gibt auch Fälle (Abb. 6), in denen dieser Pfropf fehlt, entweder weil er hier nicht gebildet oder wieder aufgelöst wurde. Die leere Cystenhülle kann längere Zeit auf der *Scenedesmus*-Zelle erhalten bleiben.

Der eingedrungene, nur von seinem Plasmalemma umschlossene Plasmakörper des Parasiten bildet keine Zellwand aus. Er wird amöboid und phagozytiert nach und nach kleinere und größere Teile des Wirtsplasmas (Abb. 5—8). In diesen bilden sich häufig Vacuolen mit einem dichten fibrillären Inhalt (Abb. 5 und 7). Da die Grenzen zwischen Parasit und Wirt sehr unregelmäßig verlaufen, ist es nicht immer leicht, die einzelnen Plasmabezirke den beiden Organismen zuzuordnen. Besonders schwierig ist das, wenn sich in mehrfach infizierten Zellen auch die Parasiten durchdringen. Eine Hilfe bei der Identifizierung bieten die erwähnten Vacuolen und Plastidteile im *Scenedesmus*-Plasma.

Abb. 6. Älterer *Aphelidium*-Protoplast in einer Wirtszelle. \times phagozytierte, + nicht phagozytierte Reste des Wirtsplasmas. Marke: 1 μm . Fix.: $\text{OsO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Abb. 7. *Aphelidium*-Protoplast in einer Wirtszelle mit 3 Phagozytosevacuolen \times , in der mittleren ein großer Lipoidtropfen. *D* Dictyosom, *L* Lipoidtröpfchen, *M* Mitochondrien. Marke: 1 μm . Fix.: $\text{OsO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

In den phagocytiierten Teilen des Wirtsplasmas werden zuerst die Ribosomen abgebaut. Die Plastidenstücke halten sich relativ lange (Abb.7 und 16). Schließlich werden auch sie zerstört und die Stärkekörner aufgelöst. Während dieser Prozesse entstehen oft myelinartige Membranknäule (Abb.5 und 7). Die einzelnen „Nahrungsvacuolen“ fusionieren, aus den unverdauten Resten bildet sich ein großer Lipidtropfen, der auch Fott (1957) bei seinen lichtmikroskopischen Beobachtungen aufgefallen war.

Bei all diesen Prozessen ist der Protoplast des Parasiten immer von seinem Plasmalemma umgeben, während die *Scenedesmus*-Plasmamembran bemerkenswerte Veränderungen erfährt. Bei seinem Durchtritt durch den Infektionstrichter drückt das vordringende *Aphelidium* den Wirtsprotoplasten ein. Die vom Parasiten ausgefüllte Einstülpung, die Infektionshöhle, ist zunächst von einer Membran umschlossen, die ein Teil des *Scenedesmus*-Plasmalemmas ist. Auch die vom Parasiten phagocytiierten Plasmateile sind anfänglich noch vom Wirtsplasmalemma eingehüllt. Das Wirtsplasmalemma tritt jedoch bald an den Stellen, wo es mit dem Parasitenplasmalemma in Berührung kommt, also um die Infektionshöhle und die Phagocytose-Vacuolen herum, mit diesem in sehr engen Kontakt. Jede einzelne Membran zeigt für sich das typische Dunkelhell-dunkel-Muster einer Elementarmembran. An den Kontaktstellen legen sich hingegen die äußeren dunklen Schichten der beiden Membranen so eng aneinander, daß sie zu einer einzigen, nicht weiter auflösbaren Lage verschmelzen; das zeigen Abb.10 und die in Abb.16 dargestellte Phagocytose-Vacuole mit einem Chloroplasten-Teil (vgl. zur Orientierung Abb.15). Es entsteht somit eine 5schichtige „external compound membrane“, wie sie z. B. in der *zonula ocludens* in Schlußleisten tierischer Epithelien vorkommt.

Wie schon erwähnt wurde, treten in unseren Proben zahlreiche *Scenedesmus*-Zellen auf, die von zwei oder noch mehr Individuen des Parasiten

Abb.8. Fast völlig vom *Aphelidium*-Protoplasten ausgefüllte *Scenedesmus*-Zelle. *x* phagocytiierte, + nicht phagocytiierte Reste des *Scenedesmus*-Plasmas. *L* Lipidtröpfchen, *M* Mitochondrium, *N* Zellkern. Marke: 1 μm . Fix.: KMnO_4

Abb.9. Zwei „compound membranes“ in engem Kontakt bei einer Doppelinfektion. *A* und *A'* Plasma der beiden *Aphelidien*. Marke: 0,1 μm . Fix.: $\text{OsO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Abb.10. Eine „compound membrane“, die den *Aphelidium*-Protoplasten *A* gegen das *Scenedesmus*-Plasma + abgrenzt, unter dem zur Zellwand hin gekehrten *Scenedesmus*-Plasmalemma (Pfeil). Marke: 0,1 μm . Fix.: KMnO_4

Abb.11. In einer älteren Infektion wird das *Aphelidium*-Plasma *A* zur Zellwand hin durch eine „compound membrane“ begrenzt. Marke: 0,1 μm . Fix.: $\text{OsO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Abb.12. In einer alten Infektion löst sich der äußere Teil der „compound membrane“, die das *Aphelidium* *A* zur Zellwand hin begrenzt, auf. Marke: 0,1 μm . Fix.: $\text{OsO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

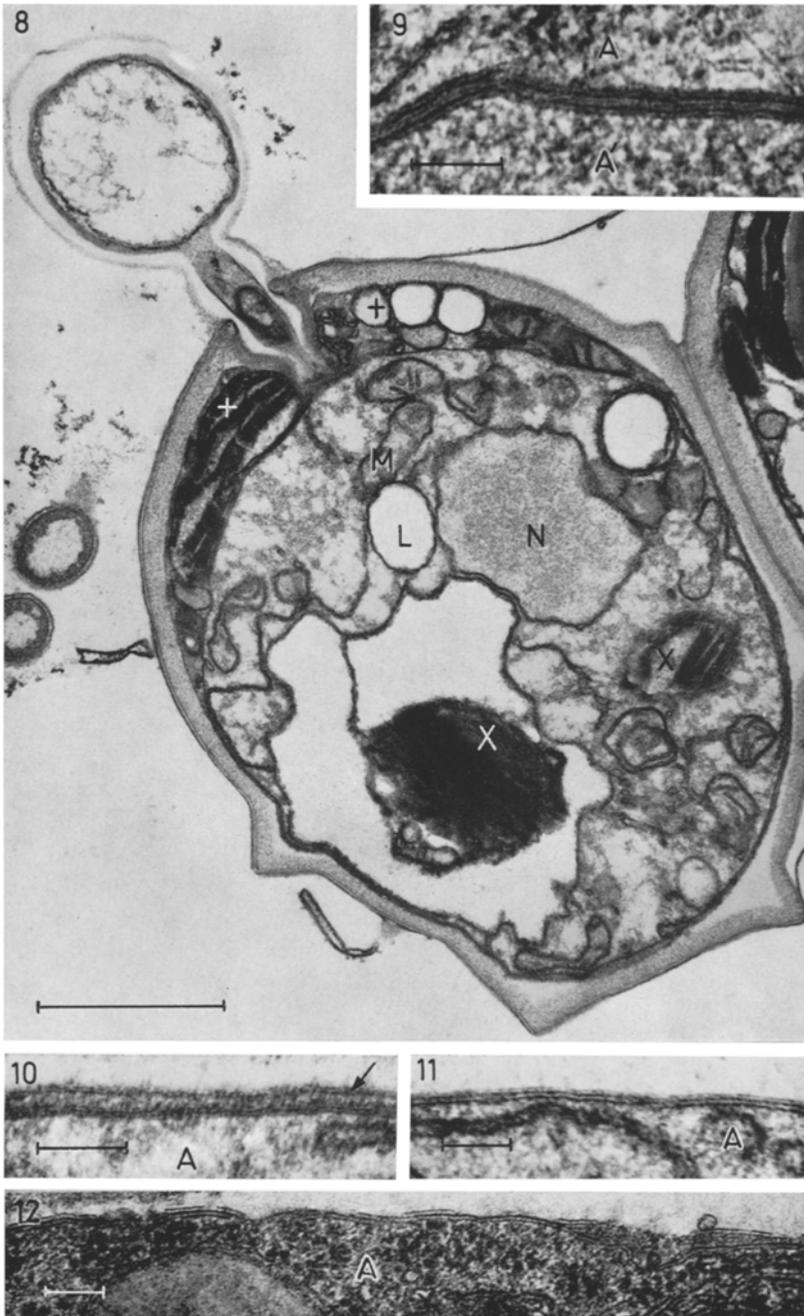


Abb. 8—12

befallen sind. Bei ihrem Wachstum können sie das zwischen ihnen liegende Plasma des Wirtes mehr oder weniger vollständig aufzehren oder an die Seite drängen, so daß sie sich dann berühren. Abb. 9 zeigt eine solche Stelle; hier liegen die beiden „compound membranes“, die die amöboiden *Aphelidium*-Protoplasten umgeben, unmittelbar aneinander und bilden eine 9schichtige Struktur aus vier Elementarmembranen. Die beiden äußeren gehören den Parasiten, die beiden inneren dem Wirt; das ursprünglich dazwischen liegende *Scenedesmus*-Plasma ist entfernt; die dunklen Schichten auf der Plasmaseite des *Scenedesmus*-Plasmalemmas sind wie die Außenlagen von Wirts- und Parasiten-Plasmalemma verschmolzen, bilden aber keine so kräftige Lage wie diese.

Bei den Phagozytose-Vacuolen ist die „compound membrane“ auf das Anfangsstadium beschränkt. Im weiteren Verlauf der Entwicklung, manchmal früher, manchmal später, degeneriert hier der Teil, der vom Wirtsplasmalemma abstammt; meistens bleiben dabei keine Reste erhalten. Das degenerierende Wirtsplasma ist dann in diesen Vacuolen nur von einer einfachen Elementarmembran umschlossen (Abb. 13 und 14).

Das Wirtsplasma wird vor allem in den Phagozytose-Vacuolen verdaut, aber auch die restlichen, nicht phagozytierten Plasmapartien zerfallen schließlich und werden größtenteils resorbiert, wobei Autolysen beteiligt sein könnten. Dadurch vergrößert sich der *Aphelidium*-Protoplast immer mehr und nähert sich allseitig der Zellwand, wobei die ihn umgebende „compound membrane“ unter das *Scenedesmus*-Plasmalemma an der Zellwand zu liegen kommt (Abb. 10). Schließlich lagern sich alle drei Membranen zusammen. Dabei sollte also eine 7schichtige Struktur entstehen. Diese wurde bislang nur selten, undeutlich ausgebildet und über kurze Strecken hinweg beobachtet; sie wandelt sich bald in eine 5schichtige Struktur um (Abb. 11); offenbar degeneriert eine der Membranen. Manche Abbildungen lassen vermuten, daß die mittlere der drei Membranen aufgelöst wird, also der *Scenedesmus*-Anteil der „compound membrane“ um den *Aphelidium*-Protoplasten.

Die neugebildete „compound membrane“, die dann den die Zelle fast ganz ausfüllenden *Aphelidium*-Protoplasten umgibt, ist relativ stabil. Manchmal scheint sich auch hier der äußere Teil, der also vom Wirt her stammt, langsam aufzulösen (Abb. 12), doch ist das Erscheinungsbild vermutlich mit durch die Fixierung bedingt, denn wenn sich bei der Dauersporen-Bildung die beiden Partner wieder trennen und durch das *Aphelidium*-Plasmalemma hindurch das Material der Dauersporen-Wand ausgeschieden wird, kann das *Scenedesmus*-Plasmalemma oft noch in großen Fragmenten beobachtet werden (Abb. 19, 20 und 22).

In Abb. 15 wurde versucht, die verschiedenen Plasmamembranen, ihre Kontakte und ihre Degeneration schematisch darzustellen.

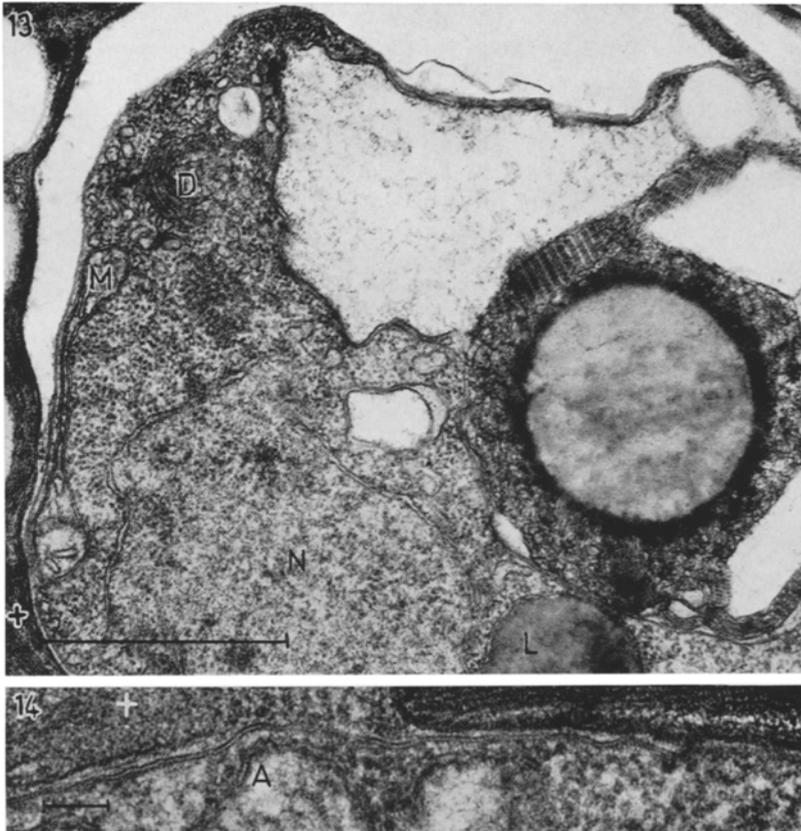


Abb. 13. Phagozytose-Vacuole mit großem Lipidtröpfchen und stäbchenförmigen Partikeln im degenerierenden, vacuolisierten *Scenedesmus*-Plasma; noch nicht phagozytierte Teile des *Scenedesmus*-Plasmas +. Im *Aphelidium*-Plasma Dictyosom *D*, Lipidtröpfchen *L*, langgestrecktes Mitochondrium *M*, Zellkern *N*. Marke: 1 μm . Fix.: $\text{OsO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Abb. 14. Einfache Elementarmembran zwischen *Aphelidium*-Plasma *A* und *Scenedesmus*-Plasma +. Marke: 0,1 μm . Fix.: $\text{OsO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Während der Parasit heranwächst, sind seine Dictyosomen aktiv und bilden zahlreiche Golgi-Vesikel aus (Abb. 13); es entstehen in seinem Plasma viele Lipidtröpfchen, die Mitochondrien, das ER und die Ribosomen vermehren sich.

Die Entwicklung des Parasiten kann dann zwei verschiedene Wege einschlagen, wobei noch nicht klar ist, welche Bedingungen die Zoosporen- und welche die Dauersporenbildung herbeiführen. Im ersten Fall bildet sich zunächst ein vielkerniges Plasmodium, das sich später zer-

klüftet. Dabei bilden sich von außen her Furchen; sie vergrößern sich u.a. dadurch, daß sie an ihrem Grunde mit Vesikeln fusionieren, die aus dem Golgi-Apparat zu stammen scheinen; die Dictyosomen liefern also vermutlich Material für das sich vergrößernde Plasmalemma.

Während sich auf diese Weise das Plasmodium in kleinere Partien zerlegt, von denen jede einen Zellkern, ein Mitochondrium, ein Dictyosom und mehrere Lipoidtröpfchen enthält (Abb.17), entwickelt sich die Geißel. So entstehen etwa 10—20 Zoosporen, die nur von der *Scenedesmus*-Zellwand und den Resten des *Scenedesmus*-Plasmalemmas umgeben sind. Eine distinkte Zoosporangienwand wird nicht gebildet (Abb.18). — Die festgesetzten und encystierten Zoosporen enthalten eigentümlicherweise nur *einen* größeren Lipoidtropfen. Die Ingesta-Reste in der *Scenedesmus*-Zelle bestehen nach der Zoosporen-Bildung im wesentlichen nur

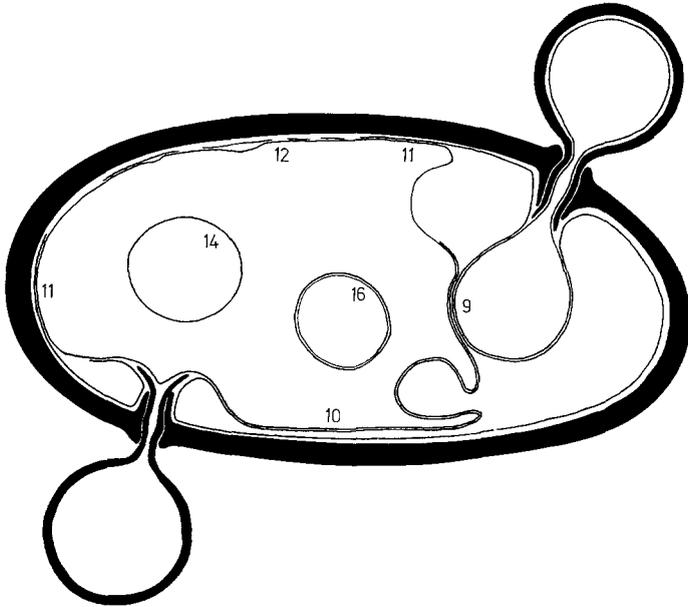


Abb.15. Plasmalemma-Kontakte zwischen Parasit und Wirt sowie Auflösung des Wirtsplasmalemmas, schematisch. Die Ziffern verweisen auf die Abbildungen, in denen eine entsprechende Struktur dargestellt ist

Abb.16. Von einer „compound membrane“ (Pfeile) umgebene Phagozytose-Vacuole mit einem Chloroplasten-Teil. Marke: 0,5 μ m. Fix.: KMnO_4

Abb.17. Gerade entstandene Zoospore mit aktivem Dictyosom *D*, Lipoidtröpfchen *L* und Mitochondrium *M*. Marke: 1 μ m. Fix.: $\text{OsO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Abb.18. Zoosporen (*A*) mit quer (*G*) und längs geschnittenen Geißeln in einer *Scenedesmus*-Zelle, *Scenedesmus*-Zellwand *Z*; keine Zoosporangien-Wand. Öltröpfchen aus unverdaulichem *Scenedesmus*-Plasma *L*, + zwei nicht infizierte *Scenedesmus*-Zellen. Marke: 1 μ m. Fix.: $\text{Glut/OsO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

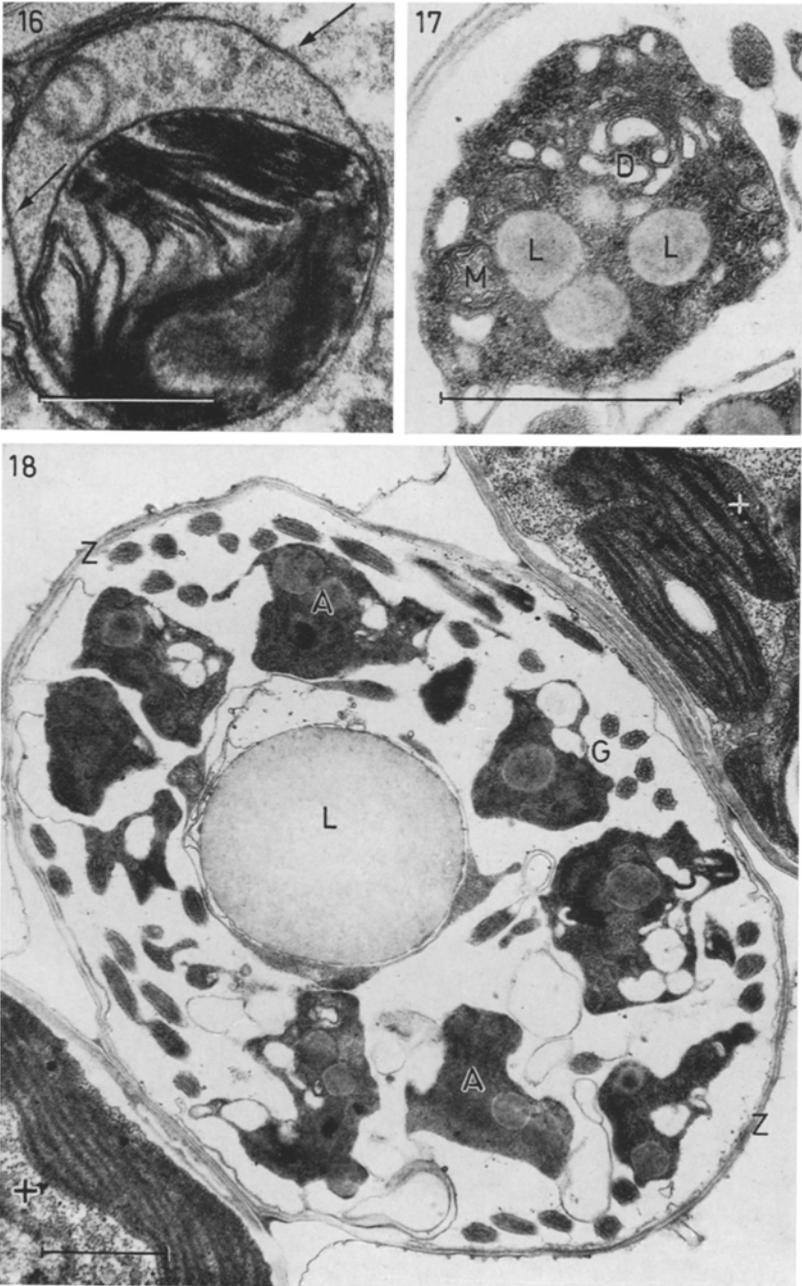


Abb. 16–18

noch aus einem großen Lipoidtropfen (Abb. 18). Das Zoosporen-Plasma ist in diesem Stadium nur schlecht fixierbar.

Bei Parasiten, die zur Dauersporen-Bildung übergehen, hat die zentrale Nahrungsvacuole einen anderen Inhalt; der Öltropfen fehlt. Stattdessen enthält sie ein inhomogenes Material, dessen Hauptmasse aus einer elektronendichten Substanz besteht (Abb. 19 und 21).

Die Dauersporen-Bildung wird durch eine Kontraktion des Proto-plasten eingeleitet. Er rundet sich dabei ab und wird sehr dicht. Die Plasmastrukturen werden immer schwerer darstellbar. Nach der Abkuglung entsteht die Dauersporen-Wand. Sie ist aus zwei Schichten zusammengesetzt. Die äußere, dunklere ist etwa 100 nm dick, und aus einem flockig-granulären Material aufgebaut, wie man besonders an der unscharf begrenzten Außenseite erkennen kann. Sie grenzt stellenweise hier an das z.T. noch vorhandene Plasmalemma (s.o.) des sonst völlig zerstörten und aufgezehrten *Scenedesmus*-Plasmas (Abb. 20). Die hellere Innenschicht der Dauersporen-Wand hat eine Dicke von 150 nm und mehr und ist aus Fibrillen aufgebaut.

Nach der Bildung dieser Wandschichten kontrahiert sich das Plasma weiter. Dabei lockert sich die Struktur der inneren Wandschicht etwas auf. Währenddessen scheiden Vesikel, die vermutlich aus dem Golgi-Apparat stammen, ein lockeres, feinflockiges Material aus (Abb. 20).

Nach dieser Phase verlagern sich die zahlreichen Lipoidtröpfchen des Dauersporen-Plasmas in die periphere Plasmaschicht, legen sich eng aneinander, platten sich dabei gegeneinander und gegen das Plasmalemma ab und bilden so einen dichten Mantel (Abb. 21 und 22). Dieser ist nicht gleichmäßig, sondern über der exzentrisch gelegenen Vacuole mit den Ingesta-Resten weniger dick als an den übrigen Stellen; hier hat der sonst mehr oder weniger kugelige Plasmakörper eine Abplattung oder sogar eine Eindellung.

In den letzten Stadien der Dauersporenentwicklung dringt das Einbettungsmittel nicht mehr in ausreichendem Maße durch die Wand und die periphere Lipoidtropfen-Schicht; die Objekte lassen sich nicht mehr

Abb. 19. Junge Dauerspore. *L* Lipoidtröpfchen, *N* Zellkern, *S* *Scenedesmus*-Zellwand, *x* Vacuole mit Ingesta-Resten, Pfeil: Rest des *Scenedesmus*-Plasmalemmas. Marke: 1 μm . Fix.: KMnO_4

Abb. 20. Vesikelextrusion am Rande einer reifenden Dauerspore. Pfeil: Rest des *Scenedesmus*-Plasmalemmas. Marke: 0,5 μm . Fix.: $\text{Glut./OsO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Abb. 21. Reifende Dauerspore. Die Lipoidtröpfchen sammeln sich an der Peripherie. Vacuole mit Ingesta-Resten *x*. Marke: 1 μm . Fix.: $\text{Glut./OsO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Abb. 22. Fast reife Dauerspore. Die Lipoidtröpfchen haben sich an der Peripherie gesammelt. Vacuole mit Ingesta-Resten *x*, Pfeil: Rest des *Scenedesmus*-Plasmalemmas. Marke: 1 μm . Fix.: $\text{Glut./OsO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Abb. 23. Rand einer reifen Dauerspore. Marke: 0,5 μm . Fix.: $\text{Glut./OsO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

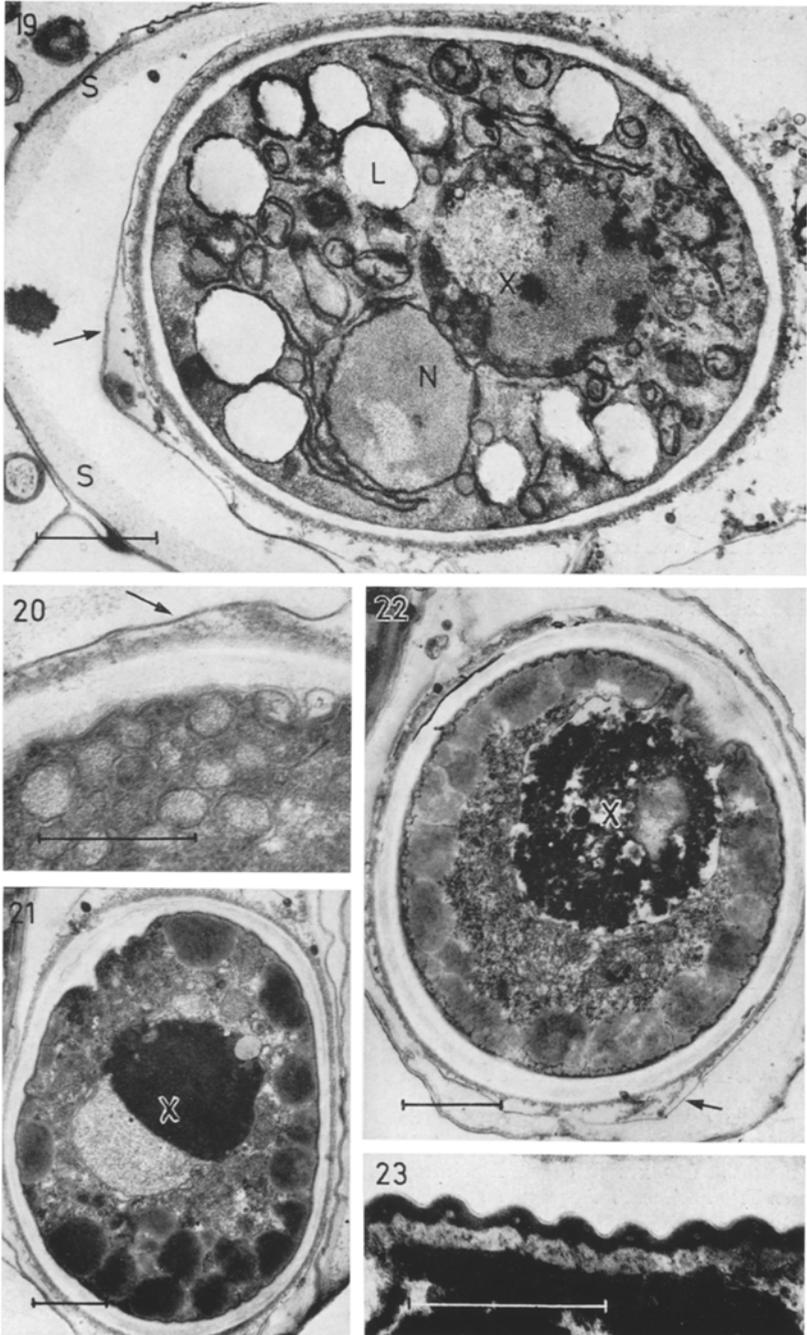


Abb. 19—23

mikrotomieren, das Innere wird zerstört. Es ist jedoch noch erkennbar, daß das Plasmalemma, das stets als sehr deutlich 3schichtige Membran den Plasmakörper der jungen Dauerspore umgibt, wellig wird (Abb. 22 und 23). Flachschnitte zeigen, daß die Wellenprofile von einer gleichmäßigen Furchung herrühren, die den ganzen Körper überzieht. Die peripheren Lipoidtropfen, deren äußere Kontur anfangs den Wellen folgt, fusionieren miteinander und haben schließlich einen glatten Abschluß. Zwischen diesem und dem Plasmalemma liegt eine Schicht stark osmiophilen Materials. Durch diese Veränderungen am Rande des Dauersporen-Protoplasten verliert das Innere jeglichen Kontakt mit dem Plasmalemma.

3. Virusartige Partikel in infizierten *Scenedesmus*-Protoplasten

In einer größeren Anzahl der infizierten Zellen erkennt man in den degenerierenden Bezirken des *Scenedesmus*-Plasmas kleine stabförmige Partikel. Sie treten sowohl in der zentralen Nahrungsvacuole des Parasiten um den Lipoidtropfen herum (Abb. 13) als auch in peripheren, noch nicht vom Parasiten phagozytierten Plasmabezirken auf (Abb. 24) und liegen immer nur im Grundplasma. In nicht infizierten Zellen wurden sie niemals angetroffen.

Diese Stäbchen haben eine Länge von etwa 35 nm und einen Durchmesser von etwa 10 nm. Eine stärkere Vergrößerung (Abb. 25) zeigt, daß sie aus einem elektronendichten Mantel und einem hellen Kern bestehen. Sie sind hexagonal dicht in Bündeln geordnet, die Gitterabstände im Querschnitt betragen 17 nm. Die Bündel liegen in mehreren Lagen übereinander.

Im Plasma des Parasiten wurden diese Stäbchen niemals beobachtet (wobei zu bemerken ist, daß *einzelne* Stäbchen kaum identifizierbar sind); dafür kommen dort, wie bereits beschrieben (Schnepf et al., 1970), polyedrische, virusartige Partikel vor, die es lysieren. Abb. 26 zeigt diese zum Vergleich. Es ist auffällig, daß in den Zellen, die von Parasiten mit Polyederpartikeln befallen sind, bislang keine stäbchenförmigen Partikel beobachtet wurden.

Beim Auftreten der stäbchenförmigen Partikel scheint das *Scenedesmus*-Plasma schneller zu degenerieren als in den Fällen, wo sie fehlen.

Abb. 24. *Scenedesmus*-Zelle mit zwei *Aphelidium*-Protoplasten A, die je eine Phagozytose-Vacuole x mit einem Lipoidtropfen enthalten. Im nicht phagozytierten *Scenedesmus*-Plasma Aggregate stäbchenförmiger Partikel. Marke: 1 μm . Fix.: $\text{OsO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Abb. 25. Aggregat stäbchenförmiger Partikel im degenerierten Plasma einer infizierten *Scenedesmus*-Zelle. Marke: 0,1 μm . Fix.: $\text{Glut./OsO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

Abb. 26. Polyedrische, virusartige Partikel im degenerierenden Cytoplasma eines *Aphelidium*. Marke: 0,1 μm . Fix.: $\text{Glut./OsO}_4 + \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

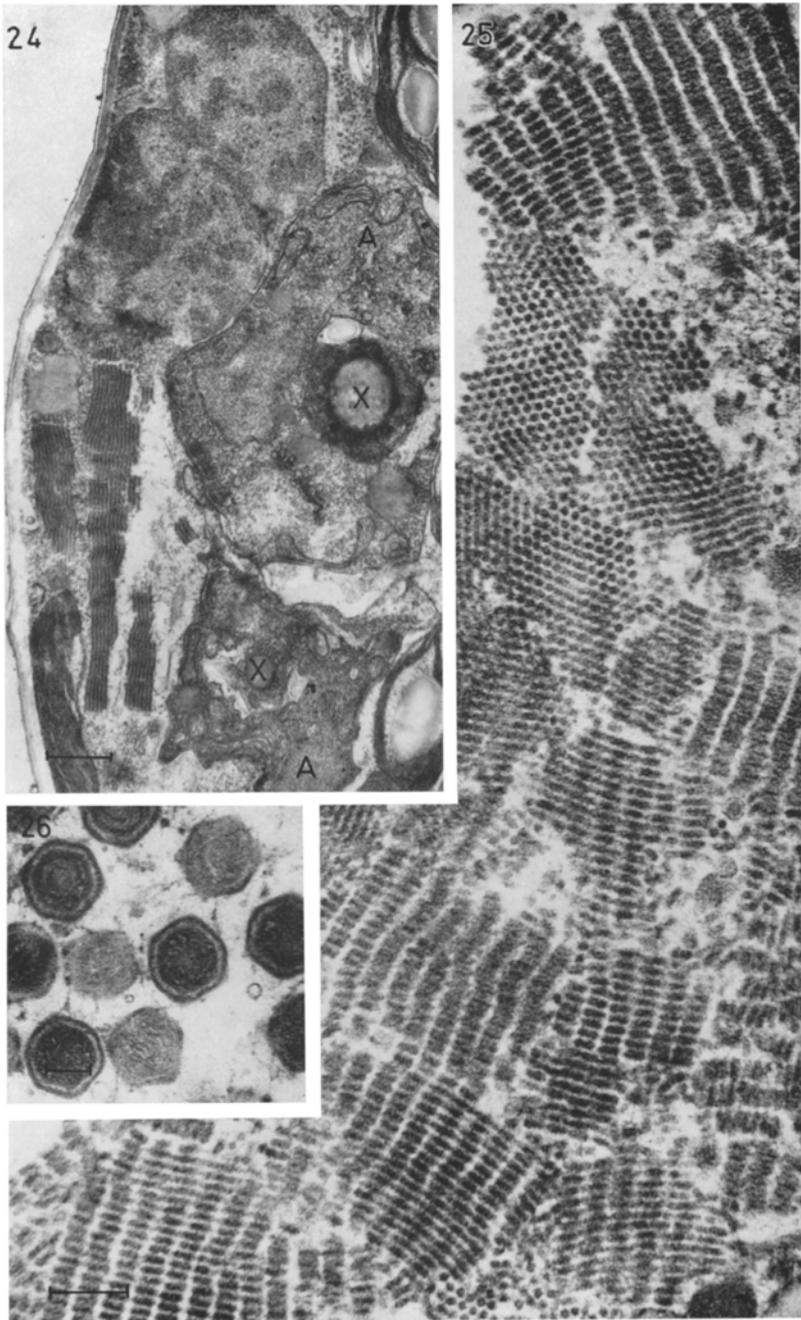


Abb. 24—26

Über ihre Entstehung läßt sich nichts Genaueres sagen. Sie werden offenbar im Grundplasma gebildet und kommen dort zunächst ungeordnet in kleinen Gruppen vor. Wenn sie in größerer Menge produziert sind, aggregieren sie in Form der erwähnten Pakete. — Es sei abschließend noch bemerkt, daß in den meisten Infektionen weder stäbchenförmige noch Polyederpartikel auftreten.

Diskussion

Die Beobachtungen an den verschiedenen Entwicklungsstadien des hier beschriebenen *Scenedesmus*-Parasiten haben gezeigt, daß fast alle wichtigen Kriterien, die Fott (1957) für *Aphelidium chloroccarum* angibt, für unseren Parasiten zutreffen. Das gilt besonders für den endophytischen, nackten amöboiden Plasmakörper, die Phagoocytose von Plasmateilen des Wirtes und deren Degeneration (vgl. hierzu auch Scherffel, 1925, und Schussnig, 1929).

Nur bei der Dauersporen-Entwicklung gibt es eine gewisse Differenz zwischen den Angaben von Fott (bei der Wandbildung Ausstoßung der unverdauten Nahrungsreste) und unseren Befunden, wonach auch in der umwandeten Dauerspore — neben außerhalb liegenden Plasmatrümmern — eine Nahrungsvacuole mit Ingesta-Resten vorkommt. Diese Diskrepanz beruht wahrscheinlich darauf, daß die lichtoptischen Mittel nicht ausreichen, die Nahrungsvacuole der Dauerspore, die nicht wie sonst Öltröpfchen, also stark lichtbrechende Partikel, enthält, zu erkennen.

Die Infektion ist ähnlich wie bei *Chytridium* (Schnepf et al., 1971) und *Olpidium* (Temminck u. Campbell, 1969; Lesemann u. Fuchs, 1970a) mit der Ausbildung einer Vacuole in der encystierten Zoospore verbunden. Als Reaktion der Wirtszelle kommt es auch hier zu einem Abkapselungsversuch, der im Detail jedoch anders verläuft. Eine Callosity (Lesemann u. Fuchs, 1970 b) haben wir nie beobachtet.

Das Auftreten der stäbchenförmigen Partikel im *Scenedesmus*-Cytoplasma steht nach allen unseren Beobachtungen mit der Infektion der Zelle durch *Aphelidium* in ursächlichem Zusammenhang. Für ihre Entstehung und die Deutung ihrer Natur bieten sich zwei Möglichkeiten an:

1. Es könnte sich um Substanzen handeln, die beim Abbau des Wirtsplasmas in größerer Menge entstehen und in Form der Stäbchen aggregieren. Dagegen spricht, daß die Partikel in unseren Präparaten zwar recht häufig, jedoch durchaus nicht in allen infizierten Zellen auftreten.

2. Eine andere Erklärung bietet die Annahme, daß die Partikel Viren darstellen. Diese Vermutung macht ihr sporadisches Auftreten

verständlich. Der Parasit, *Aphelidium*, wäre dann der Vektor oder würde wenigstens die Virusinfektion ermöglichen. Wenn man bedenkt, daß *Olpidium brassicae*, ein Phycomycet, der mit *Aphelidium* vielleicht entfernt verwandt ist (Schussnig, 1929), verschiedene Viren bei höheren Pflanzen überträgt (Campbell, 1962; Teakle u. Gold, 1963), ist diese Annahme nicht einmal abwegig. Das wäre unseres Wissens der erste konkrete Hinweis für das Auftreten von Viren bei Grünalgen. Es gibt allerdings Angaben von Zavarzina (1964) über eine Lyse von *Chlorella* in Abwesenheit von Bakterien, die in eine ähnliche Richtung deuten. Allerdings scheint in diesem Fall, wenn es sich überhaupt um Viren handelt, ein Vektor zu fehlen. Ein solcher dürfte jedoch bei den massiven Wänden der Chlorococcalen für die Infektion notwendig sein.

Ein Argument gegen die Vermutung, es handele sich bei den stäbchenförmigen Partikeln um Viren, ist, daß sie kleiner sind als die üblichen Viren und daß es schwer zu verstehen ist, wie der durch die *Aphelidium*-Infektion bereits geschädigte *Scenedesmus*-Protoplast noch Viren in dieser Menge synthetisieren kann.

Eine eindeutige Entscheidung in der einen oder anderen Richtung setzt voraus, daß die Schwierigkeiten in der Kultur des Parasiten überwunden werden, damit in gezielten Infektionsversuchen die Übertragbarkeit und Pathogenität der Partikel überprüft werden kann.

Von besonderem Interesse ist das Verhalten der Plasmamembranen von Parasit und Wirt im Verlauf der Infektion. Im allgemeinen sind, dem Kompartimentierungsschema (Schnepf, 1964, 1966) folgend, intracelluläre Parasiten und Endosymbionten durch zwei Membranen gegen das Wirtscytoplasma abgegrenzt: ihre eigene und die Plasmamembran des Wirtes. Eine Ausnahme bilden möglicherweise gewisse endosymbiontische Bakterien (Duval, 1966; Leedale, 1969). Auch bei einigen nackten Parasiten wird dieses Prinzip offenbar durchbrochen, so bei *Olpidium brassicae* (Lesemann u. Fuchs, 1970b). Die vegetativen Plasmodien von *Plasmodiophora brassicae* sind in der Wirtszelle anfänglich von zwei Elementarmembranen umgeben; später werden sie nur noch von einer eingehüllt, dann sind aber auch die Ribosomen im Wirtsplasma abgebaut (Williams u. McNabola, 1967). Die Folgerung der Autoren, daß die äußere der beiden Membranen dem Wirt, die innere dem Parasiten zuzuschreiben ist, wird durch unsere Beobachtungen gestützt. Auch bei der *Aphelidium*-Infektion zeigt vermutlich der Zusammenbruch des Wirtsplasmalemmas die irreversible Schädigung der Wirtszelle und damit den Zelltod an.

Mit der Bildung der „compound membranes“ bei der Infektion aus dem eigenen und dem Wirtsplasmalemma (vgl. Abb.15) stellt der Parasit für seine Nahrungsaufnahme günstige Bedingungen her. Zunächst könnte dadurch die Permeabilität des Wirtsplasmalemmas

in einer für ihn vorteilhaften Weise verändert, dann der Abbau des Wirtsplasmalemmas lokal durchgeführt werden, was die Verdauungsprozesse und die Resorption weiter erleichtern dürfte. Besonders wichtig ist aber, daß bis zuletzt das Wirtsplasma nach außen stets von mindestens einer Membran umschlossen bleibt. Dadurch wird der Verlust von löslichen Abbauprodukten eingeschränkt. Die „compound membrane“ ist hier wie in der *zonula occludens* zwischen Epithelzellen eine Diffusionsbarriere (Farquhar u. Palade, 1963); sie verschließt das durch die partielle Auflösung des Wirtsplasmalemmas gebildete Leck.

Es ist erstaunlich, daß die „compound membrane“ nach dem Abschluß der Verdauungsprozesse wieder dissoziiert. Das *Scenedesmus*-Plasmalemma bleibt — ohne daß noch ein *Scenedesmus*-Plasma vorhanden ist — in Teilen z.B. über der durch das *Aphelidium*-Plasmalemma ausgeschiedenen Dauersporenwand noch lange erhalten.

Durch die Veränderungen der Membranen des Wirtes wird hier das Schema der Zellkompartimentierung (Schnepf, 1964, 1966) zwar „durchbrochen“, seine grundsätzliche Anwendbarkeit für das Verständnis wird jedoch dadurch nicht in Frage gestellt, sondern hier eigentlich bestätigt, denn offenbar ist der Zusammenbruch des Wirtsplasmalemmas mit dem Tode der Wirtszelle gekoppelt.

Wir danken Frl. G. Deichgräber für ihre umsichtige und bewährte Mitarbeit, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Landesamt für Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen für Sachbeihilfen.

Literatur

- Bisalputra, T., Weier, T. E.: The cell wall of *Scenedesmus quadricauda*. Amer. J. Bot. **50**, 1011—1019 (1963).
- Campbell, R. N.: Relationship between the lettuce big-vein virus and its vector, *Olpidium brassicae*. Nature (Lond.) **195**, 675—677 (1962).
- Duval, J.-C.: Bactéries intramitochondriales dans le plasmode de *Didymium squamulosum* (Fr.). J. Microscopie **5**, 45a (1966).
- Farquhar, M. G., Palade, G. E.: Junctional complexes in various epithelia. J. Cell Biol. **17**, 375—412 (1963).
- Fott, B.: *Aphelidium chlorococcarum* species nova, parasit zelených řas. Univ. Carol., Biol. **3**, 229—237 (1957).
- *Phlyctidium scenedesmi* spec. nova, a new chytrid destroying mass cultures of algae. Z. allg. Mikrobiol. **7**, 97—102 (1967).
- Kraut, H., Meffert, M. E.: Über unsterile Großkulturen von *Scenedesmus obliquus*. Forschungsber. d. Land. Nordrh.-Westf. Nr. 1648 (1966).
- Leedale, G. F.: Observations on endonuclear bacteria in euglenoid flagellates. Öst. bot. Z. **116**, 279—294 (1969).
- Lesemann, D. E., Fuchs, W. H.: Elektronenmikroskopische Untersuchung über die Vorbereitung der Infektion in encystierten Zoosporen von *Olpidium brassicae*. Arch. Mikrobiol. **71**, 9—19 (1970a).
- — Die Ultrastruktur des Penetrationsvorganges von *Olpidium brassicae* an Kohlrabi-Wurzeln. Arch. Mikrobiol. **71**, 20—30 (1970b).

- Scherffel, A.: Endophytische Phycomyceten-Parasiten der Bacillariaceen und einige neue Monadinen. Ein Beitrag zur Phylogenie der Oomyceten (Schröter). Arch. Protistenk. **52**, 1—141 (1925).
- Schnepf, E.: Zur Feinstruktur von *Geosiphon pyriforme*. Ein Versuch zur Deutung cytoplasmatischer Membranen und Kompartimente. Arch. Mikrobiol. **49**, 112—131 (1964).
- Die Kompartimentierung der Zelle in morphologischer Sicht. Biol. Rdsch. **4**, 259—275 (1966).
- Deichgräber, G., Hegewald, E., Soeder, C.-J.: Elektronenmikroskopische Beobachtungen an Parasiten aus *Scenedesmus*-Massenkulturen. 3. *Chytridium* sp. Arch. Mikrobiol. **75**, 230—245 (1971).
- Soeder, C.-J., Hegewald, E.: Polyhedral viruslike particles lysing the aquatic phycomycete *Aphelidium* sp., a parasite of the green alga *Scenedesmus armatus*. Virology **42**, 482—487 (1970).
- Schussnig, B.: Beiträge zur Entwicklungsgeschichte der Protophyten. IV. Zur Entwicklungsgeschichte der Pseudosporeen. Arch. Protistenk. **68**, 555—578 (1929).
- Soeder, C.-J., Maiweg, D.: Einfluß pilzlicher Parasiten auf unsterile Massenkulturen von *Scenedesmus*. Arch. Hydrobiol. **66**, 48—55 (1969).
- Teakle, D. S., Gold, A. H.: Further studies of *Olpidium* as a vector of tobacco necrosis virus. Virology **19**, 310—315 (1963).
- Temmink, J. H. M., Campbell, R. N.: The ultrastructure of *Olpidium brassicae*. III. Infection of host roots. Canad. J. Bot. **47**, 421—424 (1969).
- Trégouboff, G.: Classe des Heliozoaires. In: P.-P. Grassé: Traité de Zoologie. Tome I, pp. 437—489. Paris: Masson 1963.
- Williams, P. H., McNabola, S. S.: Fine structure of *Plasmodiophora brassicae* in sporogenesis. Canad. J. Bot. **45**, 1665—1669 (1967).
- Zavarzina, N. B.: Lysis of *Chlorella* cultures in the absence of bacteria (russisch). Mikroskopia (UdSSR) **33**, 560—565 (1964).

Prof. Dr. E. Schnepf
Lehrstuhl für Zellenlehre
D-6900 Heidelberg, Berliner Str. 15

Dr. E. Hegewald und Dr. C.-J. Soeder
Kohlenstoffbiologische Forschungs-
station e. V.
D-4600 Dortmund
Bunsen-Kirchhoff-Str. 13