

Uit bovenstaande gegevens moge gebleken zijn, dat *Bruchus obtectus* een gevaarlijke vijand voor boonenvoorraden is en dat het dus zaak is, bij eventueel voorkomende aantastingen, krachtige bestrijdingsmaatregelen te nemen.

Wageningen, 7 October 1929.

VERKLARING DER FIGUREN

PLAAT XVIII

Figuur 1.

Boonen aangetast door *Bruchus obtectus* Say.

Figuur 2.

Deel van boon, met drie groote openingen, waaruit kevers getreden zijn, benevens een kleine, ronde opening, waardoor larve binnen is gedrongen (vergroot).

Foto's door IR. K. LEENDERTZ.

EXPERIMENTEN MET *BACTERIUM TUMEFACIENS* SM. ET TOWNS

(WITH A SUMMARY: EXPERIMENTS WITH *BACTERIUM TUMEFACIENS* SM. ET TOWNS.)

DOOR

T. H. THUNG

(vroeger assistent aan het Instituut voor Phytopathologie, Laboratorium voor Mycologie en Aardappelonderzoek te Wageningen, Holland, thans phytopatholoog aan het Proefstation voor Vorstenlandsche tabak te Klaten, Java.)

INLEIDING.

De vraag of bij ziekten van planten dezelfde verschijnselen van kunstmatige immunisatie kunnen optreden als bij dieren, komt steeds meer aan de orde. A priori zou men deze vraag ontkennend kunnen beantwoorden, aangezien bij planten geen stof bestaat, die dezelfde rol speelt als het bloed bij de dieren. Evenwel worden steeds meer phytopathologische waarnemingen gepubliceerd, die doen denken aan feiten bekend uit de serologie. Zoo vond PICADO (11) bij de cactussoort *Opuntia antilichamen* na inspuiting met stuifmeelkorrels van mais. Daartegenover kwam Rodriguez SARDIÑA (13) bij soortgelijke proeven tot negatieve resultaten. De laatste publicatie op dit gebied is van CARBONE (2), die op grond van eigen werk en op dat van andere onderzoekers tot de volgende overtuiging komt: „Die Befähigung höherer Pflanze zu einer Vakzination gegen Schmarotzerkryptogamen

(oder immerhin Symbionten) kann nunmehr als bewiesen gelten...." Korthheidshalve verwijs ik nog naar het werk van NOBÉCOURT (10) ter verdere orientatie.

Het leek mij loonend tijdens mijn verblijf op het Institut PASTEUR te Parijs juist over deze vraagstukken te werken en wel geschiedde dit met *Bacterium tumefaciens* SMITH and TOWNSEND. Aan de Nederlandsche Vereeniging „Studiefonds PASTEUR" be-
tuig ik langs dezen weg mijn dank voor de steun, die zij mij heeft willen verleen, waardoor het mij mogelijk is geweest de hier te bespreken onderzoekingen te verrichten en een zeer leersamen tijd in Frankrijk door te brengen.

DE KANKER VAN DE PLANT.

Bacterium tumefaciens heeft, dank zij het werk van ERWIN F. SMITH (14—19) de belangstelling getrokken zoowel van onderzoekers van plantenziekten als van die van ziekten bij mensch en dier. De door deze microbe bij planten verwekte kankerachtige gezwellen — in Amerika algemeen bekend onder den naam van „crown gall" — lijken in verschillende opzichten, in uiterlijk, in histologische structuur, in de wijze van uitbreiding, etc., frappeerend veel op dierlijke kwaadaardige tumoren. SMITH heeft een zeer groot aantal gevallen van „crown galls" beschreven bij de meest uitéénlopende planten. Een groot gedeelte hiervan zijn zg. teratomen of „embryomas", dit zijn: „sarcomas containing rapidly developing abortive parts of the young plant — roots, stems, leaves and flower buds or cells containing floral pigment" (18, p. 287). Vermoedelijk zijn de door SMITH beschreven teratomen de eerste, die de kankerstudie tot nu toe experimenteel heeft weten op te wekken.

Bij deze gevallen kan ik nog één voegen, waarbij ik het ontstaan van zgn. teratomen bij een sellerieknol heb gevonden. Een doorgesneden knol van een in Frankrijk goed bekende selleriesoort, die de eigenaardigheid heeft om slechts 1 rij van vaatbundels te bezitten, werd in de buurt van het cambium door naaldeprikken met *Bacterium tumefaciens* besmet. De ontstane tumoren gaven herhaaldelijk misvormde blaadjes en wortels te zien in het wortelgedeelte van de knol (Pl. XVIII, fig. 3). Bij 10 niet besmette helften, die met sterile naalden op de overeenkomstige plaatsen werden beprikt, verkreeg ik geen vorming van blaadjes en wortels. In hoeverre dit een absoluut bewijs is voor de uitspraak, dat de hier betreffende cellen slechts het vermogen krijgen adventiefknoppen te vormen na het ontstaan van kankerachtige gezwellen zou slechts uit te maken zijn

na een veel grooter aantal proeven. Ik wijs in dit verband op het feit, dat SMITH (19) geregeld teratomen heeft verkregen bij bloemhoofden van de zonnebloem door besmetting met *B. tumefaciens*, maar dat hij ze ook een enkele keer verkreeg door te prikken met sterile naalden.

VACCINATIE.

Is vaccinatie bij de plant tegen *B. tumefaciens* mogelijk? Hierover zijn de meeningen verschillend. Onder anderen heeft ARNAUDI (1) waargenomen, dat stengels van *Pelargonium zonale*, die reeds tumoren van *B. tumefaciens* bezitten, niet meer vatbaar zijn voor een 2° infectie op 3 à 4 cm. onder de oude tumor.

NOBÉCOURT (10) kon dit niet bevestigen, evenwel zou dit hieraan te wijten kunnen zijn, dat hij de tweede infectie op een te groote afstand van de eerste heeft verricht.

Ik bereidde een vaccin van *B. tumefaciens*, dat een concentratie van ± 5 milliard per c.c. bevatte. Ricinusplanten werden met $\pm \frac{1}{2}$ c.c. hiervan bij kleine beetjes ingespoten. Na 1 week werd dit herhaald. Een gedeelte van dit vaccin kwam terecht in de stengelholte. Na 3 weken werden de planten op de ingespoten plaatsen met bouillonculturen van *B. tumefaciens* besmet. Er ontstonden na 3 weken prachtige tumoren, zoodat de vaccinatie niet als geslaagd is te beschouwen.

TOXINEN.

Scheidt de bacterie toxinen af, die bij de planten kanker verwekken? SMITH et al. (14) is er in geslaagd om met verschillende chemische stoffen bij *Ricinus communis* min of meer karakteristieke gezwellen op te wekken. Hij analyseerde de voedingsbodems, waarop *B. tumefaciens* gegroeid was en probeerde verschillende der door de analyse verkregen stoffen; met vele verkreeg hij positieve resultaten (ammoniakale zouten, aldehyden, zuren).

Ik verkreeg geen overtuigende resultaten bij een op de volgende wijze verricht onderzoek. *B. tumefaciens* werd in verschillende buizen bouillon geënt. Na 3 dagen werd van 1 buis de inhoud door een kaars (L. 3) gefiltreerd en met het filtraat werden geraniumplanten geïnfecteerd. Dit geschiedde door wondjes op de jonge deelen te maken, die met de vloeistof werden overgoten of door zeer kleine hoeveelheden in te spuiten, wat zeer lastig was, aangezien slechts zeer weinig door de plant werd opgenomen. Het-

zelfde werd gedaan met culturen van 8, 14 en 28 dagen ouderdom. Geen der planten gaf bepaalde tumoren, wel gaven enkele iets gezwollen deelen op de verwonde plekken. Evenwel verkreeg ik deze ook door zuivere bouillon in te spuiten of over wondjes te gieten. De plantendeelen, die met deze eventueel aanwezige toxinen waren behandeld, waren niet minder vatbaar voor de aantastig van *B. tumefaciens* dan de niet behandelde. Ook hier ontstonden na infectie prachtige kankerachtige gezwellen.

HYPOTHESEN OVER HET ONTSTAAN VAN PLANTENKANKER.

Van de betreffende hypothesen noem ik de 3 volgende:

a. die van SMITH (14), die de vorming van hyperplasie bij toediening van chemische stoffen aan het verlies van water toeschrijft, waardoor een verhooging van de concentratie en van den zuurgraad van het celvocht ontstaat. *B. tumefaciens* vormt in de cellen zure produkten, die eveneens de genoemde verhoogingen veroorzaken.

b. die van D'HÉRELLE en PEYRE (6), die de aanwezigheid van een bacteriophage o.a. bij *B. tumefaciens* in tumoren van bieten constateerden. Zij schreven het ontstaan van bacterieele tumoren bij plant en dier aan de werking van een filtreerbaren vorm van de betreffende bacteriën toe. „Nos observations suggèrent l'hypothèse que le véritable parasite ne serait pas la forme bactérienne normale du *B. tumefaciens*, mais la forme protobactérienne filtrante de cette bactérie.” Over deze laatste vorm vermelden genoemde onderzoekers het volgende: „On sait d'autre part que l'infection de bactéries par le bactériophage provoque l'apparition de formes filtrantes invisibles, de formes protobactériennes . . .”.

Tevergeefs werd door mij naar een bacteriophage gezocht in boven den grond gegroeide kankerachtige uitwassen bij geraniumplanten, ontstaan door infectie met den stam van *B. tumefaciens* van het laboratorium van Dr. MAGROU. Van 20 tumoren trachtte ik de phaag van *B. tumefaciens* te vinden volgens dezelfde methode als waarmee ik herhaaldelijk phagen vond voor Shiga en colistammen, met dit verschil, dat ik met *B. tumefaciens* bij een temperatuur van 24° C. werkte.

Behalve D'HÉRELLE en PEYRE heeft ook ISRAELSKY (7) de aanwezigheid van een phaag van *B. tumefaciens* aangetoond in tumoren van bieten. Evenwel werkten deze onderzoekers met in of bij den grond gegroeide kankerachtige gezwellen, zoodat het niet onmogelijk is, dat de hierbij gevonden phagen van den grond

zijn binnengedrongen. Dat in grond een phaag van *B. tumefaciens* kan gevonden worden, bewezen COONS en KOTILA (3).

De mij door Dr. MAGROU ter hand gestelde *B. tumefaciens*, waarmee ik de tumoren bij de geraniumplanten verkreeg, was volgens de terminologie van D'HÉRELLE „ultra-pure”. Een phaag kon ik hier volgens de methode van FLU (4) niet aantoonen ten opzichte van de volgende stammen:

no. 2004	}	mij ter hand gesteld door Dr. A. J. RIKER, Madison, Wisc. U.S.A.
no. 2018		
no. 2024		
no. 2050		
Wijnstok	}	mij ter hand gesteld door Dr. C. STAPP, Berlin-Dahlem.
Appel		
Chrys. frut. IIa		
Chrys. frut. IIb		
Framboos,		mij ter hand gesteld door Prof. JOHANNA WESTERDIJK, Baarn.

Het bleek mij dus mogelijk tumoren bij planten te verwekken met ultra-zuivere, niet met een bacteriophaat in symbiose levende stammen van *B. tumefaciens*, in tegenstelling met D'HÉRELLE en PEYRE's opvatting.

c. de hypothese van MAGROU (9) legt vooral den nadruk op het feit, dat de bacteriën in de plantentumoren slechts te vinden zijn in de peripherie, dus op een afstand van de zich snel deelende cellen. De bacteriën bevorderen dus den groei op een afstand. Deze afstandswerking verklaart MAGROU als een gevolg van de mitogenetische stralen van GURWITSCH. MAGROU heeft kunnen aantoonen, dat bouillonculturen van *B. tumefaciens* stralen uitzenden, die het ontstaan van mitosen bevorderen. De juistheid van de opvattingen van GURWITSCH (5), bevestigd door REITER en GABOR (12), schijnt mij thans bewezen te zijn. Hierop hoop ik later terug te komen.

SAMENVATTING.

- 1°. Gebleken is, dat binnen in het wortelgedeelte van de knol van een selleriesoort abortieve plantendeelen — bladeren en wortels — kunnen ontstaan, waarschijnlijk slechts uit tumorcellen gevormd door de werking van *B. tumefaciens*.
- 2°. Geen actieve immuniseering bij *Ricinus communis* t.o.v. *B. tumefaciens* kon in de door mij genomen proeven aangetoond worden.

- 3°. In bouillonculturen van 3, 8, 14 of 28 dagen oud bleken toxinen, die dezelfde werking als de bacteriën op de plant zouden kunnen uitoefenen, niet aanwezig te zijn of bij éénmalige toediening niet voldoende werkzaam te zijn.
- 4°. Ook met ultra-zuivere stammen van *B. tumefaciens* zijn tumoren bij planten te verwekken in tegenstelling met D'HÉRELLE en PEYRE's opvatting.

SUMMARY: EXPERIMENTS WITH BACTERIUM TUMEFACIENS.

- 1°. In the root-part of celery tubers abortive parts of the plants — leaves and roots — were formed, probably only in galls, obtained by infection with *B. tumefaciens*.
- 2°. Whether or not artificial immunization in plants is possible is not settled yet. Some investigators claim to have succeeded in artificially immunizing plants, others obtained negative results. The results of the present writer with *Ricinus communis* and *B. tumefaciens* were negative also.
- 3°. No toxins having a similar action on the plants as *B. tumefaciens* were found to occur in bouillon-cultures of 3, 8, 14 or 28 days old.
- 4°. Cultures of *B. tumefaciens* which are ultra-pure in the sense of D'HÉRELLE may produce tumors in plants. This is contradictory to D'HÉRELLE and PEYRE's hypothesis on the formation of galls. The writer favours MAGROU's hypothesis on gall-formation as a consequence of the action of mitogenetic rays, radiated by *B. tumefaciens*.

LITERATUURLIJST.

1. ARNAUDI, C., Sull' immunità acquisita nei vegetali. Atti della Soc. ital. di Scienze nat., 1925.
2. CARBONE, D., „Über die aktive Immunisierung der Pflanzen", Centr. bl. f. Bakt. 2e. Abt. 76, 1929, p. 428.
3. COONS, G. H. and KOTILA, J. E., „The transmissible lytic principle (bacteriophage) in relation to plant pathogenes." Phytopathology 15, 1925, p. 357.
4. FLU, F. C., „Een methode voor het onderzoek van reinkulturen op besmetting met een bakteriophag." Tijdschr. v. vergel. Geneeskunde etc. 10, Afl. 2—3.
5. GURWITSCH, A., „Das Problem des Zellteilung" (Springer, Berlin, 1925).
6. D'HÉRELLE, F. et PEYRE, E., „Contribution à l'étude des tumeurs expérimentales". C. R. Ac. Sc. 185, 1927, p. 227.
7. ISRAELSKY, W. P., „Bakteriophagie und Pflanzenkrebs". Centralbl. f. Bakt. 2°. Abt. 67, 1926, p. 236.

8. MAGROU, J., Bull. d'histologie appl. 4, 1927.
9. MAGROU, J., „Le cancer des plantes'', Le Cancer No. 1, 1928.
10. NOBÉCOURT, P., „Contribution à l'étude de l'immunité chez les végétaux'' (Barlier, Tunis, 1928).
11. PICADO, C., „Anticorps expérimentaux chez les végétaux''. Ann. de l'Inst. Pasteur 35, 1921, p. 893.
12. REITER, T. und GABOR, D., „Zellteilung und Strahlung''. (Springer, Berlin, 1928).
13. SARDIÑA, J. Rodriguez, „Zur Frage der Antikörperbildung bei Pflanzen''. Angewandte Botanik 8, 1926, p. 289.
14. SMITH, E. F., BROWN, N. A., McCULLOCK, L., „The structure and developing of crown gall'', U. S. Dept. Agric. Bur. of Plant Industry. Bull. 255, 1912.
15. SMITH, E. F., „Studies on the crown gall of plants in relation to human cancer.'' J. of Cancer Res. 1, 1926, p. 231.
16. SMITH, E. F., „Further evidence that crown gall of plants is cancer''. Science N. S. 43, 1916, p. 871.
17. SMITH, E. F., „Mechanism of tumorgrowth in crown gall''. J. of Agr. Res. 8, 1917, p. 165.
18. SMITH, E. F., „Embryomas in plants''. The John Hopkins Hospital Bull. 28, 1917.
19. SMITH, E. F., „Tumors, cysts, pith-bundles and floral proliferations in *Helianthus*''. Mem. Nat. Acad. of Sci. Washington 22, 1927.

FIGUURVERKLARING

PLAAT XVIII

Fig. 3. Misvormd blaadje en worteltje, ontstaan uit een kanker van *B. tumefaciens* op een sellerieknol.

EXPLANATION OF FIGURE

PLATE XVIII

Fig. 3. Malformed leaflet and root, developed from a gall of *B. tumefaciens* on a celerytuber.

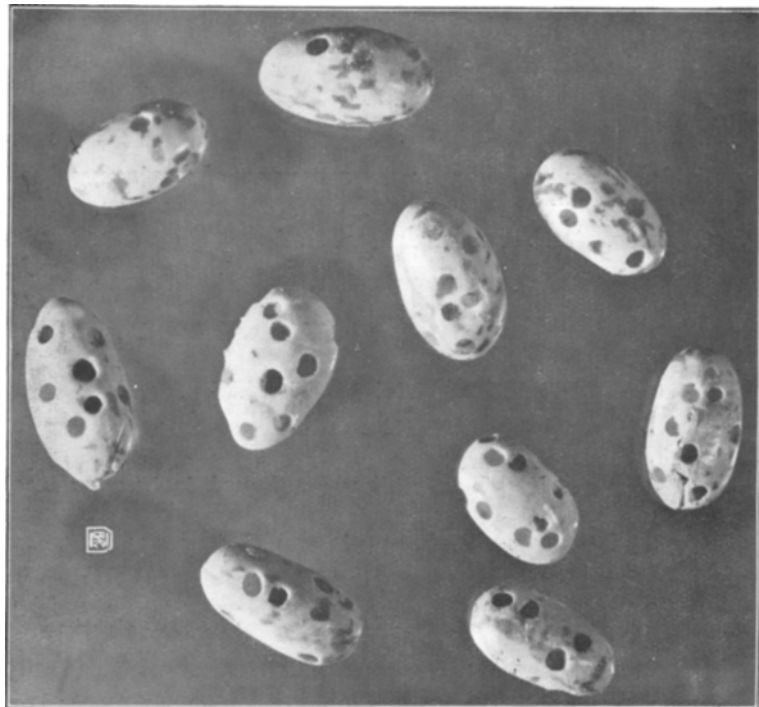


Fig. 1

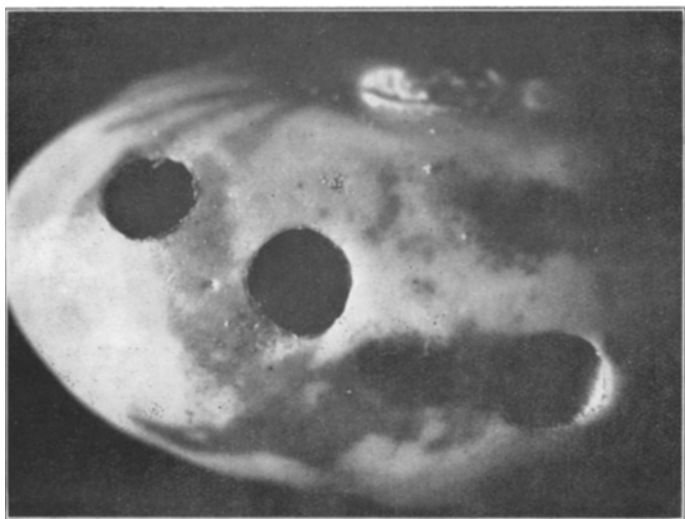


Fig. 2



Fig. 3