

ELECTRONEN-MICROSCOPISCH ONDERZOEK VAN HET VIRUS, DAT DE RATELZIEKTE VAN DE TABAK EN HET STENGELBONT VAN DE AARDAPPEL VEROOorzaakt ¹⁾2)

With a summary: An electron microscope study of the virus causing rattle disease of tobacco and stem-mottle of potato

DOOR

Ir J. P. H. VAN DER WANT en Ir A. ROZENDAAL

(Laboratorium voor Mycologie en Aardappelonderzoek, Wageningen) ³⁾

INLEIDING

Door ROZENDAAL en VAN DER WANT (5) werd op grond van vergelijkende besmettingsproeven bij tabaks- en aardappelplanten en na vergelijking van de etiologie der beide ziekten, geconcludeerd, dat de ratelziekte van de tabak en het stengelbont van de aardappel door hetzelfde virus worden veroorzaakt. Voorts toonden zij aan, dat van dit virus verschillende stammen voorkomen, die zich onderscheiden door de symptomen, veroorzaakt op enkele waardplanten.

Enige stammen van dit virus zijn met behulp van de electronenmicroscop te Delft onderzocht.

De bestudering van plantenviren met de electronenmicroscop is de laatste jaren vooral in de Angelsaksische landen belangrijk toegenomen. Het ligt niet in de bedoeling deze onderzoeken alle te beschrijven. Slechts zij hier vermeld, dat STANLEY en medewerkers (4 en 6) de lengte van de deeltjes van het tabaks-mozaïekvirus met de electronenmicroscop hebben vastgesteld, terwijl CROOK en SHEFFIELD (3) de aggregatie van hetzelfde virus bestudeerden. TAKAHASHI en RAWLINS (7) vonden, dat de deeltjes van twee „strains” van het aardappel X-virus, die symptomatologisch duidelijk te onderscheiden zijn, niet wezenlijk in grootte verschillen. Dezelfde onderzoekers (8) constateerden hetzelfde voor twee „strains” van het tabaksmozaïekvirus.

MATERIAAL EN METHODEN

Om plantenviren met de electronenmicroscop zichtbaar te maken is het vereist, het perssap van viruszieke planten te zuiveren. Het doel hiervan is, sapbestanddelen te verwijderen, die hinderlijk zijn, doordat zij de virusdeeltjes overdekken en aldus onzichtbaar maken. Deze zuivering kan soms in voldoende mate worden bereikt door het neerslaan van het chlorophyl in een centrifuge bij 3500 toeren per minuut. Dit neerslaan wordt bevorderd door de viruszieke planten vóór het uitpersen te bevriezen of door het perssap van zieke planten te verhitten tot 60 °C gedurende 10 minuten. De laatste methode is slechts bruikbaar als het thermale inactiveringspunt van het te onderzoeken virus boven 60 °C ligt. In beide gevallen bereikt men een coagulatie van het chlorophyl, waardoor dit zich sneller laat afcentrifugeren.

¹⁾ Ontvangen voor publicatie Juli 1948.

²⁾ De foto's werden vervaardigd met de electronenmicroscop van de Technisch Physische Dienst T.N.O. en T.H., afd. Electronenmicroscopie te Delft.

³⁾ Onderzoek, bekostigd door de afdeling Tuinbouwkundig Onderzoek van de Directie van de Tuinbouw te 's-Gravenhage.

Van het aldus helder gemaakte sap kan men doorgaans echter niet zonder meer preparaten voor de electronenmicroscop vervaardigen. Het bevat nog, naast eiwitten en koolhydraten, minerale bestanddelen, welke een belemmering voor het zichtbaar maken van de virusdeeltjes kunnen vormen. Soms voldoet een verdunning van het van chlorophyl bevrijde sap met gedestilleerd water, doch de kans een fraai preparaat te verkrijgen, waar behoorlijke foto's van gemaakt kunnen worden, is ook dan nog gering.

Een verbetering verkrijgt men door na de verwijdering van het chlorophyl de zuivering voort te zetten en het virus neer te slaan met ammoniumsulfaat of met andere chemicaliën (1).

Dit kan echter een bezwaar vormen, daar door deze bewerking de kans op aggregatie van virusdeeltjes groter wordt, hetgeen vnl. van betekenis is bij de staafvormige viren. Hierop is vooral door BAWDEN en PIRIE (2) gewezen.

Aggregatie van virusdeeltjes kan eveneens optreden als men het virus met de ultracentrifuge tracht te zuiveren.

Het komt dus hier op neer, dat men experimenteel voor elk virus afzonderlijk een zuiveringsmethode dient te vinden, die de virusdeeltjes in een toestand laat, waarin zij verkeerden tijdens het uitpersen van het plantenmateriaal.

Van het gezuiverde en eventueel verdunde virushoudende sap werd een druppeltje op de membraan van de preparaathouder gebracht; het virus werd hierna aan de lucht gedroogd. Enkele dagen hierna werden de preparaathouders naar Delft overgebracht, waar zij volgens de techniek van het „shadow-casting” met een goudlaagje werden bedekt. Daarna werden de preparaten met de electronenmicroscop onderzocht en foto's vervaardigd.

Voor het onderzoek van het ratelvirus en het stengelbontvirus werden de bovengeschetste zuiveringsmethoden (behalve die met de ultracentrifuge) toegepast. In een vorige publicatie (1) is beschreven hoe het ratelvirus van de tabak gezuiverd kan worden. Na verhitting op 60 °C van het perssap van ratelzieke tabaksplanten gedurende 10 minuten, gevolgd door afcentrifugeren van het chlorophyl wordt per 100 cm³ helder sap 25 g ammoniumsulfaat toegevoegd. Het neerslag, dat hierbij ontstaat en dat het virus bevat, wordt afgecentrifugeerd en na afschenken van de bovenstaande heldere vloeistof in een geringe hoeveelheid water opgenomen. Zwevende bestanddelen worden vervolgens afgecentrifugeerd, waarna de virushoudende vloeistof gedurende 12 uur gedialyseerd wordt t.o.v. leidingwater en daarna een even lange tijd t.o.v. gedestilleerd water. Van het aldus gezuiverde virus kunnen, eventueel na verdunning, bevredigende opnamen worden gemaakt.

Dezelfde zuiveringsmethode werd toegepast op het sap van stengelbontziek aardappelloof van de rassen Beteka, Bevelander, Magneto en Eersteling en op sap van tabaksplanten, die besmet waren met stengelbontvirus van verschillende herkomst. Het bleek uit inoculatieproeven op tabaksplanten, dat het stengelbontvirus de zuivering, zonder merkbare verandering in virulentie, weerstond. Tevens volgde uit deze infectieproeven, dat zich in de gezuiverde preparaten van het stengelbontvirus van de herkomst Magneto en dat van de herkomst Eersteling tevens aardappel-X-virus bevond. Zoals bekend, is het ras Eersteling carrier van dit laatste virus en uit de proeven, beschreven in een vorige publicatie (5) was gebleken, dat de Magneto-plant niet alleen met stengelbontvirus, doch ook met X-virus besmet was.

Na de zuivering werden de gezuiverde viruspreparaten gedurende 2½ maand

bij 0° tot 2 °C bewaard. Hierna waren zowel het ratelvirus en de verschillende stengelbontviren als het X-virus nog steeds virulent, hetgeen volgde uit inoculatieproeven op tabaksplanten.

Ter contrôle werd ook sap van gezonde tabaks- en aardappelplanten langs chemische weg gezuiverd. Het gezuiverde sap van „gezonde” Eersteling bleek slechts X-virus te bevatten, evenals het gezuiverde sap van een Magnetoplant, die van stengelbont was genezen.

RESULTATEN VAN HET ELECTRONENMICROSCOPISCH ONDERZOEK

Ratel- en stengelbontviruspreparaten, die volgens de chemische methode gezuiverd waren en korte tijd daarna onderzocht werden, bleken rechte, staafvormige deeltjes te bevatten, waarvan de lengte per preparaat varieerde. In de Eersteling- en Magneto-preparaten werden bovendien draadvormige min of meer gegolfde deeltjes waargenomen. De preparaten van de gezonde tabaks- en aardappelplanten bevatten de staafvormige deeltjes niet en evenmin de draadvormige,

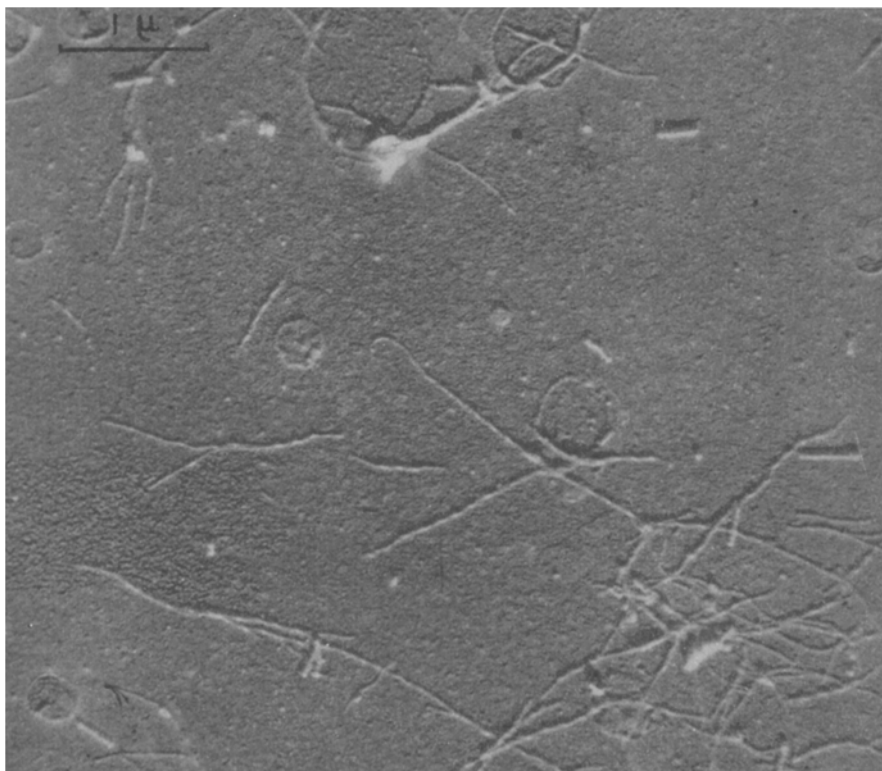


Fig. 1. Electronenfoto, gemaakt met de electronenmicroscop te Delft. Staafvormige stengelbontvirusdeeltjes en draadvormige X-virusdeeltjes, afkomstig van een aardappelplant, ras Magneto.

Photomicrograph made with the electron microscope at Delft (Holland). Rod-shaped particles of the stem-mottle virus and curled, thread-like particles of the X-virus from a potato plant of the variety Magneto.

Fig. 2. Electronenfoto's, gemaakt met de electronenmicroscop te Delft.

A. Ratelvirusdeeltjes. B. Deeltjes van het stengelbontvirus, herkomst Bevelander. *Photomicrographs made with the electron microscope at Delft (Holland).*

A. Particles of the rattle virus. B. Particles of the stem-mottle virus, Bevelander strain.

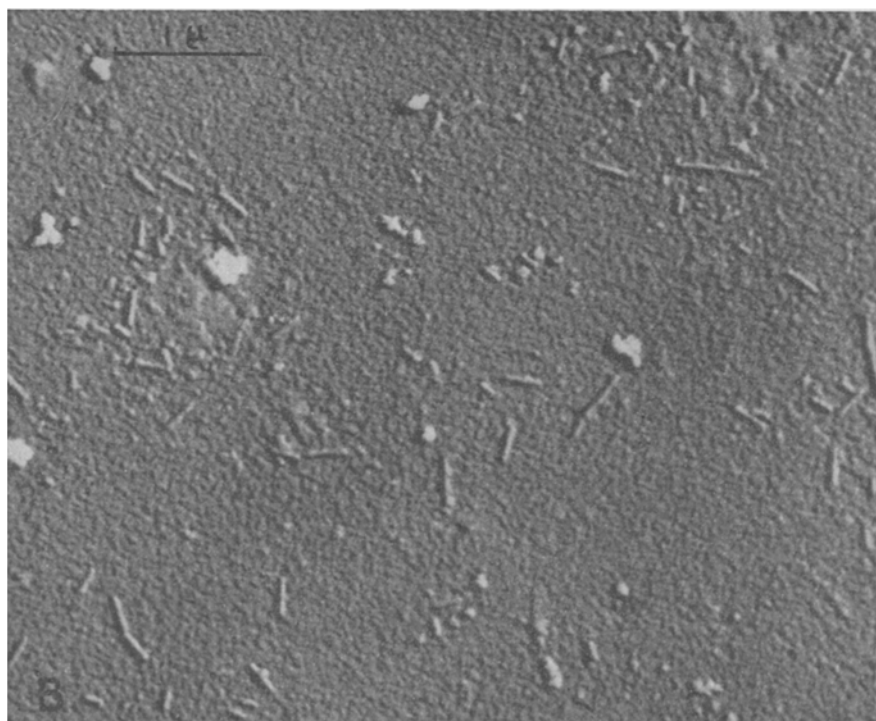
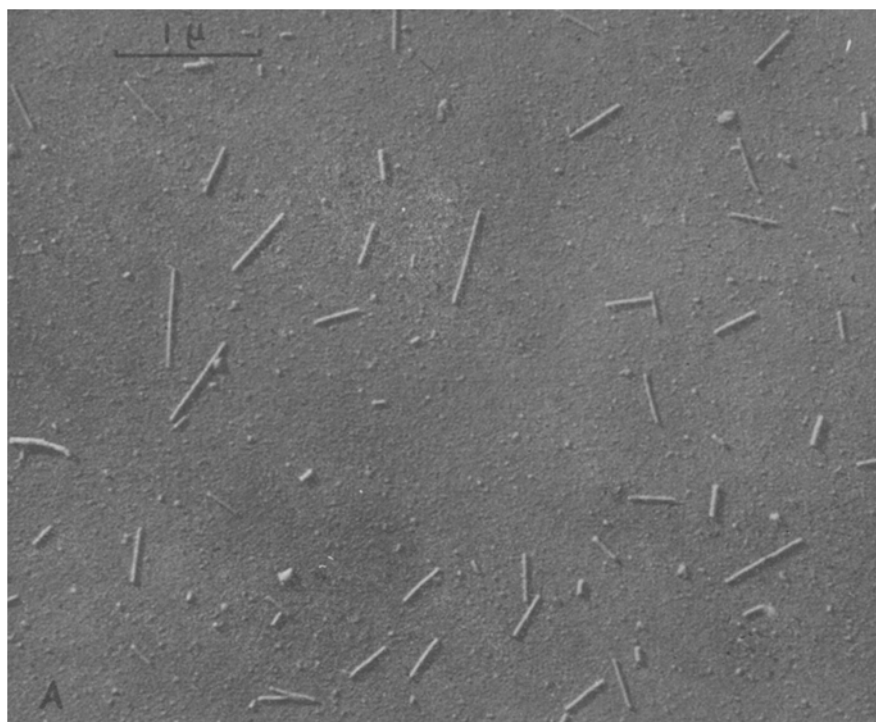


Fig. 2. Verklaring zie hiernaast.

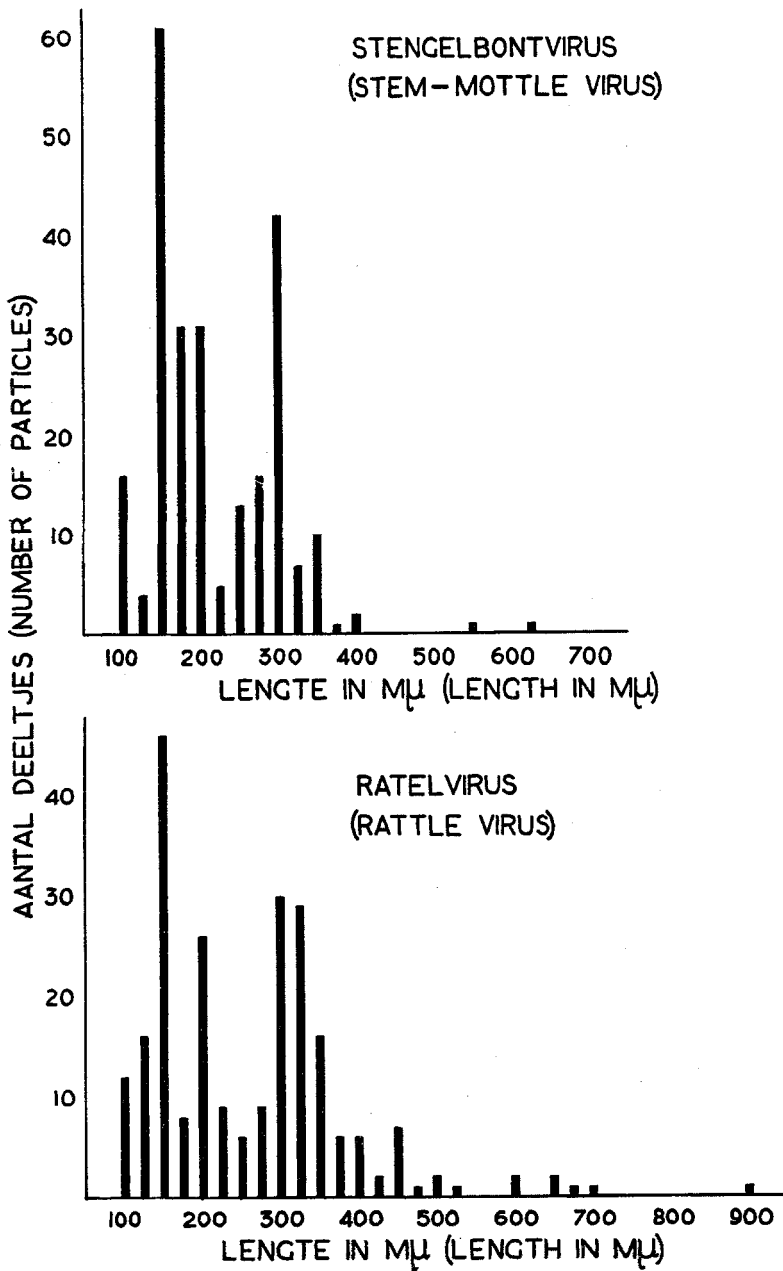


Fig. 3. Grafische voorstellingen van de lengte van 239 ratelvirusdeeltjes en 241 deeltjes van het stengelbontvirus, herkomst Bevelander.
Length distribution curves of 239 particles of the rattle virus and 241 particles of the stem-mottle virus, Bevelander strain.

gegolfde deeltjes. Deze laatste kwamen echter wel voor in de preparaten van de „gezonde” Eersteling en van de Magnetoplant, die van stengelbont was genezen. Men kan hieruit concluderen, dat de draadvormige partikels het X-virus vertegenwoordigen; ze komen overeen met de deeltjes, die TAKAHASHI en RAWLINS (7) in het sap van met aardappel-X-virus besmette tabaksplanten waarnamen. Voorts wijzen onze waarnemingen er op, dat de rechte, staafvormige deeltjes in de preparaten van ratel- en stengelbontzieke planten het ratel-stengelbontvirus vertegenwoordigen.

Electronenmicroscopisch onderzoek van de viruspreparaten, die $2\frac{1}{2}$ maand bij 0° tot 2°C bewaard waren, toonde aan dat de lengte der ratel- en stengelbontvirusdeeltjes gedurende die tijd niet merkbaar veranderd was. Wel waren de X-virusdeeltjes, afkomstig van Magneto en Eersteling, belangrijk langer geworden; deze deeltjes waren blijkbaar voor het belangrijkste gedeelte tot grotere geaggregeerd. Figuur 1 geeft een foto van het viruspreparaat van Magneto: de geaggregeerde X-virusdeeltjes, die als een verwarde hoop draadjes bij elkaar liggen, zijn duidelijk te onderscheiden; daartussen bevinden zich enkele stengelbontvirusstaafjes.

In een tweede onderzoek werd het sap van *Nicotiana rustica*-planten, respectievelijk besmet met ratelvirus, afkomstig van *Nicotiana tabacum* en stengelbontvirus, afkomstig van het aardappelras Bevelander, zonder chemische middelen snel gezuiverd van chlorophyl. Volgens het symptomatologisch onderzoek (5) betrof het hier twee virusstammen, die duidelijk van elkaar verschillen met betrekking tot hun gedrag t.o.v. *Nicotiana tabacum*. De *N. rustica*-planten waren vóór het uitpersen gedurende een nacht bewaard bij -20°C . Het perssap van deze planten werd bij 3500 toeren per minuut gedurende ongeveer 20 minuten gecentrifugeerd. De gedecanteerde heldere vloeistoffen werden direct hierna onverdund en in de verdunningen 1 : 10 en 1 : 50 met gedestilleerd water op de membranen van de preparaathouders gebracht. Electronenmicroscopisch onderzoek leverde het volgende op: in de onverdunde preparaten waren geen virusdeeltjes zichtbaar, er bevond zich nog te veel storend materiaal in. De verdunningen gaven betere resultaten; hiernaar zijn de foto's van figuur 2 gemaakt.

Van het ratelvirus werden 239 staafjes gemeten en van het stengelbontvirus herkomst Bevelander 241 staafjes. Naast deze staafjes zijn op de foto's hier en daar min of meer bolvormige deeltjes met een diameter van ongeveer $25\text{ m}\mu$ te zien. Het is mogelijk, dat deze in betrekking staan tot het virus; een andere mogelijkheid is, dat zij normale celbestanddelen vertegenwoordigen. Slechts staafvormige deeltjes werden gemeten en hiernaar zijn de grafieken in fig. 3 opgesteld.

Bij de beschouwing van deze grafieken dient men te bedenken, dat de metingen van de deeltjes met een in mm verdeelde lineaal zijn verricht, waarbij de lengte tot op een halve mm geschat kon worden. Voorts zijn de deeltjes op de foto's niet steeds scherp begrensd, waardoor de metingen niet altijd even nauwkeurig kunnen geschieden. Bovendien zijn de aantallen gemeten deeltjes aan de lage kant. Men dient dus de betrouwbareheid van deze grafieken in het oog te houden. Eén conclusie is echter wel te trekken. Beide grafieken zijn twee-toppig: één top ligt bij circa $150\text{ m}\mu$ en één bij circa $300\text{ m}\mu$. Voorts is er een aanwijzing, dat in het algemeen het ratelvirus meer grotere deeltjes bevat dan het stengelbontvirus, herkomst Bevelander, m.a.w. de variatie-breedte van de lengte der ratelvirusdeeltjes zou groter zijn.

De verklaring van het feit, dat de foto van het stengelbontvirus minder

scherp is dan die van het ratelvirus ligt hierin, dat de laatste gemaakt is bij een sterkere electronenmicroscopische vergroting dan de eerste. Teneinde vergelijkbare foto's te verkrijgen moest dus de opname van het stengelbontvirus langs fotografische weg sterker vergroot worden dan die van het ratelvirus.

Het lijkt alsof de breedte van de virusdeeltjes op de foto's tamelijk varieert. Dit is in werkelijkheid waarschijnlijk echter niet het geval. Volgens Dr A. L. HOUWINK te Delft is de verklaring de volgende: de virusdeeltjes liggen schots en scheef over het veld verspreid, waardoor de „schaduwten”, die zij ten gevolge van het „shadow-casting” werpen, niet alle even groot zijn, hetgeen de indruk maakt alsof de breedte der deeltjes (respectievelijk de hoogte) wisselt.

Naar schatting zijn de deeltjes circa 20 m μ breed.

Amerikaanse (6, 8) auteurs achten het blijkbaar verantwoord, naar aanleiding van electronenmicroscopische opnamen, de afmetingen der virusdeeltjes tot op m μ nauwkeurig te vermelden. Uit dit onderzoek is echter gebleken, dat men van deze afmetingen slechts een globale indruk kan verkrijgen, m.a.w. men dient zich steeds van de relatieve waarde der verkregen gegevens bewust te zijn. Dit houdt evenwel niet in, dat de resultaten van het electronenmicroscopisch virus-onderzoek voor de kennis der viren niet van grote betekenis zou zijn.

SUMMARY

In a previous paper (5) the writers showed that the rattle disease of tobacco and the stem-mottle disease of potato are caused by the same virus. Of this virus some strains exist. In the following the strain of this virus, derived from tobacco is still called rattle virus and the strains from potato, stem-mottle virus.

Sap from tobacco plants (*Nicotiana tabacum* and *N. rustica*) inoculated with rattle virus was purified in two different ways for examination under the electron microscope. 1. The virus was chemically purified by salting out with ammonium sulphate (see Reference 1). 2. In a quicker method the plants were kept overnight at -20 °C; after thawing, the sap was expressed and centrifuged at 3500 r.p.m. The clear, chlorophyll-free sap was then mounted directly on the membranes, either undiluted or in the dilutions 1 : 10 and 1 : 50, and dried in the air. The mounted viruses were prepared with gold by the shadowcasting technique and studied with the electron microscope at the „Technisch Fysische Dienst” T.N.O. en T.H. at Delft.

The stem-mottle virus of potato, also, can be concentrated with the aid of ammonium sulphate without losing its infectivity. This method and the quick one were used on sap from the leaves of potato plants of the varieties Beteka, Bevelander, Duke of York and Magneto, all infected with stem-mottle virus. It should be mentioned that the variety Duke of York is a symptomless carrier of potato virus X and that inoculation experiments showed that the Magneto plant also was infected with potato virus X. Stem-mottle virus from these four sources was also inoculated into *N. tabacum* and *N. rustica* plants, and the sap was purified in the two ways mentioned.

Electron microscopy of these virus preparations gave the following results:

1. Rattle and stem-mottle virus particles were found to be rodshaped; the length of the rods varied in each preparation. In the preparations of the stem-mottle virus from the potato varieties Duke of York and Magneto, thread-like, curled X-virus particles, as shown by TAKAHASHI and RAWLINS (7), were seen. These were easily distinguishable from the rods of the stem-mottle virus.

2. No obvious aggregation of rattle and stem-mottle virus particles took place during 2½ months' storage of the chemically purified sap kept at 0°–2 °C. On the other hand there was a distinct aggregation of the X-virus particles in the same period (see fig. 1).

3. Rattle and stem-mottle virus rods were found to have the same appearance whether the sap of diseased plants was purified by the chemical method or by the quick method.

Sap from *N. rustica* plants inoculated either with the rattle virus of tobacco or the stem-mottle virus of potato, var. Bevelander, which produce very different symptoms on *N. tabacum* (5), was purified by the quick method and photographed under the electron microscope. Photomicrographs of the particles of both viruses are reproduced in fig. 2. The lengths of 239 particles of the rattle virus and 241 particles of the stem-mottle virus were measured from the photographs. The measurements were made with a ruler divided in mm., the lengths of the particles being taken to the nearest half mm. Not all particles were sharply defined, so the measurements were not always exact; moreover, the number of particles measured was on the low side, so that the distribution curves have only a relative value. Nevertheless, we may conclude that there are two peaks in the distribution curves for particles length of both viruses, viz. one at about 150 m μ and one at about 300 m μ . It was not possible to determine the width of the virus particles exactly, but it was estimated to be about 20 m μ .

In addition to the rod-shaped particles, some globular particles were seen, but it is doubtful whether they are related to the viruses.

According to American authors (6, 8) it should be possible to determine the dimensions of virus particles in m μ exactly, from electron photomicrographs. This investigation shows, however, that exact measurements of particle dimension cannot always be made by electron microscopy.

LITERATUUR

1. ALGERA, L., T. H. THUNG en J. P. H. VAN DER WANT, Over het zuiveren van plantenviren. Tijdschr. Pl.ziekten 53: 133–139, 1947.
2. BAWDEN, F. C. and N. W. PIRIE: The separation and properties of tobacco mosaic virus in different states of aggregation. Brit. J. Exper. Path. 26: 294–315, 1945.
3. CROOK, E. M. and F. M. L. SHEFFIELD, Electron-microscopy of viruses. I. State of aggregation of tobacco mosaic virus. Brit. J. Exp. Path. 27: 328–338, 1946.
4. OSTER, G. and W. M. STANLEY: An electron microscope study of the contents of hair cells from leaves diseased with J. tobacco mosaic virus. Brit. Exper. Path. 27: 261–265, 1946.
5. ROZENDAAL, A. en J. P. H. VAN DER WANT, Over de identiteit van het ratel-virus van de tabak en het stengelbontvirus van de aardappel. Tijdschr. Pl. ziekten 54: 113–133, 1948.
6. SIGURGEIRSSON, T. and W. M. STANLEY, Electron microscope studies on tobacco mosaic virus, Phytopath. 37: 26–38, 1947.
7. TAKAHASHI, W. N. and T. E. RAWLINS, An electron microscope study of two strains of potato X virus. Amer. J. Bot. 33: 740–742, 1946.
8. TAKAHASHI, W. N. and T. E. RAWLINS, An electron microscope study of mutation in tobacco-mosaic virus. Phytopath. 37: 73–76, 1947.