

VIRUSVERSCHIJNSELEN IN FREESIA'S¹⁾

With a summary: Virus diseases in Freesias

door

Ir IJ. VAN KOOT, Ir D. H. M. VAN SLOGTEREN,

Mej. M. C. CREMER en Mej. J. CAMFFERMAN

Proefstation voor de Groenten- en Fruitteelt onder glas te Naaldwijk
en Laboratorium voor Bloembollenonderzoek te Lisse

INHOUD

Blz.

I. Inleiding	157
II. Ziektebeeld	158
III. De verspreiding van het virus	158
a. De verspreiding bij de vermenigvuldiging van de Freesia	158
b. De verspreiding door bladluizen	159
1. De op Freesia voorkomende bladluissoorten	159
2. Virusoverdracht op verschillende Freesia-rassen	159
3. Invloed van de duur van de zuigtijd en van het vasten	161
c. De verspreiding bij het afsnijden van de bloemen	161
1. Inoculatie op het blad	162
2. Inoculatie in de bloemstengel	162
IV. Viruszuivering en bereiding van antisera	163
a. Inleiding	163
b. Bereiding van een werkzaam „voorlopig” antiserum	164
c. Het zuiveren van virus en bereiding van antisera met behulp van gezuiverde virussuspensies	164
d. Bereiding van antisera tegen <i>Phaseolus-virus 2</i>	166
e. Monster-onderzoek	167
f. Onderzoek betreffende de identiteit van de viren welke bij de mo- zaiekverschijnselen betrokken zijn	167
V. Electronenmicroscopisch onderzoek betreffende virusverschijnselen in Freesia's	172
VI. De verbreiding van de virus-aantasting in de verschillende Freesia- rassen	173
a. Resultaten van het serologisch onderzoek	174
b. Ziektebeeld en mate van aantasting bij de verschillende rassen	177
VII. Waardplanten van de viren, welke de Freesia aantasten	179
VIII. Bestrijdingsmogelijkheden	180
IX. Samenvatting	183
Summary	184
X. Literatuur	192

I. INLEIDING

Het zgn. bont of mozaiek is een verschijnsel, dat de laatste jaren steeds meer in de Freesia-cultuur voorkomt, zodat het op het ogenblik één van de ernstigste ziekten van dit gewas is. Het beeld doet sterk aan een virusziekte denken, doch in de literatuur was practisch niets te vinden betreffende eventuele virusziekten

¹⁾ Ontvangen voor publicatie 2 November, 1953.

bij *Freesia*'s (KENNETH, M. SMITH, 1937). Dit was aanleiding om in 1947 op het Proefstation te Naaldwijk een onderzoek te beginnen naar de oorzaak en de wijze van verspreiding van deze ziekte.

Hierbij bleek dat er inderdaad van een virusziekte sprake was. Op het Laboratorium voor Bloembollenonderzoek te Lisse is men er toen spoedig in geslaagd een antiserum te bereiden. Het was nl. zeer gewenst om over een snelle methode te beschikken om de aanwezigheid en identiteit van het virus vast te stellen, o.a. om na te kunnen gaan welke afwijkingen in de verschillende *Freesia*-rassen een gevolg zijn van een virus-aantasting. Uit het serologisch onderzoek is gebleken, dat naast het *Freesia-virus* ook vaak het *Phaseolus-virus* 2 aanwezig is.

II. ZIEKTEBEELD

De ziekte uit zich op verschillende manieren, o.a. door het minder goed openspreiden van het bloemdek, een mozaïek-vlektekening op de bladeren en een verkleuring van de bloemen.

Het minder goed spreiden van de bloemkroon is wellicht het meest opvallende symptoom (afb. 8, 11 en 14). Bij een minder aandachtige beschouwing van de ziekte is dit vaak het enige beeld, dat men waarneemt. Door dit verschijnsel worden de bloemen minderwaardig. Wanneer de bloemdekklippen zich tijdens de bloei niet of onvoldoende openen spreekt de praktijk van „geknepen” bloemen of „knijpers”. Dergelijke bloemen gaan soms in het geheel niet open. De kroonbladeren zijn asymmetrisch en soms gerafeld (afb. 11). Zij zijn kleiner dan normaal. Hierdoor steken stamper en meeldraden soms boven de bloemkroon uit (afb. 14). Vaak ziet men echter als enige afwijking een vlekkening en streping van de bloem (breken van de bloemkleur, afb. 9 en 10).

Het mozaïekverschijnsel op de bladeren kan in vele gradaties voorkomen. Soms is er slechts een zeer zwakke vlekkening van donkerder en lichter groen, hetgeen speciaal daar waar het blad uit de schede komt, goed is te zien (afb. 7). In andere gevallen is de mozaïekvlekkening op het gehele blad duidelijk waar te nemen en soms eveneens op de bloemstengels. Er ontstaan dan lichtgrijze of geelgrijze, meestal langgerekte vlekken of strepen (afb. 6). Tenslotte kan dit bij gevoelige rassen in necrose overgaan (afb. 13).

Tengevolge van deze virusaantasting treedt in het algemeen een sterke vermindering van de groei op. Vooral de hevig aangetaste planten blijven kleiner en leveren minder knollen dan de gezonde planten. In alle opzichten is een aantasting door virus dus schadelijk.

III. DE VERSPREIDING VAN HET VIRUS

a. De verspreiding bij de vermenigvuldiging van de *Freesia*

Hieromtrent is geen speciaal onderzoek verricht. Er kan daarom niet met zekerheid worden verklaard, dat het virus niet met het zaad overgaat. Talrijke waarnemingen in de praktijk wijzen er echter op, dat een mogelijke overgang met het zaad niet van grote betekenis is. Men treft nl. practisch nooit virus-zieke planten aan in *Freesia refracta alba*, de witte zaai-*Freesia*, en in „Zaaigeel” of Buttercupgeel, als deze het eerste jaar bloeien. Wordt ditzelfde ras echter door middel van knollen voortgekweekt, dan treedt gewoonlijk binnen enkele jaren in ernstige mate virusaantasting op.

Dit wijst erop, dat het *Freesia-virus* evenals zovele viren in het vegetatieve

vermeerderingsmateriaal, in casu de knolletjes, aanwezig blijft. Bij de teelt van knol-Freesia's, de meest gebruikelijke teeltwijze, kan de virusaantasting dan ook ernstige afmetingen aannemen. Is een partij eenmaal besmet, dan ziet men de ziekte in de nakomelingschap steeds terugkeren en gewoonlijk in snel toenemende mate. Daar de zieke planten in het algemeen minder knolletjes vormen dan de gezonde, is deze sterke toename slechts door een verspreiding van het virus tijdens de teelt te verklaren.

Hierbij zou men enerzijds aan een verspreiding door bladluizen, die men op de Freesia veelvuldig kan aantreffen, kunnen denken, anderzijds aan een verspreiding bij het afsnijden van de bloemstengels. Beide mogelijkheden zijn onderzocht.

b. De verspreiding door bladluizen

Het werd zeer waarschijnlijk geacht, dat bladluizen een grote rol spelen bij het overbrengen van het virus. De ziekte heeft zich immers sterk uitgebreid in de jaren, dat er vanwege de oorlogsomstandigheden weinig nicotine voor bladluisbestrijding beschikbaar was. Eerst als men „dik in de luis zat”, werd nicotine verstrekt. Bovendien was in deze jaren de vraag naar bloemen zo groot, dat hiervoor hoge prijzen werden betaald, ongeacht of ze mooi of lelijk waren. Dit is voor het uitschieten van slechte planten niet bevorderlijk geweest.

1. De op Freesia voorkomende bladluissoorten

Er is daarom nagegaan, welke bladluizen het meest in de Freesia's voorkomen. De heer HILLE RIS LAMBERS was zo bereidwillig een aantal monsters bladluizen, die van Freesia-planten waren verzameld, voor ons te determineren. Volgens hem worden er een 4-tal soorten op Freesia's aangetroffen. Dit zijn *Macrosiphum euphorbiae* (THOS), *Aulacorthum solani* (KLTB.), *Myzus persicae* (SULZER) en *Aulacorthum circumflexum* (BUCKT.). Eerstgenoemde soort wordt in het Westland verreweg het meest waargenomen. Vooral op de bloemstengel kan men ze vaak in grote getale, dicht op elkaar gezeten aantreffen. Er bestaan hiervan 2 typen, een rood en een groen gekleurde, die overigens volgens HILLE RIS LAMBERS (1949) volkomen aan elkaar gelijk zijn. Beide typen komen op Freesia voor, vaak naast elkaar. Ook is meermalen *Aulacorthum solani* gevonden. Deze bladluis kan volgens HILLE RIS LAMBERS bij sommige gewassen door het zuigen en steken een zodanige beschadiging van het blad teweeg brengen, dat het beeld aan een virusaantasting doet denken. Iets dergelijks is bij de Freesia nog niet vastgesteld. In de weinige gevallen, dat een vrij sterke aantasting door *Aulacorthum solani* voorkwam, werd geen spoor van een op virus gelijkend ziektebeeld waargenomen.

2. Virusoverdracht op verschillende Freesia-rassen

Omdat *Macrosiphum euphorbiae* het meest werd aangetroffen, is nagegaan in welke mate deze bladluis tot de verspreiding van het virus kan bijdragen. Om het virus op te nemen, werden de bladluizen bij de eerste proeven op in de praktijk verzamelde, mozaiekzieke Amerikaanse Freesia's geplaatst. Later werden hiervoor, op het Proefstation te Naaldwijk gekweekte, mozaiekzieke Marionplanten, eveneens een Amerikaans type, gebruikt. Na deze „infection feeding” en na een periode van vasten werden de bladluizen op gezonde Freesia-planten in goed afgesloten kooien overgebracht, steeds 4 exemplaren per plant. Na de

bladluizen gelegenheid te hebben gegeven het virus over te brengen („test feeding”) werden ze verwijderd en vernietigd. Bij deze proeven is met meerdere *Freesia*-rassen gewerkt, terwijl de perioden van „infection feeding”, vasten en „test feeding” zijn gevarieerd.

Uit deze proeven is onomstotelijk gebleken, dat *Macrosiphum euphorbiae* in staat is het *Freesia-virus* over te brengen. Dit komt echter gewoonlijk niet tot uiting in hetzelfde jaar, dat het virus wordt overgebracht, althans niet wanneer dit wat laat in het seizoen gebeurt. Door de knollen van deze planten te rooien en later weer uit te poten kan de overdracht van het virus duidelijk worden vastgesteld. Bij het ene ras schijnt de virusoverdracht echter gemakkelijker te geschieden dan bij het andere, zoals uit de volgende cijfers blijkt (tabel 1).

TABEL 1

Table 1

	Aantal gezonde planten <i>Number of healthy plants</i>	Aantal zieke planten <i>Number of diseased plants</i>	% zieke planten <i>Percentage of diseased plants</i>
Proef (<i>Experiment</i>) 1948-'49			
Marion	15 (14)	10 (11)	40% (44%)
– contrôle (<i>check</i>) . . .	10 (14)	0 (0)	0% (0%)
Zaaigeel	14 (35)	2 (8)	12,5% (18,6%)
– contrôle (<i>check</i>) . . .	11 (12)	0 (0)	0% (0%)
Proef (<i>Experiment</i>) 1949-'50			
Marion	8	49 (80)	86% (91%)
– contrôle (<i>check</i>) . . .	29	1 (6)	3,3% (17%)
Caro Carlee	27	21 (47)	44% (63,5%)
– contrôle (<i>check</i>) . . .	28	5 (9)	15% (24%)

Bij de proef 1948-'49 hebben de tussen haakjes geplaatste cijfers betrekking op de planten, die uit de gevormde kralen gegroeid zijn. Bij de proef 1949-'50 zijn de planten niet tot bloei gekomen. De virusziekte kon daardoor niet steeds met volkomen zekerheid worden vastgesteld. Bij de tussen haakjes geplaatste cijfers zijn hier de waarschijnlijk zieke planten meegeteld.

Men ziet, dat alleen de uitkomsten bij Caro Carlee niet geheel betrouwbaar waren, omdat het uitgangsmateriaal niet voldoende virusvrij was. De virusoverdracht door bladluizen bij dit ras is echter nog door een andere, later te vermelden proef bevestigd. Duidelijk blijkt, dat het ras Marion zeer vatbaar is voor het virus. Dit is ook uit andere proeven gebleken. De cijfers van Zaaigeel en Caro Carlee zijn niet goed vergelijkbaar. Bij beide rassen vindt de virusoverdracht door bladluizen echter aanmerkelijk minder gemakkelijk plaats dan bij Marion. Er dient hierbij echter te worden opgemerkt, dat op het moment, dat de proeven werden genomen, nog niet bekend was dat ook het *Phaseolus-virus 2* een rol speelt. Later bleek (zie hoofdstuk VI), dat beide viren tesamen een veel duidelijker ziektebeeld te zien geven dan het *Freesia-virus* alleen. Dit laatste geeft op Marion wel steeds duidelijke symptomen, doch is op Zaaigeel meestal niet te herkennen. Het ras Caro Carlee neemt in dit opzicht een tussenpositie in. Het hoge percentage op het oog kennelijk zieke planten bij Marion zal dus wellicht eerder moeten worden toegeschreven aan een grotere gevoeligheid van dit ras voor het *Freesia-virus*. De geringe virusovergang, die bij Zaaigeel werd geconstateerd, zou er op kunnen wijzen, dat in het uitgangsmateriaal weinig of geen *Phaseolus-virus 2* aanwezig was, daar bekend is, dat dit virus goed door bladluizen kan worden overgebracht. Het is nochtans niet uitgesloten, dat dit

virus op Freesia door *Macrosiphum euphorbiae* moeilijker wordt overgebracht dan het *Freesia-virus*.

Typisch is, dat de kralen een wat hoger percentage zieke planten opleverden dan de eigenlijke knollen, terwijl de zieke planten in het algemeen juist minder kralen vormden. Dit was ook bij andere proeven steeds het geval.

3. Invloed van de duur van de zuigtijd en het vasten

De duur van het vasten heeft in het algemeen geen grote invloed op de mate van virusoverdracht uitgeoefend. In een proef, waarbij „niet vasten” en „24 uur vasten” werden vergeleken, werd geen betrouwbaar verschil gevonden, al was het percentage zieke planten bij 24 uur vasten iets lager. Men mag daarom wel aannemen, dat het virus „persistent” is in de bladluizen.

De voedingstijden schijnen wel invloed te hebben op het resultaat. Bij een proef met Caro Carlee was de „test feeding”-periode uitgedijd tot 3 weken, doordat verzuimd was de bladluizen op te ruimen. Het gevolg was, dat de planten voor 100 % besmet zijn geworden. Een lange periode van „infection feeding” schijnt de virusoverdracht eveneens te begunstigen, zoals uit een proef met Marion blijkt (zie tabel 2).

TABEL 2

Table 2

	Aantal gezonde planten <i>Number of healthy plants</i>	Aantal zieke planten <i>Number of diseased plants</i>	% zieke planten <i>Percentage of diseased plants</i>
1 dag „infection feeding” – 6 uur vasten – 7 dagen „test feeding”	3 (1)	3 (4)	50 % (80 %)
3 dagen „infection feeding” – 24 uur vasten – 7 dagen „test feeding”	10 (13)	0 (5)	0 % (28 %)
7 dagen „infection feeding” – 24 uur vasten – 3 dagen „test feeding”	2 (0)	7 (2)	78 % (100 %)

De tussen haakjes geplaatste cijfers hebben betrekking op de planten, die uit de kralen zijn gegroeid.

Uit deze cijfers is af te leiden, dat ook bij een korte periode van „infection feeding” virusoverbrenging heel goed mogelijk is, mits men de bladluizen niet te lang laat vasten.

c. De verspreiding bij het afsnijden van de bloemen

Bij de teelt van Freesia's hebben er weinig cultuurhandelingen plaats, waarbij het gewas verwondingen op zou kunnen lopen en het virus mechanisch van zieke op gezonde planten overgebracht zou kunnen worden. Feitelijk bestaat het gevaar hiervoor alleen bij het afsnijden van de bloemen. Daar elke plant meerdere bloemstengels vormt en het kruid dus niet direct afsterft na het afsnijden van de eerste bloemstengel, kan men zich heel goed voorstellen, dat het virus op deze wijze de plant en de knol kan binnendringen, hetgeen dan in de volgende teelt zal blijken. Overgang van het virus via het blad zal in de praktijk waarschijnlijk niet veel voorkomen, temeer daar het Freesiablاد zeer stug is. Om vast te stellen of mechanische overbrenging van het *Freesia-virus* in principe mogelijk is, is echter eerst getracht het virus via het blad over te brengen.

1. Inoculatie op het blad

Hiervoor is sap gebruikt, dat uit bladeren van viruszieke Amerikaanse Freesia's is geperst. De inoculatie geschiedde op tweeërlei wijze, nl. door het uitwrijven van 3 maal verdund sap, met een ruw gemaakt glazen staafje, op het blad en door 0,2 cc van hetzelfde sap met behulp van een injectienaald in de schede te spuiten. De resultaten bleken pas in de volgende teelt en zijn in tabel 3 vermeld.

TABEL 3

Table 3

	Aantal gezonde planten <i>Number of healthy plants</i>	Aantal zieke planten <i>Number of diseased plants</i>	% zieke planten <i>Percentage of diseased plants</i>
<i>Marion</i>			
uitwrijven (<i>rubbing</i>) . . .	27 (20)	2 (3)	7% (13%)
injecteren (<i>injection</i>) . . .	25 (18)	1 (5)	4% (22%)
contrôle (<i>check</i>)	10 (14)	0 (0)	0% (0%)
<i>Zaaiageel</i>			
uitwrijven (<i>rubbing</i>) . . .	24 (34)	1 (2)	4% (5,6%)
injecteren (<i>injection</i>) . . .	28 (31)	0 (0)	0% (0%)
contrôle (<i>check</i>)	11 (12)	0 (0)	0% (0%)

De tussen haakjes geplaatste cijfers hebben betrekking op de planten, die uit de kralen zijn gegroeid.

Uit deze cijfers blijkt, dat de mechanische overbrenging van het virus veel minder gemakkelijk slaagt dan de overdracht door bladluizen. Hoewel het percentage zieke planten gering is, mag men toch wel aannemen, dat mechanische virusoverbrenging heeft plaats gehad, gezien het feit, dat in de controle geen enkele zieke plant aanwezig was. Door uitwrijven schijnt de overdracht van het virus iets gemakkelijker plaats te hebben dan door injecteren.

Evenals bij de proeven met bladluizen is de mechanische overgang van het virus het best gelukt bij Marion. Ook de sterkere verspreiding van het virus naar de kralen wordt in deze proef bevestigd.

2. Inoculatie in de bloemstengel

Bij deze proef is sap gebruikt, dat uit bladeren van op het Proefstation te Naaldwijk gekweekte viruszieke Marion is geperst. De inoculatie geschiedde op tweeërlei wijze, nl. door na het afsnijden van de bloemstengel op het wondvlak een druppel onverdund virushoudend sap te brengen en door bij het afsnijden van de bloemstengels een telkens opnieuw besmet mes te gebruiken. Dit geschiedde door beurtelings een stengel van een mozaiekzieke Marionplant en een stengel van een proefplant af te snijden. Deze laatste methode sluit dus het nauwste aan bij wat men in de praktijk kan verwachten. Bij de controle planten zijn de bloemstengels met een mes afgesneden, dat niet te voren werd besmet. Ook bij deze proef kwamen de resultaten pas in de volgende teelt tot uiting (zie tabel 4).

Bij deze proef zijn de planten niet tot bloei gekomen. De virusziekte kon daardoor niet steeds met volkomen zekerheid worden vastgesteld. Bij de tussen haakjes geplaatste cijfers zijn de waarschijnlijk zieke planten meegeteld. Bij Marion is de virusoverbrenging op deze wijze onverwacht goed geslaagd. Beide methoden van inoculatie hebben vrijwel evenveel succes gehad. Bij Caro Carlee zijn de resultaten twijfelachtig, tengevolge van het vrij hoge percentage zieke

TABEL 4

Table 4

	Aantal gezonde planten <i>Number of healthy plants</i>	Aantal zieke planten <i>Number of diseased plants</i>	% zieke planten <i>Percentage of diseased plants</i>
<i>Marion</i>			
sap op wond	7	15 (26)	68 % (79 %)
<i>sap on wound</i>			
besmet mes	8	7 (27)	47 % (77 %)
<i>infected knife</i>			
contrôle	29	1 (6)	3,3 % (17 %)
<i>check</i>			
<i>Caro Carlee</i>			
sap op wond	16	2 (22)	11 % (58 %)
<i>sap on wound</i>			
besmet mes	22	4 (18)	15,4 % (45 %)
<i>infected knife</i>			
contrôle	28	5 (9)	15 % (24 %)
<i>check</i>			

planten in de contrôle. Deze partij was blijkbaar niet volkomen gezond en het is niet uitgesloten, dat het afsnijden van de bloemen in de contrôle tot een verdere verspreiding heeft bijgedragen. Het is nl. niet aannemelijk, dat hier van een nieuwe, door bladluizen tweegegebrachte, besmetting sprake is, daar bij al deze proeven de planten in luisvrije kooien of kasjes zijn opgekweekt, waarin elke 14 dagen een nicotine-behandeling plaats had.

IV. VIRUSZUIVERING EN BEREIDING VAN ANTISERA

a. Inleiding

In Januari 1950 werd na overleg met het proefstation te Naaldwijk besloten tot serologisch onderzoek op virus verschijnselen in Freesia's. Allereerst werd getracht om ter orientatie een „voorlopig” antiserum te verkrijgen. Bij dit eerste onderzoek werd een antiserum verkregen, dat specifiek serologisch reageerde met sap van mozaiekzieke Freesia's. De opzet was om dit „voorlopig” antiserum te gebruiken als testserum bij verder onderzoek betreffende zuivering en concentratie van het virus, om vervolgens met behulp van gezuiverde viruspreparaten antisera met een hogere titer te verkrijgen.

In de loop van het onderzoek kwam vast te staan, dat perssap van mozaiekzieke Freesia-planten dikwijls positief reageerde met antiserum tegen *Phaseolus-virus 2* van de boon, en dat dus dit virus bij de ziekteverschijnselen een rol kan spelen. De bereiding van dit antiserum zal tevens worden vermeld.

Doel van het onderzoek is geweest om langs serologische weg iets te weten te komen omtrent de identiteit van de viren, die bij virusverschijnselen van Freesia's betrokken zijn, en tevens om sera te verkrijgen voor de diagnostiek.

De gang van het onderzoek wordt verdeeld in de volgende paragrafen:

- b. Bereiding van een „voorlopig” antiserum.
- c. Viruszuivering en het verkrijgen van antisera met gezuiverde suspensies.
- d. Bereiding van antisera tegen *Phaseolus-virus 2*.
- e. Monsteronderzoek.
- f. Serologisch onderzoek betreffende de identiteit van de viren welke bij de mozaiekverschijnselen betrokken zijn.

b. Bereiding van een voorlopig antiserum

Op grond van intraveneuse injecties bij muizen werd in samenwerking met Dr S. G. ONG vastgesteld, dat Freesia-sap een voor de proefdieren dodelijk, thermostabiel, haemolyserend toxine bevat.

Een niet toxische suspensie kon als volgt worden verkregen: Een deel perssap van mozaiekzieke Freesia's werd geklaard door centrifugeren bij 3000 t./m., gedurende 30 min., aangevuld met een half deel aq. dest. en gedurende $1\frac{1}{2}$ uur in de supercentrifuge gecentrifugeerd bij $\pm 60000 \times g$. Het sediment werd gesuspenderd in $\frac{1}{4}$ deel 0,85% NaCl en deze suspensie werd door een laagje watten gefiltreerd.

Met aldus verkregen preparaten werden 3 konijnen intraveneus ingespoten. Zij kregen elk 8 injecties van resp.: 0,5 cc; 0,5 cc; 1cc; 1,5 cc; 2 cc; 2,5 cc; 3 cc; 4 cc; (de eerste 4 en de laatste 3 injecties om de andere dag, met 2 dagen rust na de 4e en de 5e injectie). Zes dagen na de laatste injectie werden de konijnen verbloed. Verzadiging van de antisera geschiedde met ongecentrifugeerd perssap van gezonde Freesia's, tevoren verdund met een gelijk volume 0,85% NaCl. Verzadiging was volledig na menging van één deel antiserum met negen delen 1:2 verdund sap en incubatie gedurende 2 uur bij 37 °C gevolgd door 16 uur bij 0 °C. Het verzadigde antiserum werd vervolgens door centrifugeren geklaard (3000 t.m. gedurende 30 min.). Dit antiserum was door de verzadiging 1:10 verdund.

Gebezigde techniek

Een microprecipitatie-reactie werd gebezigd ter bepaling van de precipitatietiter der antisera (d.i. als maat voor het gehalte aan specifieke antilichamen, de hoogste serumverduunning, welke met een constante verduunning van virushoudend perssap positief uitvlokt).

Op een dekglasje worden een druppel antiserum en een druppel, door centrifugeren geklaard, virushoudend perssap met een klein roerstaafje vermengd, waarna het glasje omgekeerd wordt op een aan een objectglas gekitte glazen ring. Om verdamping van de hangende druppel tegen te gaan, is de glad gepolijste rand van de ring ingevet met een vaseline-paraffine mengsel, waarop het dekglasje wordt aangedrukt.

Na incubatie gedurende 1 à 2 uur bij 37 °C kan de serologische reactie worden afgelezen onder een donkerveldmicroscop als een oplichtende uitvlokking.

Ter bepaling en vergelijking van de precipitatietiters werd van de verkregen antisera en als contrôle van normaalserum een verdunningsreeks gemaakt, beginnend bij de verduunning 1:10 (verkregen door verzadiging) en oplopend met de verdunningsfactor 2 dus 1/10; 1/20; 1/40, enz. Vervolgens werd van elke verduunning een druppel gemengd met 1:2 verdund en door centrifugeren geklaard perssap van een met virus besmette plant. De precipitatietiters van de drie verkregen antisera waren resp.: 1:40, 1:40, 1:160. De contrólereacties met normaalserum in verdunningen waren negatief. Het antiserum, met precipitatietiter 1:160, werd gebruikt bij het verdere onderzoek als antiserum AFrVi-2.

c. Viruszuivering en het verkrijgen van antisera met gezuiverde suspensies

Met een eenmaal verkregen antiserum kan in suspensies de relatieve hoeveel-

heid virus worden bepaald. Als relatieve maat geldt het precipitatie eindpunt of de hoogste verdunning, welke met een constante antiserumverdunning uitvlokt. Voor deze bepaling wordt van een door centrifugeren geklaarde suspensie met 0,85 % NaCl een verdunningsreeks gemaakt met de verdunningsfactor 2.

Afhankelijk van het materiaal waarmee werd gewerkt werden twee methoden toegepast. Bij de eerste methode werd uitgegaan van vers perssap, afkomstig van jongere, met virus besmette Freesia-planten van het ras Buttercup. Bij de tweede van bevroren en gedurende enkele weken bewaard sap van zich in een verder groeistadium bevindende besmette planten van het ras Apotheose.

Methode I:

175 cc perssap werd gedurende 20 minuten mechanisch geschud en vervolgens door centrifugeren geklaard (3000 t.m. gedurende 15 minuten). Het sediment werd uitgewassen in 75 cc aq. dest. en de verkregen suspensie nog eens door centrifugeren geklaard. Door samenvoegen van de geklaarde suspensies werd 250 cc verkregen, waarin onder roeren 30 % ammoniumsulfaat werd opgelost. Het gevormde neerslag werd door centrifugeren (3000 t.m. gedurende 15 min.) gesedimenteerd en het sediment gesuspenseerd in 150 cc. aq. dest. Deze suspensie werd gecentrifugeerd en het sediment gesuspenseerd in 50 cc aq. dest., mechanisch geschud en opnieuw gecentrifugeerd, waarna hetzelfde proces nog eens werd herhaald met het laatste sediment. Door samenvoegen van alle geklaarde suspensies werd 250 cc. verkregen. Deze hoeveelheid werd gedurende $1\frac{1}{2}$ uur bij $60000 \times g$ gecentrifugeerd en het sediment werd gesuspenseerd in 30 cc. aq. dest. De verkregen suspensie werd gedurende 10 minuten mechanisch geschud en vervolgens gecentrifugeerd (3000 t.m. gedurende 15 min.). Het sediment werd opnieuw gesuspenseerd in 25 cc., geschud en gecentrifugeerd; de verkregen geklaarde suspensies werden samengevoegd.

Van het perssap, waarvan bij deze zuivering werd uitgegaan, lag het precipitatie eindpunt bij de verdunning 1:32, van het eindproduct bij de verdunning 1:64.

Met aldus verkregen suspensies werden bij twee konijnen tien injecties gegeven van resp. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6, 5, 6 en $3\frac{1}{2}$ cc over een periode van 27 dagen. Met rustperiodes van resp. 3 en 13 dagen na de vierde en de zevende injectie werden de injecties gegeven op opvolgende dagen. Acht dagen na de laatste injectie werden de konijnen verbloed.

De verkregen antisera AFrVi-5 en AFrVi-6 hadden resp. de precipitatietiters 1:320 en 1:640 met geklaard perssap van met virus besmette Freesia's. De precipitatietiter van het eerder verkregen antiserum AFrVi-2 met ditzelfde sap was 1:80.

Methode II:

700 cc. bevroren perssap werd na ontdooiing door centrifugeren geklaard (3000 t.m. gedurende 20 min.). Hierin werd onder roeren 210 gram ammoniumsulfaat opgelost en het ontstane neerslag werd door centrifugeren bij 3000 t.m. gesedimenteerd en vervolgens gesuspenseerd in 280 cc. aq. dest. Deze suspensie werd door centrifugeren bij 3000 t.m. geklaard, waarna de bovenstaande vloeistof gedurende 2 uur gecentrifugeerd werd bij $\pm 60000 \times g$. Het sediment werd gesuspenseerd in 70 cc. aq. dest. en de suspensie geklaard (3000 t.m. gedurende 15 min.).

Uitgaande van bevroren perssap, afkomstig van verschillende partijen geïnfecteerde planten van het ras Apotheose, werden producten van zuivering verkregen, waarvan het precipitatie eindpunt gelegen was tussen de verdunningen 1:1280 en 1:2560, terwijl van de hoeveelheden perssap, waarvan werd uitgegaan het precipitatie-eindpunt varieerde tussen de verdunning 1:128 en 1:512, zodat door de zuivering een concentratie werd bereikt van 5 à 10 maal. Voor de precipitatie eindpunt bepalingen werd het door methode I verkregen serum AFrVi-6 gebruikt. Met de volgens methode II verkregen suspensies kregen zes konijnen negen intraveneuse injecties van resp. 1, 2, 3, 4, 5, 5, 5, en tenslotte $2 \times$ maal achtereens 2 cc (van een sterker geconcentreerde suspensie).

De injecties werden over een periode van 15 dagen gegeven en wel op de 1e, 2e, 3e, 4e, 5e, 8e, 9e, 13e en 15e dag. Acht dagen na de laatste injectie werden de konijnen verbloed.

De precipitatietiters van de zes verkregen sera AFrVi-7 tot 12 worden vermeld in de tabellen 5 en 6 in vergelijking met de eerder verkregen antisera.

Nabeschouwing zuiveringsonderzoek

Bij methode I bleek dat na centrifugeren van het perssap het groene sediment nog veel virus bevat. Door het perssap mechanisch te schudden werd bij zuivering een hogere opbrengst aan virus bereikt.

Bij methode II kon na centrifugeren van het ontdooide sap in het sediment serologisch bijna geen virus worden aangetoond en mechanisch schudden werd dus niet toegepast.

d. Bereiding van antisera tegen *Phaseolus-virus 2*

Antisera tegen *Phaseolus-virus 2* waren reeds verkregen bij een onderzoek op virusverschijnselen in gladiolen.

Hiertoe werden konijnen ingespoten met suspensies, die als volgt uit perssap van geïnfecteerde tuinboonplanten (*Vicia faba*) werden verkregen:

Een deel perssap wordt bij een laag toerental (1000–1500 t.m.) gedurende 10 minuten 4 maal gefractionneerd gecentrifugeerd, waarbij het sediment van een voorgaande centrifugatie in een gelijk volume aq. dest. als dat van het oorspronkelijke perssap wordt gesuspenderd en opnieuw gecentrifugeerd. De na de vier centrifugaties achtergehouden suspensies worden samengevoegd. Het laatste sediment wordt weggeworpen. De samengevoegde suspensies worden vervolgens gecentrifugeerd in de supercentrifuge bij $\pm 60000 \times g$ gedurende 45 minuten.

Voor de injecties wordt het sediment van de supercentrifuge gesuspenderd in een half deel 0,85% NaCl en deze suspensie wordt door een laagje watten gefiltreerd.

Verzadiging van de in het vervolg genoemde APhVi2-sera geschiedt met een suspensie, die als volgt bereid wordt:

Een deel perssap uit blad van gezonde tuinbonen, verdund met 5 delen 0,85% NaCl, wordt gedurende $1\frac{1}{2}$ uur gecentrifugeerd bij $\pm 60000 \times g$. Het sediment wordt gesuspenderd in 2 delen 0,85% NaCl.

Eén deel serum wordt verzadigd met 19 delen van deze suspensie, gevolgd door incubatie gedurende 2 uur bij 37 °C en 16 uur bij 0 °C.

Pigmentvorming door oxydatie van tyrosine zoals beschreven door BAWDEN

en medewerkers (1951) blijft grotendeels achterwege en de aldus verzadigde sera zijn wekenlang houdbaar.

Voor serologisch onderzoek van Freesia's worden de APhVi2-sera meestal verzadigd met perssap van gezonde Freesia's zoals beschreven op blz. 164.

e. Monsteronderzoek

Een groot aantal van virusaantasting verdachte Freesia's van verschillende rassen zijn serologisch onderzocht met zowel AFrVi- als met APhVi2-sera.

Een druppel perssap van deze planten werd zoals beschreven op blz. 164 volgens de micromethode gemengd met een druppel antiserum.

Als controle werd op dezelfde wijze gereageerd met normaalserum en 0,85 % NaCl op gelijke wijze „verzadigd” als de antisera.

In sommige gevallen traden „spontane uitvlokkingen” op, zich openbarend door uitvlokking der controle reacties.

Dit bleek samen te gaan met een lage pH (pH 5,2 of lager) van het onderzochte perssap. Meestal werd een oplossing gevonden door bladeren van de te onderzoeken planten fijn te wrijven in een mortier onder toevoeging van enig kwartszand en $3 \times$ hun gewicht van een bufferoplossing pH 7 volgens SÖRENSEN (3 delen 1/15 molair Na_2HPO_4 + 1 deel 1/15 molair KH_2PO_4).

Door de pulp met een watje uit de mortier te strijken en tussen twee glasplaatjes uit te knijpen, kon het perssap in een centrifugebuisje worden opgevangen en na klaring worden gebruikt voor de beschreven druppelreactie.

Van de onderzochte monsters (zie ook hoofdstuk VI) reageerde een deel positief met zowel AFrVi- als met APhVi2-sera, een ander deel positief met de AFrVi-, maar negatief met de APhVi2-sera en de rest reageerde negatief met beide antisera.

Perssap van geïsoleerde, uit zaad opgekweekte Freesia's reageerde altijd negatief.

f. Onderzoek betreffende de identiteit van de viren, welke bij de virus-verschijnselen betrokken zijn

Gebaseerd op de aan het einde van de vorige paragraaf genoemde waarnemingen werd aangenomen, dat tenminste twee viren een rol spelen en wel naast *Phaseolus-virus 2* een virus in het vervolg aangeduid als *Freesia-virus*. Er werd geconstateerd, dat alle AFrVi-sera positief reageerden met sap van tuinboon besmet met *Phaseolus-virus 2* en dus antilichamen tegen dit virus gemeen hebben met de APhVi2-sera.

Aangenomen wordt dat de Freesia's, waarvan het sap met beide groepen antisera reageert, besmet zijn met in elk geval *Phaseolus-virus 2* en al of niet met *Freesia-virus*, terwijl de Freesia's, die slechts met de AFrVi-sera reageren, alleen met *Freesia-virus* besmet zijn. De AFrVi-sera moeten dus twee soorten antilichamen bevatten of polyvalent zijn. De aanname is tevens van belang bij een vergelijking van de tabellen 5 en 6.

Tabel 5 geeft de uitslag weer van een titratie van alle AFrVi-sera tegen hetzelfde perssap (1:2 verdund en geklaard), van besmette Freesia's. Deze Freesia's van het ras Apotheose reageerden positief met AFrVi-, maar negatief met APhVi2-sera, en zouden dus uitsluitend met *Freesia-virus* besmet zijn.

Tabel 6 geeft de titratie weer van alle AFrVi-sera tegen sap van tuinbonen besmet met *Phaseolus-virus 2*.

TABEL 5. Titratie van de AFrVi-Sera tegen sap van Freesia's besmet met *Freesia-virus*
Table 5. Titration of the AFrVi-Sera against sap of Freesias infected with *Freesia-virus*

ver- dunningen \ AFrVi-Sera	1	2	3	5	6	7	8	9	10	11	12	Normaal serum	0,85% NaCl
1/10	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
1/20	±	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
1/40	±	±	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
1/80	±	±	-	±	+	+	+	+	+	+	+		
1/160	-	-	-	±	±	+	+	+	+	+	+		
1/320	-	-	-	±	±	+	±	±	+	+	+		
1/640	-	-	-	-	-	±	-	±	±	±	±		
1/1280	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

TABEL 6. Titratie van de AFrVi-Sera tegen sap van bonen besmet met *Phaseolus-virus 2*
Table 6. Titration of the AFrVi-Sera against sap of broad beans infected with *Phaseolus-virus 2*

ver- dunningen \ AFrVi-Sera	1	2	3	5	6	7	8	9	10	11	12	Normaal serum	0,85% NaCl
1/10	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	-	-
1/20	+	+	+	+	+	+	±	+	+	+	+	-	-
1/40	±	+	±	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
1/80	±	±	-	+	+	±	-	+	+	+	±		
1/160	-	-	-	+	+	±	-	±	±	±	-		
1/320	-	-	-	+	+	-	-	-	±	-	-		
1/640	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-		
1/1280	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-		

Er dient te worden vermeld dat toen de antisera verkregen zijn, niet bekend was welke en hoeveel viren een rol speelden. Tabel 6 laat zien dat de sera AFrVi-5 en AFrVi-6 (verkregen door injecties met virushoudende suspensies gezuiverd uit vers sap) een hogere precipitatietiter hebben tegen sap van tuinbonen besmet met *Phaseolus-virus 2* dan de vijf antisera AFrVi-7-12 (verkregen door injecties met suspensies gezuiverd uit bevroren sap).

Bij beschouwing van de precipitatietiters tegen sap van Freesia's, dat slechts *Freesia-virus* kan bevatten, blijkt uit tabel 5 dat nu omgekeerd de precipitatietiters van de vijf antisera AFrVi-7-12 hoger zijn dan die van AFrVi-5 en AFrVi-6.

Duidelijk is hier een verschillend gedrag waar te nemen tussen de beide groepen AFrVi-sera t.o.v. sap van besmette bonen enerzijds en sap van besmette Freesia's (maar niet met *Phaseolus-virus 2*) anderzijds.

Het is mogelijk dat bij het materiaal gebruikt voor het verkrijgen der sera AFrVi-5 en AFrVi-6 de besmetting met *Phaseolus-virus 2* in verhouding tot die met *Freesia-virus* groter is geweest dan bij het materiaal gebruikt voor de vijf sera AFrVi-7-12.

Het is evengoed mogelijk dat door bevriezen van het perssap zoals bij de zuiveringsmethode II werd toegepast, de stabiliteit van *Phaseolus-virus 2* is ver-

stoord zodat het onder deze omstandigheden meer stabiele *Freesia-virus* een grotere kans kreeg de vorming van antilichamen te stimuleren.

Deze indruk wordt versterkt door de waarneming vermeld in Hoofdstuk V, blz. 172, waarbij bleek, dat na bewaring van bevroren perssap gedurende 5 maanden, dit perssap wel met AFRVi- maar niet met APhVi2-serum reageerde, aan het begin der bewaarperiode echter met beide antisera.

Kruisverzadiging

Een nader inzicht kon worden verkregen door een onderzoek gebaseerd op de zogenaamde kruisverzadiging.

Tabel 7 geeft weer hoe vijf groepen antisera werden verzadigd met verschillende suspensies.

TABEL 7

Table 7

Groep no group nr	Antisera antisera	Verzadigd met adsorbed with
I	APhVi2-12 APhVi2-15 (normaal serum) (normal serum)	19 delen 1 : 2 verdund gezond bonensap <i>19 parts 1 : 2 diluted sap of healthy broad beans</i>
II	APhVi2-12 APhVi2-15 (normaal serum) (normal serum)	19 delen van een mengsel van gelijke delen gezond bonensap en sap van besmette Freesia's (tabel 8) <i>19 parts of a mixture of 1 part sap of healthy broadbeans and 1 part sap of infected Freesia's (table 8)</i>
III	AFrVi- 6 AFrVi-11 (normaal serum) (normal serum)	19 delen 1 : 2 verdund sap van gezonde Freesia's <i>19 parts 1 : 2 diluted sap of healthy Freesia's</i>
IV	AFrVi- 6 AFrVi-11 (normaal serum) (normal serum)	19 delen van een mengsel van gelijke delen sap van gezonde Freesia's en een suspensie verkregen door zuivering uit sap van besmette Freesia's (tabel 8) <i>19 parts of a mixture of one part sap of healthy Freesia's and one part of a suspension made by purification from sap of infected Freesia's (table 8)</i>
V	AFrVi- 6 AFrVi-11 (normaal serum) (normal serum)	19 delen van een mengsel van 1 deel sap van gezonde Freesia's en 1 deel v.e. suspensie verkregen uit sap van bonen, besmet met <i>Phaseolus-virus 2</i> <i>19 parts of a mixture of 1 part sap of healthy Freesia's and 1 part of a suspension made from sap of broad beans infected with Phaseolus-virus 2</i>

Het is duidelijk dat om serologische reacties van de sera met normale eiwitten van Freesia's, respectievelijk bonen, uit te sluiten, als component bij de verzadiging gezond Freesia-, resp. Bonensap gebruikt werd.

De groepen I en II bestaan uit twee verschillende APhVi2-sera en normaal serum.

In groep I werden deze verzaaid met 19 delen 1:2 verdund sap van gezonde tuinboon, in groep II met 19 delen van een mengsel bestaande uit 1 deel van hetzelfde bonensap en 1 deel sap van besmette Freesia Apotheose, die positief reageerde met de AFrVi- maar negatief met APhVi2-sera.

Van dit sap werd in verdunningen op twee APhVi2-, twee AFrVi-sera en normaal serum gereageerd zoals wordt aangegeven in tabel 8. Dit sap zou dus uitsluitend *Freesia-virus* kunnen bevatten.

TABEL 8

Table 8

Sap van Freesia Apotheose in verdunningen	APhVi2 15	APhVi2 11	AFrVi-6	AFrVi-11	Normaal serum	0,85 % NaCl
1/4	-	-	+	+	-	-
1/8	-	-	+	+	-	-
1/16	-	-	+	+	-	-
1/32	-	-	+	+	-	-
1/64	-	-	+	+	-	-
1/128	-	-	+	±	-	-
1/256	-	-	-	-	-	-

Tabel 9 geeft van de beide groepen I en II de titratie weer der sera tegen 1:2 verdund geklaard perssap van tuinbonen besmet met *Phaseolus-virus 2*. Uit de gelijke titers van de beide groepen 1/2560 blijkt dat uit de antisera van groep 2 door verzaadiging met perssap van Freesia Apotheose besmet met *Freesia-virus*, geen antilichamen tegen *Phaseolus-virus 2* zijn gebonden.

TABEL 9

Table 9

Sap van tuinbonen met sap of broad beans infected with	Serum in verdunningen dilutions of sera							
		1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560
GROEP I Group I								
<i>Phaseolus-virus 2</i>	APhVi2-12	+	+	+	+	+	+	±
<i>Phaseolus-virus 2</i>	APhVi2-15	+	+	+	+	+	+	±
<i>Phaseolus-virus 2</i>	Norm. serum	-	-	-	-	-	-	-
GROEP II Group II								
<i>Phaseolus-virus 2</i>	APhVi2-12	+	+	+	+	+	+	±
<i>Phaseolus-virus 2</i>	APhVi2-15	+	+	+	+	+	+	±
<i>Phaseolus-virus 2</i>	Norm. serum	-	-	-	-	-	-	-

De groepen III, IV en V bestaan ieder uit twee AFrVi-sera en normaal serum.

In groep III werden deze verzaaid met 19 delen 1:2 verdund sap van gezonde Freesia's, in groep IV met 19 delen van een mengsel bestaande uit één deel van hetzelfde gezonde-Freesiasap en een deel van een suspensie verkregen door zuivering uit sap van Freesia Apotheose besmet met *Freesia-virus*, en in groep V met 19 delen van een mengsel bestaande uit één deel sap van gezonde Freesia's en een deel van een suspensie verkregen uit tuinboon besmet met *Phaseolus-virus 2* volgens de methode beschreven op blz. 166 (om pigmentvorming door oxydatie van tyrosine uit te sluiten).

De sera der groepen III, IV en V werden getitreerd met zowel sap van Freesia's

besmet met *Freesia-virus* als met sap van bonen besmet met *Phaseolus-virus 2* zoals wordt weergegeven in tabel 10.

TABEL 10
Table 10

Sap van planten met sap of plants infected with		Serum in verdunningen dilutions of sera							
		1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560
GROEP III Group III									
<i>Freesia-virus</i>	AFrVi-6	+	+	+	±	-	-	-	-
<i>Phaseolus-virus 2</i>	AFrVi-6	+	+	+	+	+	+	+	±
<i>Freesia-virus</i>	AFrVi-11	+	+	+	+	+	+	±	-
<i>Phaseolus-virus 2</i>	AFrVi-11	+	+	+	+	±	-	-	-
<i>Freesia-virus</i>	Norm. serum	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phaseolus-virus 2</i>	Norm. serum	-	-	-	-	-	-	-	-
GROEP IV Group IV									
<i>Freesia-virus</i>	AFrVi-6	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phaseolus-virus 2</i>	AFrVi-6	+	+	+	+	+	+	+	±
<i>Freesia-virus</i>	AFrVi-11	±	±	±	-	-	-	-	-
<i>Phaseolus-virus 2</i>	AFrVi-11	+	+	+	+	±	±	-	-
<i>Freesia-virus</i>	Norm. serum	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phaseolus-virus 2</i>	Norm. serum	-	-	-	-	-	-	-	-
GROEP V Group V									
<i>Freesia-virus</i>	AFrVi-6	±	±	±	±	-	-	-	-
<i>Phaseolus-virus 2</i>	AFrVi-6	+	+	+	+	±	-	-	-
<i>Freesia-virus</i>	AFrVi-11	+	+	+	+	+	+	+	±
<i>Phaseolus-virus 2</i>	AFrVi-11	+	+	±	-	-	-	-	-
<i>Freesia-virus</i>	Norm. serum	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Phaseolus-virus 2</i>	Norm. serum	-	-	-	-	-	-	-	-

Door de titers van de groepen III en IV tegen ziek-Freesia-sap te vergelijken is duidelijk dat de verzadiging met een suspensie, welke *Freesia-virus* bevat, in groep IV uit beide AFRVi-sera antilichamen verwijderd heeft, zoals blijkt uit de ontbrekende titer van AFRVi-6 tegenover de titer 1/160 in groep III en de verminderde titer 1/80 van AFRVi-11 tegenover de titer 1/1280 in groep III.

Door de titers van beide groepen tegen sap van besmette bonen te vergelijken, blijkt dat geen antilichamen tegen *Phaseolus-virus 2* verwijderd zijn door verzadiging met de suspensie welke *Freesia-virus* bevatte.

Door de titers van de groepen III en V tegen bonensap te vergelijken is duidelijk dat de verzadiging in groep V met een suspensie welke *Phaseolus-virus 2* bevat, antilichamen tegen dit virus uit beide AFRVi-sera verwijderd heeft, zoals blijkt uit de in groep V teruggelopen titer 1/320 van AFRVi-6 tegenover 1/2560 in groep III en 1/80 van AFRVi-11 tegenover 1/640 in groep III. Door de titers van de groepen III en V tegen sap van *Freesia*'s besmet met *Freesia-virus* te vergelijken is duidelijk dat de verzadiging met de suspensie welke *Phaseolus-virus 2* bevat, geen antilichamen tegen dit virus heeft verwijderd.

Samenvattend kan worden geconcludeerd, dat het voorkomen van twee verschillende viren is aangetoond door de mogelijkheid twee onafhankelijke antilichaamcomponenten te onderscheiden in de AFRVi-sera. Doordat uit deze polyvalente AFRVi-sera elke antilichaamcomponent door verzadiging met het corresponderende virus kan worden verwijderd, zonder dat de activiteit der sera

t.o.v. het andere virus vermindert, is tevens aangetoond dat tussen deze viren geen verwantschap bestaat.

V. ELECTRONENMICROSCOPISCH ONDERZOEK BETREFFENDE VIRUSVERSCIJNSELEN IN FREESIA'S

In aansluiting op de resultaten van het serologisch onderzoek werden preparaten gemaakt voor het electronenmicroscop, zowel van geïnfecteerde en gezonde *Freesia*'s als van geïnfecteerde en gezonde bonen. Aan de hand van de afbeeldingen zullen de behandelingen, nodig voor het maken van de preparaten, en tevens de serologische reacties van het gebruikte perssap worden vermeld.

Afbeelding 1 is een electronen photographische opname van een preparaat, gemaakt uit een suspensie, welke werd verkregen na een zuivering van virushoudend perssap, van bladeren van het *Freesia*-ras Apotheose, met behulp van ammoniumsulfaat gevolgd door dialyse. Deze suspensie reageerde zowel met serum AFrVi-11 als met serum APhVi2 (gemaakt tegen *Phaseolus-virus 2*) positief. In het preparaat, gemaakt van een 1:50 verdunning met aqua dest. van genoemde suspensie, komen naast rechte deeltjes ook draadvormige, meer gekromde deeltjes voor.

Afbeelding 2 is een electronenphotographische opname van een preparaat, gemaakt uit bevroren perssap van bladeren van het *Freesia*-ras Apotheose (het betreft hier perssap van blad van dezelfde partij *Freesia*'s, genoemd onder afbeelding 1). Bevroren en bij -12°C gedurende 5 maanden bewaard perssap, werd na ontdooiing door centrifugeren (3000 t/m gedurende 20 min.) geklaard. Het geklaarde perssap reageerde positief met serum AFrVi-11. Met serum APhVi2 was de serologische reactie negatief. Het preparaat, gemaakt van een 1:20 verdunning van bovengenoemd perssap, vertoont uitsluitend lange en rechte staafvormige deeltjes van verschillende lengten; lengte $\pm 1-2,5\ \mu$, dikte $\pm 30\ \text{m.}\mu$.

Hierbij dient te worden vermeld, dat het perssap vóór het bevroren serologisch positief reageerde zowel met AFrVi- als met APhVi2-serum, waaruit te concluderen valt, dat het „onbekende *Freesia-virus*” stabiel is, dan *Phaseolus-virus 2*”. Aangenomen wordt, dat de rechte staafjes de „*Freesia-virus*”-deeltjes zijn. In preparaten gemaakt uit bevroren en eveneens gedurende 5 maanden bewaard perssap van gezonde zaai-*Freesia*'s werden geen staafjes waargenomen.

Afbeelding 3 is een electronenphotographische opname van een preparaat, gemaakt uit een suspensie, welke werd verkregen na een zuivering uit perssap van met *Phaseolus-virus 2* geïnfecteerde tuinbonen met behulp van ammoniumsulfaat gevolgd door dialyse. De verkregen suspensie reageerde serologisch positief met APhVi2-serum. In het preparaat, gemaakt van een 1:30 verdunning van genoemde suspensie, worden lange, draadvormige gekromde deeltjes waargenomen, ten dele ineengewonden. Ook in preparaten gemaakt uit door centrifugeren geklaard en vervolgens verdund perssap van geïnfecteerde tuinbonen worden altijd deze deeltjes waargenomen, maar nooit in perssap van gezonde tuinbonen.

Afbeelding 4 is een electronenphotographische opname van een preparaat gemaakt uit virushoudend perssap van het bloemdek van het *Freesia*-ras Apotheose. Het perssap reageerde positief zowel met AFrVi-11 serum als met APhVi2-serum. Het perssap werd verkregen door de bloemen met 1 gewichts-

deel van een bufferoplossing pH 7,1 (SÖRENSEN) in een mortier te wrijven. De verkregen pulp werd tussen 2 glaasjes uitgeperst en het perssap door centrifugeren geklaard en 50 maal verdund met aqua dest. Het preparaat vertoont kluwens van grotendeels ineen gewonden draadvormige en gekromde deeltjes. In het perssap van bloemen van gezonde *Freesia*'s werden deze deeltjes nooit waargenomen. Aangenomen wordt, dat dit virusdeeltjes zijn van *Phaseolus-virus 2*.

Discussie

Bij vergelijking van de 4 afbeeldingen komt tot uiting, dat de waargenomen deeltjes in dikté weinig uiteenlopen. Hierdoor wordt het moeilijk om in preparaten van *Freesia*-sap, waarin blijkens het serologisch onderzoek beide viren voorkomen (afbeelding 1 en 4) zekere conclusies te trekken over de identiteit der waargenomen deeltjes.

In afbeelding 1 zijn deeltjes van tweeërlei vorm waar te nemen en wel rechte deeltjes naast draadvormige gekromde deeltjes. Deze indruk is gegrondvest op veel meer electronenpreparaten, die echter in verband met de beschikbare ruimte niet alle kunnen worden gereproduceerd.

Preparaten voor het electronenmicroscop en electronenphotographische opnamen werden vervaardigd door de heer J. D. BAKKER, assistent Laboratorium voor Bloembollenonderzoek te Lisse.

VI. DE VERBREIDING VAN DE VIRUS-AANTASTING IN DE VERSCHILLENDE FREESIA-RASSEN

Het is natuurlijk van groot belang te weten in hoeverre bepaalde afwijkende verschijnselen bij *Freesia*'s verband houden met virus-besmetting. Bij het serologisch onderzoek stond ons dan ook als doel voor ogen een methode uit te werken om snel de aanwezigheid van het virus in de planten te kunnen vaststellen. Toen het serum bereid werd, was ons nog niet bekend, dat er 2 verschillende viren in het spel waren. Achteraf bleek het serum zowel betrekking te hebben op een tot dusver onbekend virus, het *Freesia-virus*, als op het *Phaseolus-virus 2*. Daarnaast beschikte men in Lisse reeds over een serum, alleen tegen het *Phaseolus-virus 2*.

Met behulp van deze beide sera was het mogelijk de volgende gevallen te onderscheiden:

- a. Geen virus aanwezig.
- b. Alleen *Freesia-virus* aanwezig.
- c. *Phaseolus-virus 2* aanwezig (al dan niet vergezeld van het *Freesia-virus*).

Daar wij niet de beschikking hadden over een serum dat alleen ten opzichte van het *Freesia-virus* werkzaam was, was het niet mogelijk onderscheid te maken tussen het alleen aanwezig zijn van het *Phaseolus-virus 2* en de aanwezigheid van beide viren tesamen. Het is dan ook op dit moment nog niet mogelijk aan te geven in hoeverre een bepaald ziektebeeld te voorschijn kan worden geroepen door de aanwezigheid van het *Phaseolus-virus 2* alleen in en hoeverre dit beeld wordt beïnvloed door de mede-aanwezigheid van het *Freesia-virus*. Daar uit ons onderzoek is gebleken, dat het *Freesia-virus* zeer verbreid in de meeste *Freesia*-rassen aanwezig is, mag wel worden aangenomen dat bij een positieve reactie met het bonenvirus-serum in de meeste gevallen beide viren aanwezig zullen zijn geweest.

a. Resultaten van het serologisch onderzoek

Op grond van de resultaten van het serologisch onderzoek zou men voorlopig tot de volgende groeipindeling van de *Freesia*-rassen kunnen komen naar de wijze waarop zij op de aanwezigheid van de beide viren reageren.

1. Rassen, die noch bij de aanwezigheid van het *Freesia-virus*, noch bij de aanwezigheid van het *Phaseolus-virus 2* steeds een duidelijk ziektebeeld vertonen (tabel 11). Het eerste is een zeer gewoon verschijnsel, het tweede komt echter slechts zelden voor. Het is alleen waargenomen bij de rassen Prinses Irene en Giant White. En ook bij deze rassen is het stellig niet zo, dat deze nimmer reageren op de aanwezigheid van het bonenvirus. Het beste kan bij de selectie gelet worden op het uiterlijk van de bracteeën. Vaak is een lichte streping op deze schutblaadjes (afb. 5) het enige beeld, dat men kan waarnemen.

TABEL 11

Table 11

Groep 1	Ziektebeeld <i>symptoms</i>	Serologische reacties <i>serological reactions</i>	
	blad <i>leaf</i>	antiserum <i>Freesia-virus</i>	antiserum <i>Phaseolus-virus 2</i>
<i>Prinses Irene</i>			
3 planten	+	+	+
2 planten	-	+	+
1 plant	-	+	-
<i>Giant White</i>			
3 planten	+	+	+
1 plant	-	+	+
1 plant	+	+	-
1 plant	-	+	-

2. Rassen, die bij de aanwezigheid van het *Freesia-virus* niet, doch bij de aanwezigheid van het *Phaseolus-virus 2* wel steeds een duidelijk ziektebeeld vertonen (tabellen 12 + 13). Tot deze groep kunnen de meeste veel geteelde rassen gerekend worden. In het algemeen kan worden vastgesteld, dat zowel de rassen van deze groep als de rassen van de eerstgenoemde groep veelvuldig het *Freesia-virus* bevatten. Door ons werd bij deze rassen nimmer een plant gevonden, waarin dit virus niet aanwezig was. Juist het feit, dat het virus zich niet duidelijk manifesteert zal de oorzaak zijn geweest van de algemene verbreiding in deze rassen.

Toch mag men deze rassen niet alle over één kam scheren. Er zijn erbij, waar het *Freesia-virus* nimmer enig ziektebeeld te zien gaf (tabel 12). Dit was het geval bij de rassen Buttercup, White Madonna en Mammoeth, waarbij ons oordeel over beide laatstgenoemde rassen nog weinig gefundeerd is in verband met het geringe aantal onderzochte planten. Bij de andere rassen (Caro Carlee, Prinses Marijke, Oranje Zon, Apotheose, Blauwe Wimpel en Saffier) kon de aantasting door het *Freesia-virus* soms op het blad worden herkend (tabel 13).

3. Rassen, die bij de aanwezigheid van het *Freesia-virus* steeds een duidelijk ziektebeeld te zien geven (tabel 14). Dit is vooralsnog alleen het geval geweest bij het ras Marion, dat bekend staat om zijn grote gevoeligheid voor virus. Het is een gelukkig toeval geweest, dat juist dit ras was ingeschakeld bij de proef-

TABEL 12
Table 12

Groep 2a	Ziektebeeld <i>symptoms</i>	Serologische reacties <i>serological reactions</i>	
	blad <i>leaf</i>	antiserum <i>Freesia-virus</i>	antiserum <i>Phaseolus-virus 2</i>
<i>Buttercup</i>			
10 planten	+	+	+
4 planten	-	+	-
<i>White Madonna</i>			
1 plant	+	+	+
1 plant	-	+	-
<i>Mammoeth</i>			
1 plant	+	+	+
1 plant	-	+	-

TABEL 13
Table 13

Groep 2b	Ziektebeeld <i>symptoms</i>	Serologische reacties <i>serological reactions</i>	
	blad <i>leaf</i>	antiserum <i>Freesia-virus</i>	antiserum <i>Phaseolus-virus 2</i>
<i>Caro Carlee</i>			
3 planten	+	+	+
1 plant	+	+	-
4 planten	-	+	-
<i>Prinses Marijke</i>			
4 planten	+	+	+
1 plant	+	+	-
4 planten	-	+	-
<i>Oranje Zon</i>			
2 planten	+	+	+
1 plant	+	+	-
3 planten	-	+	-
<i>Apotheose</i>			
1 plant	+	+	+
2 planten	+	+	-
3 planten	-	+	-
<i>Blauwe Wimpel</i>			
1 plant	+	+	+
2 planten	+	+	-
3 planten	-	+	-
<i>Saffier</i>			
3 planten	+	+	+
2 planten	+	+	-
2 planten	-	+	-

nemingen aangaande de wijze van overbrenging van het virus. Dat zowel door middel van bladluizen als bij mechanische overbrenging met sap bij dit ras een veel hoger slagingspercentage werd verkregen, zou kunnen worden toegeschreven aan het duidelijker blijken van de besmetting met het *Freesia-virus*.

TABEL 14

Table 14

Groep 5	Ziektebeeld <i>symptoms</i>	Serologische reacties <i>serological reactions</i>	
	blad <i>leaf</i>	antiserum <i>Freesia-virus</i>	antiserum <i>Phaseolus-virus 2</i>
<i>Marion</i>			
4 planten	+	+	-
1 plant	-	-	-

4. Zaai-Freesia's. De uit zaad voortgekomen Freesia's zijn bijna steeds gezond. Daardoor was het nog niet goed mogelijk deze in een bepaalde groep onder te brengen. Een enkele maal werd een duidelijk zieke plant aangetroffen, waarin geen virus kon worden vastgesteld.

5. Rassen, die een duidelijk ziektebeeld te zien kunnen geven, doch waarin nimmer een virus kon worden aangetoond (tabel 15). Dit betreft de rassen Bronzen Giant en King of the Yellow. Een vrij groot aantal ziek uitziende planten van deze beide rassen werd serologisch onderzocht. Het is echter niet gelukt ooit een positieve reactie te verkrijgen. Wellicht bevat het sap van deze rassen een stof, die het optreden van een serologische reactie verhindert.

Merkwaardig is het, dat deze beide rassen alleen een sterke afwijking op het blad vertonen (afb. 12). terwijl de groei niet geremd wordt en de bloemvorm meestal normaal is. Men zou daarom geneigd zijn aan een andere oorzaak te denken, b.v. aan een beschadiging door de bladluis *Aulacorthum solani*. Op de betreffende bedrijven wordt echter een intensieve luisbestrijding toegepast.

TABEL 15

Table 15

Groep 5	Ziektebeeld <i>symptoms</i>	Serologische reacties <i>Serological reactions</i>	
	blad <i>leaf</i>	antiserum <i>Freesia-virus</i>	antiserum <i>Phaseolus-virus 2</i>
<i>Bronzen Giant</i>			
5 planten	+	-	-
2 planten	-	-	-
<i>King of the Yellow</i>			
5 planten	+	-	-
2 planten	-	-	-

6. Het ras Snow Queen neemt een geheel aparte plaats in (tabel 16). Men ziet hier vaak een ernstige aantasting, die gepaard gaat met een necrose van de knollen. De bruinkleuring begint aan de oppervlakte van de knol en dringt steeds verder naar binnen door. Er is hierin echter nooit enige schimmel of bac-

terie aangetroffen, die de oorzaak van dit verschijnsel zou kunnen zijn. Van dit ras werden een groot aantal planten serologisch onderzocht. Het *Phaseolus-virus* 2 werd 3 maal aangetroffen, waarbij het normale ziektebeeld voorkwam. In 7 planten werd alleen het *Freesia-virus* aangetroffen. Van deze planten vertoonden er 2 geen afwijkingen en 5 juist zeer ernstige afwijkingen, waaronder knolnecrose. Wellicht treedt bij dit ras nog een ander virus op, hetwelk een aantasting van de knol teweeg kan brengen. Tesamen met het *Freesia-virus* zou dan een zeer ernstige afwijking op het blad veroorzaakt kunnen worden. In elk geval kon in tal van duidelijk zieke planten van dit ras serologisch de aanwezigheid van het *Freesia-virus* en het *Phaseolus-virus* 2 niet worden vastgesteld. Nader onderzoek is bij dit ras stellig noodzakelijk.

TABEL 16

Table 16

Groep 6	Ziektebeeld <i>symptoms</i>		Serologische reacties <i>serological reactions</i>	
	blad <i>leaf</i>	knol <i>bulb</i>	antiserum <i>Freesia-virus</i>	antiserum <i>Phaseolus-virus</i> 2
<i>Snow Queen</i>				
3 planten	+		+	+
2 planten	+++		+	-
3 planten	++	+	+	-
2 planten	-		+	-
13 planten	+		-	-
5 planten	-		-	-

b. Ziektebeeld en mate van aantasting bij de verschillende rassen

Het ras Prinses Irene vertoont vrijwel geen afwijkingen. Wel komt er op grote schaal een uitermate lichte vlekking op het blad voor, hetgeen wellicht met virus-besmetting verband zou kunnen houden. Een enkele maal vertoont het blad een wat duidelijker gevlektheid, maar ook dan treden er veelal geen geknepen bloemen op. Wel is vaak een duidelijke lichte streping op de schutblaadjes te zien (afb. 5). Voor Giant White geldt hetzelfde als voor Prinses Irene. Daar zelfs de aanwezigheid van het *Phaseolus-virus* 2 bij deze rassen nauwelijks of in het geheel niet blijkt, is selectie op gezondheid niet goed mogelijk. Hoewel deze rassen zelf geen schade van het virus ondervinden, kunnen zij een ernstige besmettingsbron vormen voor gevoeliger rassen, die in de nabijheid worden geteeld.

Ook voor het ras Mammoeth geldt in grote trekken hetzelfde. Geknepen bloemen komen ook bij dit ras weinig voor. Het beeld op het blad komt echter in het jeugd stadium duidelijker tot uiting, zodat althans de besmetting met het *Phaseolus-virus* 2 wel steeds is te herkennen. Ook White Madonna, een ras dat overigens niet veel wordt geteeld, vertoont op 't oog weinig virus-aantasting. Geknepen bloemen ziet men bij dit ras weinig. Hoewel ook bij de rassen Mammoeth en White Madonna het virus weinig schade veroorzaakt, is het beeld toch iets gemakkelijker te herkennen dan bij Prinses Irene en Giant White.

Bij Buttercup is althans de aantasting door het *Phaseolus-virus* 2 duidelijker te herkennen. Dit ras ondervindt werkelijk schade van de aantasting, enerzijds door de belangrijk verminderde groei-kracht, anderzijds door de geknepen vorm van de bloemen. Op het blad ziet men echter slechts een lichte mozaiektkening,

voornamelijk langwerpige streepjes op de bladschede (afb. 6 en 7). Waar niet streng wordt geselecteerd, treedt spoedig een ernstige aantasting van de bloemen op.

Ook Caro Carlee ondervindt schade van de virusaantasting, althans waar het betreft het *Phaseolus-virus 2*. De bloemen zijn dan veel kleiner en blijven min of meer geknepen. De van nature creme-gele bloemen vertonen vaak een niet direct opvallende breking (nl. een segmentarische verbleking van de kleur). Op het gewas ziet men lichtgele strepen en vlekken, vooral aan de onderkant van de bladscheden. De aantasting is over het algemeen nog niet ernstig.

Bij het ras Prinses Marijke kan men aan de bloemen 2 afwijkingen onderscheiden:

1. Een lichte breking van de oranje bloemkleur (afb. 9). Men ziet hierbij slechts een zeer lichte of in het geheel geen aantasting van het blad. Er zijn aanwijzingen, dat dit verschijnsel door het *Freesia-virus* kan worden teweeggebracht.
2. Een geknepen vorm van de bloemen (afb. 8). Dit gaat gepaard met een veel duidelijker bladaantasting. Daardoor is selectie veel beter mogelijk en komt deze vorm van aantasting veel minder verbreid voor. Waarschijnlijk wordt dit beeld veroorzaakt door het *Phaseolus-virus 2*.

Beide vormen van aantasting berokkenen de kweker schade door een verminderde waarde van de bloemen.

Voor Oranje Zon geldt hetzelfde als voor Prinses Marijke. Het breken van de bloemkleur is echter wat minder duidelijk. Ook voor Apotheose geldt in principe hetzelfde. Het breken van de bloemkleur is hier echter veel ernstiger. De van oorsprong lila-rose bloem wordt veel lichter van kleur en vlekkelig. Dit reeds oude ras wordt juist in verband met de ernstige virusaantasting weinig meer gekweekt. Ook bij de rassen Blauwe Wimpel (helder blauw) en Saffier (lichter blauw) kunnen dezelfde 2 vormen van aantasting worden onderscheiden. De bloemen zijn hier in ongeveer dezelfde mate gebroken als bij Prinses Marijke. De ernstige vorm met geknepen bloemen komt bij deze rassen nog slechts weinig voor.

Bij Marion laten beide ziektebeelden zich minder scherp onderscheiden, daar beide gepaard gaan met een duidelijke aantasting van het blad. Op het blad en de bloemstengel ziet men duidelijke, lichtgrijze strepen. De groei gaat snel achteruit. De lilablauwe bloem wordt vlekkelig gestreept en blijft klein (afb. 10). Met het breken van de bloemkleur gaat echter lang niet altijd een knijpen van de bloemen (afb. 11) samen. Waarschijnlijk is voor dit laatste de aanwezigheid van het *Phaseolus-virus 2* noodzakelijk, terwijl de overige ziektebeelden bij dit ras alleen reeds door het *Freesia-virus* kunnen worden opgewekt. Dit ras vertoonde in de praktijk veel virus en wordt daarom weinig meer geteeld. Daar het ziektebeeld zo duidelijk is, kan bij dit ras echter gemakkelijk selectie worden toegepast. Enkele kwekers hebben streng geselecteerd en bezitten nu een mooi gezond gewas.

Bij de zaai-Freesia's ziet men vrijwel geen virusaantasting. Wordt een dergelijk ras echter gedurende enige tijd vegetatief vermenigvuldigd, zoals het zgn. Zaaigeel of Buttercupgeel, dan treedt reeds na 3-4 jaar een ernstige verzieking op wanneer geen strenge selectie wordt toegepast. Dit wijst er op, dat de virusziekten bij de Freesia's in belangrijke mate met de knollen worden overgebracht. Over het algemeen wordt Zaaigeel sterk aangetast door virus. De kentekenen in het gewas zijn geelgrijze, langgerekte vlekken in het blad en op de bloemstengel.

De planten blijven klein. De kleur wordt niet beïnvloed maar wel komen er veel geknepen bloemen voor.

Bronzen Giant vertoont alleen een duidelijke vlektekening (streping) op het blad (afb. 12). Feitelijk zijn alle planten meer of minder gevlekt, zodat het nog de vraag is of dit geen raseigenschap is. Alle planten vertonen een uitstekende groei. De bloemen zijn vrijwel nooit geknepen en een eigenlijke gebroken bloemkleur komt evenmin voor. Wel is de kleur van de bloemen van nature gevlekt. Voor King of the Yellow geldt hetzelfde als voor Bronzen Giant. De vlektekening op het blad is echter belangrijk minder opvallend, doch wel bij alle planten in meer of mindere mate aanwezig. De groei is zeer sterk. Van een gebroken bloemkleur is beslist nooit sprake.

Snow Queen heeft veel van virus te lijden. Wanneer in dit ras niet regelmatig wordt geselecteerd, kan het gewas na 3 à 4 jaar reeds voor 100% besmet en daardoor waardeloos zijn. Het ziektebeeld is zeer duidelijk, doch enigszins gecompliceerd. Er treden lichtgrijze vlekken op het blad en de bloemstengel op (mozaiekbeeld afb. 13b). De bloemen blijven klein en de groei kan zeer sterk worden geremd. Geknepen bloemen komen eveneens voor, doch niet bij alle planten waar het mozaiekbeeld te zien is. Uit het serologisch onderzoek is echter niet gebleken, dat er bij dit ras een verband bestaat tussen het optreden van knijpers en de aanwezigheid van het *Phaseolus-virus* 2. Uit de kleine geknepen bloemen steken de stamper en de meeldraden vaak naar buiten (afb. 14). Bij een witbloemig ras als Snow Queen is natuurlijk nooit sprake van een gebroken bloemkleur. Men kan echter soms wel bloemen aantreffen, waarvan de bloemdekklippen een meer of minder duidelijke groene zoom vertonen.

Tenslotte kan men bij dit ras nog een geheel ander beeld aantreffen, nl. een necrose in de knollen (afb. 13d en e). Deze necrose schijnt veelal aan de oppervlakte van de knol te beginnen en later dieper in de knol door te dringen. Het gaat niet altijd samen met het mozaiekbeeld, hoewel soms juist tesamen met de knolnecrose een zeer hevige aantasting van het gewas kan worden waargenomen. Soms ziet men, dat de eerstgevormde bladeren er normaal uitzien, terwijl op de jongere blaadjes op een bepaald moment talrijke kleine necrotische vlekjes worden gevormd (afb. 13a).

VII. WAARDPLANTEN VAN DE VIREN, WELKE DE FREESIA AANTASTEN

Hieromtrent is nog weinig onderzoek verricht. Aangaande het *Freesia-virus* is feitelijk nog in het geheel niets bekend betreffende een mogelijke aanwezigheid in andere gewassen of onkruiden. Ten aanzien van het *Phaseolus-virus* 2 was reeds eerder bekend, dat dit in verschillende erwten- en bonensoorten alsmede in gladiolen kan voorkomen (Bridgmon en Walker, 1952 en McWhorter e.a. 1947), terwijl ook de *Lathyrus* een waardplant is. Alleen in Canada is het vermoeden uitgesproken, dat dit virus ook de *Freesia* aantast (Anon., 1948).

In het gebied, waar de *Freesia*'s worden geteeld, komen ook veelvuldig gladiolen en stambonen voor, terwijl soms ook *Lathyrus* in de nabijheid wordt geteeld. Een enkele maal kan men zelfs bonen of *Lathyrus* in hetzelfde warenhuis aantreffen, waarin de *Freesia*'s staan. In verband met de mogelijkheid, dat deze gewassen elkaar besmetten, moet een dergelijke combinatie van teelten ten enenmale worden afgeraden.

In de praktijk zijn enkele aanwijzingen verkregen, dat de *Freesia*'s met dit virus vanuit de bonen kunnen worden besmet. In het najaar van 1950 werd b.v.

op een bedrijf in Naaldwijk in een warenhuis met Freesia's opgemerkt, dat langs de gevels en de poten bonen stonden geplant, die een duidelijk beeld (scherp mozaiek, afb. 16) van het *Phaseolus-virus 2* te zien gaven. Zowel op de bonen als op de Freesia's werd de bladluis *Macrosiphum euphorbiae* aangetroffen. In dit warenhuis was een partij Zaaigeel, die pas voor het tweede jaar vegetatief werd voortgekweekt, reeds ernstig met virus besmet, terwijl zelfs bij de zaai-Freesia's de bloemen van verschillende planten afwijkingen vertoonden.

Er zijn nog slechts enkele kleine proeven genomen, waarbij getracht werd het virus van Freesia over te brengen op gladiool, *Lathyrus*, tuinboon en stamslaboon. De overbrenging op tuinboon slaagde zowel door middel van de bladluis *Macrosiphum euphorbiae* als door sap-inoculatie. Ook op de stamslaboon is het gelukt door middel van deze bladluis het virus over te brengen. Anderzijds is getracht het virus vanuit de tuinboon over te brengen op stamslabonen, *Lathyrus*, gladiool en *Freesia*, waarbij de overbrenging met behulp van bladluizen op stamslabonen en *Lathyrus* goed is gelukt.

De aanwezigheid van *Phaseolus-virus 2* in gladiolen is, de gele en witte rassen uitgezonderd, kenbaar aan donkere streepjes of langwerpige vlekjes op het bloemdek (ANON., 1947; en BERKELEY, 1953). Serologisch kon tevens worden aangetoond, dat ook witte en gele rassen veelal dragers van dit virus zijn.

Het *Phaseolus-virus 2* kan zich op stamslabonen op tweeërlei wijzen uiten. Dubbele Witte zonder draad en Furore reageren met afsterving en bruinkleuring van de groeitoppen: topnecrose. Een ander beeld is het zgn. scherpmozaiek, waarbij een fijne scherp begrensde mozaiektekening op het blad kan worden waargenomen, vooral bij de rassen Conserva en Servus (afb. 16).

Bij tuinbonen ziet men een normale mozaiekvlekking, terwijl de blaadjes wat kleiner en smaller zijn (afb. 17).

Bij *Lathyrus* is de breking van de bloemkleur het opvallendste verschijnsel (afb. 15). Witte rassen vertonen een groene zoom langs de bovenrand van de kroonblaadjes. Op de bladeren kan men een meer of minder duidelijke mozaiekvlekking waarnemen.

VIII. BESTRIJDINGSMOGELIJKHEDEN

Men kan in principe op tweeërlei wijzen trachten de door virusziekten veroorzaakte schade te verminderen, nl. enerzijds door de planten minder gevoelig voor virusziekten te maken en anderzijds door besmetting met het virus te voorkomen. Het gezond maken van viruszieke planten is in het algemeen niet mogelijk.

In de eerstgenoemde mogelijkheid schuilen grote gevaren. We kennen reeds enkele rassen, zoals Prinses Irene en Giant White, die bij virusbesmetting gewoonlijk geen duidelijk beeld te zien geven en dus ook weinig schade van de aantasting ondervinden. Ongetwijfeld zal het mogelijk zijn meerdere van dergelijke rassen te winnen. Ook is het bekend, dat de groeiomstandigheden invloed op het ziektebeeld kunnen uitoefenen. Dit schijnt zelfs in zodanige mate het geval te zijn, dat sommige practici de aanwezigheid van een virus in twijfel trekken. Zieke knollen kunnen uitgeplant in een bepaalde grond soms schijnbaar gezonde planten leveren, of althans planten die geen opvallend ziektebeeld te zien geven. Betreffende de invloed van de groeiomstandigheden op het ziektebeeld is echter nog zeer weinig positiefs bekend. Men ziet wel vaak in het voorjaar, dat de bloemen aan de hoofdstengel (1ste snede) een veel heviger ziektebeeld

vertonen dan de later gevormde bloemen. Ook de planten, die zich uit verpopte knollen ontwikkelen, vertonen in het algemeen een sterker beeld. Verpopping treedt op wanneer de temperatuur tijdens de bewaring van de knollen te laag is (beneden 20 °C). Er worden dan nieuwe knolletjes op de oude gevormd. In het algemeen ziet men minder van het virus naarmate de planten ongestoorder kunnen doorgroeien.

Indien men echter rassen teelt, die weinig gevoelig zijn, of de groeiomstandigheden zodanig zou kunnen kiezen dat er geen duidelijk ziektebeeld optreedt, dan is het tevens onmogelijk om op gezondheid te selecteren, zodat een algemene verbreiding van het virus verwacht mag worden. De weinig gevoelige rassen kunnen dan een ernstige besmettingsbron voor gevoeliger rassen vormen, terwijl men de groeiomstandigheden nooit ten volle in de hand heeft, zodat steeds het gevaar voor een misgewas aanwezig is. Bovendien is er altijd nog de mogelijkheid van het ontstaan van nieuwe virusstammen, die onder dezelfde gunstige omstandigheden vaak wel schadelijk kunnen zijn.

Er zal dan ook bij de bestrijding van het virus de nadruk gelegd moeten worden op de tweede mogelijkheid, het voorkómen van de ziekte. Er is reeds op gewezen, dat het virus practisch voor 100 % met de knol overgaat. Vandaar dat men bij de teelt van knol-Freesia's veel meer last van virusziekten ondervindt dan bij de teelt van zaai-Freesia's. Het is daarom gewenst de teelt van zaai-Freesia's zo veel mogelijk apart te houden van de teelt van knol-Freesia's vooral als het de bedoeling is de zaai-Freesia's als knol-Freesia door te telen. Men zal deze dan langer gezond kunnen houden. Bij de meeste rassen is vermenigvuldiging door zaad echter niet mogelijk. Men moet dan zo nauwgezet mogelijk alle zieke en verdachte planten verwijderen, zodat uitsluitend met gezonde knollen verder wordt geteeld. Streng selectie van het vermenigvuldigingsmateriaal is dus noodzakelijk.

Bovendien zullen maatregelen moeten worden getroffen om hernieuwde infectie, hetzij van buitenaf hetzij vanaf onverhoopt niet opgemerkte zieke Freesia's, te voorkomen. Het zal daartoe noodzakelijk zijn in de naaste omgeving geen gewassen te telen, waarvan bekend is dat ze een waardplant zijn voor één der viren, die de Freesia aantast. Dit betreft dus de verschillende soorten erwten en bonen, benevens *Lathyrus* en gladiool.

Verder zal het noodzakelijk zijn het gewas volkomen vrij te houden van de bladluizen, die het virus van zieke op gezonde planten kunnen overbrengen. Daarnaast kan ook de mens debet zijn aan de verspreiding van het virus, doordat bij het afsnijden van de bloemen het virus met aan het mes klevend sap kan worden overgebracht. Bij een streng doorgevoerde selectie zal dit gevaar minder groot zijn. Moet men daarentegen nog met de selectie op gezondheid beginnen, dan is het gewenst enkele volkomen gezonde planten uit te zoeken, en deze geheel apart te behandelen. Door serologisch onderzoek te laten verrichten kan men zich ervan vergewissen, dat de betreffende planten werkelijk vrij van beide hier beschreven viren zijn.

Het tegengaan van de virusoverbrenging door bladluizen is een zeer moeilijk punt. Het toepassen van een bestrijding op het moment, dat men de bladluizen opmerkt, is feitelijk te laat. De overbrenging van het virus kan dan reeds hebben plaats gehad. Ideaal zou daarom zijn een bestrijdingsmiddel met een lange werkingsduur, zodat men door het middel met tussenpozen van enkele weken toe te dienen de ontwikkeling van een bladluizenpopulatie onmogelijk kan maken.

Bovendien is de snelheid van doding belangrijk. Naarmate de bladluizen sneller worden gedood, is de kans kleiner dat het virus intussen reeds op enkele planten is overgebracht. Bij persistente viren, die niet onmiddellijk na opname door de insecten kunnen worden overgebracht, bestaat theoretisch zelfs de mogelijkheid elke overbrenging van het virus te voorkomen, mits de doding minder tijd kost dan het besmettelijk worden van de bladluis. Dit geldt natuurlijk niet voor van buiten af aanvliegende en reeds besmette bladluizen. Dit gevaar is echter bij de teelt onder glas niet zo groot en stellig niet gedurende het winterseizoen, wanneer de meeste Freesia's worden geteeld.

Een aantal bestrijdingsmiddelen zijn vergeleken ten aanzien van de tijdsduur en de snelheid van hun dodende werking op *Macrosiphum euphorbiae*. Bij een oriënterende proef werden Freesia-planten bespoten met resp. 0,2 % en 0,4 % Pestox en 0,1 % en 0,2 % Parathion. Vanaf 2 dagen na de behandeling werden om de 3 dagen bladluizen op de bespoten planten geplaatst. Op de met Parathion bespoten Freesia's werden alleen bij de eerste plaatsing de bladluizen gedood. Op de met Pestox bespoten Freesia's werden na 14 dagen nog alle bladluizen en na 17 dagen ongeveer 50 % van de bladluizen gedood. Tussen de verschillende concentraties bestond weinig verschil. Pestox, een zgn. systemisch insecticide, dat zich door de plant verspreidt en deze giftig maakt voor de bladluizen, heeft dus veel beter voldaan dan Parathion.

Bij de volgende proeven werden dan ook uitsluitend enkele systemische insecticiden vergeleken, nl. Pestox, Isopestox en Systox. Deze middelen zijn zowel door begieting aan de grond toegediend als op het blad verspoten. Van Pestox werd resp. een 0,1 % en een 0,2 % oplossing in de grond gegoten en een 0,2 % oplossing op het blad verspoten. Van Isopestox werd de helft van deze concentraties gebruikt en van Systox een kwart. Niettemin gaf Systox de beste resultaten. Alleen dit middel was in staat de bladluizen binnen de 24 uur te doden. De beide andere middelen waren belangrijk minder snel in hun werking, zodat zelfs na 48 uur vaak nog niet alle bladluizen waren gedood. Naarmate de behandeling langer tevoren had plaats gevonden, verliep echter ook bij Systox de afsterving van de bladluizen langzamer.

Bij het aan de grond toedienen van de Systox werd de langste werkingsduur verkregen. Na 18 dagen werden bij beide concentraties nog alle bladluizen gedood. De proef met Systox is nog eens herhaald, waarbij tevens gespoten werd met een dubbel zo hoge concentratie (0,1 %). Het bleek, dat bespuiting met deze concentratie ongeveer hetzelfde effect had als de begieting van de grond met 0,05 %. Zowel het gieten als het spuiten met een lagere concentratie had een wat minder goed resultaat. Bij de eerste plaatsing worden de bladluizen op de bespoten planten wat sneller gedood dan op de planten, waarbij het middel in de grond is gegoten. Waarschijnlijk heeft het middel dan een paar dagen nodig om zich goed door de gehele plant te verspreiden. Dit is echter bij een tijdige toediening geen bezwaar.

Het middel Systox heeft dus beslist het best voldaan ter bestrijding van de bladluizen op de Freesia's. Door om de 2 weken de planten te bespuiten met een oplossing van 0,1 % of de grond te begieten met een oplossing van 0,05 % kan men elke ontwikkeling van een bladluispopulatie op het gewas verhinderen. Dit uitermate giftige middel is sinds kort voor toepassing in de bloementeel vrijgegeven. Wel is waar behoeft de giftigheid voor toepassing bij de Freesia-cultuur geen bezwaar te zijn, maar indien dit middel op te consumeren producten

zou worden bespoten, zou dit zeer ernstige gevolgen kunnen hebben. Nu de bloementeel in staat wordt gesteld van dit zeer goede luis- en spintbestrijdingsmiddel profijt te trekken, zal men er voor moeten waken, dat nimmer iets hiervan op een te consumeren product terecht kan komen. Ook om deze reden zal men het telen van bonen (of andere groenten) in een Freesia-warenhuis achterwege moeten laten.

IX. SAMENVATTING

De aantasting van Freesia's door virus heeft de laatste jaren een grote omvang aangenomen. Serologisch is het mogelijk gebleken 2 verschillende viren te onderscheiden:

1. Het *Freesia-virus*. Dit virus komt zeer algemeen verbreid voor, vooral bij de rassen die de aanwezigheid van dit virus niet duidelijk tonen.
2. Het *Phaseolus-virus* 2. Dit virus wordt wat minder veelvuldig aangetroffen, doch veroorzaakt een ernstiger beschadiging.

De gevoeligheid van de Freesia-rassen voor deze virusziekten loopt sterk uiteen. Er zijn rassen zoals Giant White en Prinses Irene, waar de aanwezigheid van het *Freesia-virus* in het geheel niet blijkt, terwijl de aanwezigheid van het *Phaseolus-virus* 2 gewoonlijk alleen tot uiting komt in een lichte streping van de schutbladeren. De grote meerderheid van de rassen vertoont bij aanwezigheid van het *Phaseolus-virus* 2 een veel duidelijker mozaiektkening op het blad dan wanneer alleen het *Freesia-virus* aanwezig is. De bloemen van deze rassen vertonen tengevolge van de aantasting door het *Freesia-virus* veelal een meer of minder duidelijke breking van de bloemkleur. Het niet openen van de bloemen („knijpers”) treft men doorgaans alleen aan bij aanwezigheid van het *Phaseolus-virus* 2. Een ras als Marion verradt de aanwezigheid van het *Freesia-virus* steeds door een duidelijke mozaiekvlekking van het blad.

Enkele rassen (Bronzen Giant en King of the Yellow) vertonen zeer algemeen een gevlektheid van het blad, zonder dat ooit serologisch de aanwezigheid van een virus kon worden vastgesteld.

Bij Snow Queen treden behalve de reeds genoemde ziektebeelden nog necrose op in de knollen en necrotische vlekjes op het blad. Er kon echter geen duidelijk verband met één der bovengenoemde viren worden vastgesteld.

Het virus gaat over met de knollen. Bij een nieuw opgetreden infectie gaat het virus naar verhouding het sterkst over op de kralen. Overgang met zaad kon niet worden vastgesteld.

Het *Freesia-virus* kan zeer gemakkelijk door de bladluis *Macrosiphum euphorbiae* worden overgebracht. Waarschijnlijk is het virus persistent. Door inoculatie op het blad kan dit virus in geringe mate worden overgebracht. Bij het afsnijden van de bloemstengels gaat het echter veel gemakkelijker van zieke op gezonde planten over.

Het *Phaseolus-virus* 2 tast tevens gladiolen, bonen en *Lathyrus* aan. In sommige gevallen werden zaai-Freesia's waarschijnlijk vanuit een aangrenzend slabonengewas besmet.

Electronenmicroscopisch onderzoek heeft het waarschijnlijk gemaakt, dat het *Freesia-virus* uit rechte staafvormige deeltjes bestaat, terwijl het *Phaseolus-virus* 2 draadvormige, enigszins gekromde deeltjes laat zien.

Ter bestrijding van de virusziekten bij Freesia's is in de eerste plaats een

streng selectie van het vermenigvuldigingsmateriaal noodzakelijk. Gezonde rassen mogen niet naast besmette rassen worden geteeld en dienen geheel apart te worden behandeld. Het optreden van bladluizen moet worden voorkomen door de planten om de 2 weken te bespuiten met een oplossing van 0,1 % Systox of door de grond te begieten met een oplossing van 0,05 %.

SUMMARY

I. INTRODUCTION

The infection of *Freessias* by virus has largely increased during the last few years. Virus diseases are at present the most serious diseases of this plant. It has appeared from serological tests that two different kinds of viruses can be distinguished.

1. The *Freessia-virus*. This virus is found very generally, especially with varieties where the presence of this virus is not clearly seen.
2. The *Phaseolus-virus* 2. This virus is found less frequently, but causes a serious damage.

II. SYMPTOMS

The disease manifests itself in different ways. Perhaps the most striking symptom is that the corolla does not open well or not at all (Fig. 8, 11 and 14). The practice speaks of „closed” flowers. The petals are asymmetrical and sometimes fringed (Fig. 11). The flowers are smaller than normal, while the pistil and stamens sometimes protrude above the corolla (Fig. 14). Often the only deviation is that the flower is spotted and striped (refraction of the colour of the flower; Fig. 9 and 10). On the leaves only slight spots of darker and lighter green are to be seen, especially where the leaf comes out of the sheath (Fig. 7). In other cases mosaicspots are distinctly perceptible. Light grey or yellow-grey spots or stripes may come into existence then (Fig. 6). With susceptible varieties they may become necrotic (Fig. 13). Generally a strong reduction of growth is the result of the infection by virus.

III. THE SPREADING OF THE VIRUS

- a. Seed transmission could not be ascertained. In the vegetative material the virus remains present. A once infected parcel may contain many diseased corms after some years. When infection occurs for the first time most of the virus is proportionally transmitted to the young corms.
- b. 1. Of the 4 species of aphids found on *Freessias* *Macrosiphum euphorbiae* (THOS) is most frequent in the Westland.
2. That is why *Macrosiphum euphorbiae* was used to check the transmission of virus to different *Freessia* varieties. It became evident that this aphid can easily transmit the *Freessia-virus*. With one variety this is more apparent than with the other (Table I). The figures (in brackets) of the experiment of 1948-'49 mentioned in this table, refer to the plants which have grown out of the young corms. The same applies to Table 2 and 3. In the already mentioned experiment of 1949-'50 the plants have not reached the flowering stage. The figures in brackets also include the plants that are probably diseased. The same also applies to Table 4.

3. When the virus was transmitted by *Macrosiphum euphorbiae* the periods of „infection feeding”, „fasting” and „test feeding” were varied. The duration of fasting generally has no great influence on the extent of virus transmission. Probably the virus is persistent. By long periods of „infection feeding” and „test feeding” the virus transmission is favoured (Table 2).
- c. With the Freesia-culture there is little chance for the leaf to receive wounds by which the virus might mechanically be transmitted but when cutting the flower-stem this danger is very much greater.
 1. Leaf inoculation has been done in two ways. By rubbing the leaf with the virus it could be transmitted somewhat easier than by injection (Table 3). These two ways of mechanical transmission have much less success than transmission by aphids.
 2. Inoculation on the flower-stem was done by cutting it with an infected knife, or by putting virus on the cut. In this way the transmission of the virus with the variety Marion was much greater than by leaf inoculation (Table 4).

IV. SEROLOGICAL PROPERTIES OF FREESIA VIRUSES

a. Injection of small doses of clarified Freesia sap into mice showed the presence of a very toxic substance.

A non-toxic suspension to be used for the immunization of rabbits could be prepared in the following way:

Sap from leaves of virus-diseased Freesia's was clarified by centrifuging at 3000 r.p.m. for 30 min. After dilution with half a volume of distilled water the clarified sap was spun at $\pm 60000 \times g$ in a supercentrifuge for $1\frac{1}{2}$ hours.

The sediment was resuspended in distilled water in one quarter of the volume of the original sap and this suspension was filtered through cotton wool.

Eight intravenous injections were given in doses of 0.5; 0.5; 1; 1.5; 2; 2.5; 3 and 4 ml. resp. over a period of 17 days (2 days rest after the fourth and fifth injection and one after all the others). Six days after the last injection the rabbits were bled.

For absorption of the antisera, the crude sap of healthy Freesias, diluted with an equal volume of saline, was used.

One volume of serum was mixed with nine volumes of diluted sap and the mixture incubated for two hours at 37°C. followed by sixteen hours at just above zero and then clarified by centrifugation.

b. Serological reactions

The microprecipitation reaction was used.

Small droplets of about equal size of dilutions of antiserum and clarified sap diluted with an equal volume of saline resp. are mixed on a coverslip with a small glass rod. The coverslip is then pressed upside down on a vaseline-covered glassring glued to a microscope slide, thus making an air tight cell.

A row of serum dilutions with a dilution factor of 2, starting with the dilution 1 : 10 (obtained by adsorption), was titrated against clarified sap of infected and as a control of healthy Freesias.

The precipitin titres of the three antisera were 1:40, 1:40 and 1:160 respectively.

Control reactions between antiserum and healthy sap and between normal serum and both infected- and healthy sap were all negative. The strongest antiserum referred to as AFrVi-2, was used in further experiments.

c. Purification

To obtain an antiserum with a high titre, concentrated and partly purified suspensions were prepared.

Two different methods were employed, the first starting from fresh sap pressed from leaves of young virus infected Freesias of the variety Buttercup and the second from sap of more mature plants of the variety Apotheose, which sap had been frozen and stored for several weeks.

Method I

175 ml. of fresh sap was mechanically shaken for 20 minutes and clarified by centrifugation (3000 r.p.m. for 15 min.).

The sediment was resuspended in 75 ml. of distilled water, the suspension clarified a new and both supernatants were pooled; 30% of ammoniumsulfate was added and the resulting precipitate was sedimented by centrifugation and resuspended in 150 ml. of distilled water.

This suspension was clarified by centrifugation and the sediment resuspended in 50 ml., mechanically shaken and clarified.

This process was repeated once more and the resulting supernatants were pooled yielding a clarified suspension of 250 ml.

This was spun for $1\frac{1}{2}$ hours at $60000 \times g$ and the sediment was suspended in 30 cc. of distilled water. The suspension was mechanically shaken for 10 minutes and then clarified (3000 r.p.m. for 15 min.). The sediment was resuspended in 25 ml., shaken and clarified and both supernatants were pooled.

A series of dilutions of this suspension with a dilution factor of 2, indicated a preipitation endpoint at the dilution 1:64 with absorbed serum AFrVi-2, compared to an endpoint of 1:32 for a clarified sample of the sap from which the preparation was started. Two rabbits received 10 injections with similarly prepared suspensions of resp. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6, 5, 6 and $3\frac{1}{2}$ ml. over a period of 27 days. The injections were made on successive days except for rest periods of 3 and 13 days resp. after the fourth and seventh injection. The two resulting sera AFrVi-5 and AFrVi-6 showed precipitin titres of 1:320 and 1:640 respectively against a clarified diluted sample of diseased sap.

The precipitin titre of AFrVi-2 against the same sample was 1:80.

Method II

700 ml. of infected sap, melted after freezing, was clarified by centrifugation (3000 r.p.m. for 20 minutes); 210 grams of ammoniumsulfate was added slowly and the resulting precipitate was sedimented by centrifugation and resuspended in 280 ml. This suspension was again clarified at 3000 r.p.m. and then was spun at $\pm 60000 \times g$ in the supercentrifuge for two hours. The sediment was resuspended in 70 ml. of distilled water and this suspension was clarified at 3000 r.p.m.

Starting from different sources of infected material concentrated suspensions were prepared that showed precipitation endpoints varying between 1:1280 and 1:2560 when tested against antiserum AFrVi-6 (made by the first method).

Six rabbits received 9 injections with the above concentrated suspensions in increasing doses over a period of 15 days.

A comparison of the precipitin titres of the 6 resulting antisera (AFrVi 7-12) with those previously prepared is presented in tables 5 and 6.

In the first method using fresh sap it was found out that shaking of the different suspensions prepared during the purification process was essential; the precipitation end point of samples were always higher after shaking than before. This might well be due to adhesion of antigenic material to normal plant substances. When sap of more mature plants was first frozen, shaking had no effect on precipitation end points.

Purified suspensions were stored just above zero.

d. Preparation of antisera against Phaseolus-virus 2

As *Phaseolus-virus 2* was shown to play a rôle in a part of virus infections of Freesias, antisera prepared against it were often used.

The preparation has been as follows:

A volume of crude sap of infected broad bean leaves, was centrifuged at 1000-1500 r.p.m. for 10 minutes, the sediment resuspended in the same volume of distilled water and centrifuged again. This process was repeated twice and all supernatants were pooled. The resulting suspension was centrifuged at $60000 \times g$ for 45 minutes and the sediment suspended in saline equal to half the original volume of sap.

The resulting green suspensions, after filtering through cotton wool, were used for the injections of rabbits. As a result these antisera which gave specific precipitin reactions with infected Broadbeans and Freesias also had rather high titres against normal plant antigens. Absorption of these antisera referred to as APhVi2-sera was done with a preparation made as follows:

A dilution of one volume of crude sap pressed from healthy Broadbeans leaves in 5 volumes of saline was supercentrifuged at $60000 \times g$ for $1\frac{1}{2}$ hour.

The sediment was suspended in saline equal to twice the volume of the original sap. It was found that 19 volumes of this suspension to one of serum was necessary for complete absorption.

Formation of black pigment as described by BAWDEN et al. (1951) was thus prohibited and the absorbed antisera could be kept for weeks.

When testing Freesias, absorption with sap of healthy Freesia seedlings was performed as described above (page 186).

e. Testing of Freesia samples

A large number of suspected Freesias of different varieties were serologically tested with both AFrVi and APhVi2-sera. Sap of plants to be tested was diluted and mixed with antiserum as described on page 186.

Normal serum as well as saline (0.85 % NaCl) „absorbed” in the same manner as the antisera served as controls.

In some cases spontaneous flocculations occurred (control reactions being positive); these were usually encountered when the pH of the sap was 5.2 or lower. This could be overcome by mincing leaves in a mortar with 3 times their weight of a buffersolution of pH 7 (Sørensen: 3 parts 1/15 molar Na_2HPO_4 and 1 part 1/15 molar KH_2PO_4). The mince was hand pressed between two

glass slides and the resulting suspension was collected in a centrifuge tube. This was then clarified and mixed with antisera as described.

Part of the samples showed positive serological reactions with both AFrVi- and APhVi2-sera, another proportion reacted positively with the AFrVi-, but negatively with the APhVi2-sera; a third group reacted negatively with both antisera. Sap from young isolated Freesia seedlings always reacted negatively with both antisera.

f. Identification of the viruses concerned in virus-infected Freesias

Based on the observations stated at the end of the last paragraph it is assumed that two viruses are concerned, *Phaseolus-virus 2*, and the other which is referred to as *Freesia-virus*.

It was found that all AFrVi-sera reacted positively with sap from Broadbeans, infected with *Phaseolus-virus 2* and therefore must contain antibodies against this virus in common with the APhVi2-sera.

It is assumed that diseased Freesias that react with both antisera are infected with at least the *Phaseolus-virus 2* while those reacting with only the AFrVi-sera are infected only with the *Freesia-virus*. The AFrVi-sera thus must have two kinds of antibodies. This assumption is strengthened by a comparison of tables 5 and 6.

Table 5 lists the precipitin titres of all AFrVi-sera against clarified sap of infected Freesias that reacted positively with the AFrVi-sera but negatively with APhVi2-sera. It follows that in this sap only the *Freesia-virus* is present.

Table 6 lists the precipitin titres of all AFrVi-sera against sap of Broadbeans infected with *Phaseolus-virus 2*.

It must be stressed that at the time the antisera were prepared it was not known which and how many viruses were concerned. It is seen that the titres of sera AFrVi-5 and -6 (made by injecting with suspensions prepared from *fresh* sap) against sap of infected Broadbeans are higher than those of the antisera AFrVi-7-12 (made by injecting with suspensions prepared from *frozen* sap).

It is seen furthermore that of the last group of AFrVi-sera the titres against the sap of Freesias infected only with *Freesia-virus* are higher than those of the AFrVi-sera 5 and 6.

It seems probable that the stability of the *Phaseolus-virus 2* in the second purification method was disturbed by freezing. The relatively higher content of antibodies against the second virus could then be explained by its higher stability. It is also possible that in the Buttercup, material used for the preparation of the antisera AFrVi 5 and 6 the proportion of *Phaseolus-virus 2*-infected plants was higher.

Cross absorption experiments

Further evidence could be obtained by cross absorption tests. Table 7 shows a scheme of 5 groups of sera each absorbed in a different manner.

Groups I and II consist of two APhVi2-sera and normal serum. The sera were in group I absorbed with 19 volumes of 1:2 diluted sap of healthy Broadbeans and in group II with 19 volumes of a mixture of one part of Broadbeansap and one part of sap of infected Freesia (var. Apotheose). This Freesia sap (table 8) had reacted negatively against APhVi2- and positively against AFrVi-sera, thus only *Freesia-virus* was present in the sap used for absorption.

Table 9 shows the precipitin titres of both groups of sera against sap of infected Broadbeans. It is evident that from the antisera in the second group no anti-bodies whatsoever have been removed by the absorption, the titres of both groups being the same. The groups III, IV and V consist of two AFrVi-sera and normal serum. The sera of group III were absorbed with 19 volumes of 1 : 2 diluted sap of healthy Freesias (isolated seedlings), and in group IV with 19 volumes of a mixture of one part of the same Freesia sap and one part of a suspension prepared from Freesias (var. Apotheose) infected with only *Freesia-virus*.

Absorption of group V was made with 19 volumes of a mixture of one part of sap of healthy Freesia seedlings and one part of a suspension prepared from Broadbean leaves infected with *Phaseolus-virus 2* by the method described on page 187 (prohibiting formation of black pigment).

Table 10 shows the precipitin titres of the sera in the absorption groups III, IV and V against both sap of Freesia var. Apotheose infected with *Freesia-virus* and sap of Broadbeans infected with *Phaseolus-virus 2*.

From a comparison of the titres of groups III and IV it is evident that absorption with the suspension containing Freesia virus in group IV has removed antibodies from both sera as shown when reacting with sap of plants infected with *Freesia-virus*.

(AFrVi-6 titre 1/160 in group III vs. O in group IV; AFrVi-11 1/1280 in group III vs. 1/80 in group IV.)

From comparison of the titres of groups III and IV against sap of infected Broadbeans it is evident that no antibodies whatsoever against *Phaseolus-virus 2* have been removed after absorption with the suspension containing only *Freesia-virus*.

From comparison of the titres of groups III and V it is evident that absorption with a suspension containing *Phaseolus-virus 2* in group V has removed antibodies. When reacting with sap of infected Broadbeans it is seen that the titres of sera AFrVi-6 and AFrVi-11 decrease from 1/2540 and 1/640 to 1/320 and 1/80 respectively after absorption with *Phaseolus-virus 2*.

From comparison of the titres of the groups III and V against sap of Freesias infected with *Freesia-virus* it can be seen that no removal of antibodies against this virus has taken place by absorption with the suspension prepared from Broadbeans infected with *Phaseolus-virus 2*.

From the observations made it may be concluded that in the AFrVi-sera two kinds of antibodies are present. As it has been possible to remove the two kinds of antibodies independently by absorptions with their corresponding antigens i.e. the two different viruses *Phaseolus-virus 2* and *Freesia-virus*, it can be concluded that no serological relationship exists between these two viruses.

V. ELECTRON MICROSCOPY OF FREESIA VIRUSES

Four electron micrographs are shown taken of virus carrying suspensions.

Figure 1 is a micrograph of a suspension obtained by purification by means of ammoniumsulphate from sap of infected Freesias of the variety Apotheose, dialysed and diluted 1 : 50 with distilled water.

Serological reactions were positive against both AFrVi- and APhVi2-sera. Straight rodshaped particles are seen at the left of the micrograph next to filiform coiled ones in the middle.

Figure 2 is a micrograph taken of the same infected variety of sap that had been frozen for 5 months, showing rodshaped particles with a diameter of about $20\text{ m}\mu$ and $1\text{--}2.5\text{ }\mu$ in length. It is supposed that these particles represent the *Freesia-virus* and that presumably the less stable *Phaseolus-virus 2* has been lost by freezing.

Before freezing the fresh sap had reacted positively against both AFrVi- and APhVi2-sera, after thawing positive reactions were obtained only with AFrVi-serum.

Figure 3 is a micrograph of a suspension obtained from infected Broadbeans, reacting positively with APhVi2-serum, showing filiform coiled particles.

Figure 4 is a micrograph taken of diluted sap of the perianth of infected *Freesia* of the variety Apotheose, showing intertwined particles. This sap reacted positively with both AFrVi- and APhVi2-sera.

From the electron micrographs it looks as if the *Freesia-virus* particles tend to be rodshaped, whereas the *Phaseolus-virus 2* particles are coiled.

In preparations made from sap of healthy Broadbeans and isolated *Freesia* seedlings no such particles have been found.

VI. THE SPREADING OF VIRUS INFECTION OF THE DIFFERENT FREESIA VARIETIES

The serum that was first prepared appeared afterwards to have reference to a virus which was so far unknown, viz. the *Freesia-virus* + the *Phaseolus-virus 2*. At Lisse a serum against the *Phaseolus-virus 2* has already been prepared. With these two sera the following cases can be distinguished.

- a. No virus present.
- b. Only *Freesia-virus* present.
- c. *Phaseolus-virus 2* present (accompanied or not with the *Freesia-virus*).

Serological tests proved that *Freesia-virus* is widely spread in most *Freesia* varieties.

- a. From the serological tests a provisional grouping of the varieties can be made, according to the way in which they react upon the presence of the two kinds of virus.
 1. Varieties, such as Giant White and Prinses Irene, in which the presence of the *Freesia-virus* does not become apparent at all, while the presence of the *Phaseolus-virus 2* usually manifests itself only in slight stripes of the bracts (Fig. 5 and Table 11).
 2. Varieties that do not always show clear symptoms when the *Freesia-virus* is present, but always show distinct symptoms when *Phaseolus-virus 2* is extant (Table 12 and 13). By far most of the cultivated varieties belong to this group. In the varieties of this group and of the group mentioned first, we have never found plants in which the *Freesia-virus* was not present. The plants of group 2a (Table 12) never showed any symptoms on the leaves when the *Freesia-virus* was present. With the plants of group 2b (Table 13) the infection of the *Freesia-virus* could sometimes be recognized on the leaves.
 3. Varieties with which the presence of the *Freesia-virus* always shows distinct symptoms. This is as yet only found with the variety Marion, which is known for its great susceptibility for virus (Table 14).

4. Varieties which are multiplied by seed and therefore show few virus diseases.
5. Varieties, such as Bronzen Giant and King of the Yellow, which very commonly show spots on the leaves, but with which the presence of a virus could never be found serologically (Table 15).
6. The variety Snow Queen is a case apart (Table 16). Besides the symptoms already mentioned necrosis is found in the corms and little spots on the leaves. Serologically no clear connection between the kinds of virus mentioned above and the symptoms could be found.

b. The varieties Prinse Irene (white) and Giant White may show extremely slight spots on the leaves, but seldom closed flowers. Clear slight stripes on the bracts are often visible (Fig. 5). Owing to the slight symptoms shown by these varieties selection for soundness is very difficult.

Nearly the same applies to the variety Mammoeth (white). In the early stage, however, an affection of *Phaseolus-virus 2* on the leaf can always be recognized.

With Buttercup (yellow) *Phaseolus-virus 2* can clearly be recognized. The flowers are smaller and closed while the vegetative growth decreases considerably. On the leaf slight mosaic spots are found (Fig. 6 and 7). In general lines the same applies to the variety Caro Carlee. When the *Freesia-virus* is present the cream-yellow flowers often show a refraction but this is not very conspicuous. With the variety Prinse Marijke two deviations can be distinguished.

1. A slight refraction of the orange colour of the flower (Fig. 9) with which only sometimes a very slight infection of the leaf is visible. This symptom may be caused by the *Freesia-virus*.
2. A closed form of the flowers (Fig. 8) attended with a clear infection of the leaf. This is caused by *Phaseolus-virus 2*. The deviations mentioned above can also be distinguished with the varieties Blauwe Wimpel (bright blue), Saffier (lighter blue), Oranje Zon (orange) and Apotheose (lilac-pink). With Oranje Zon the refraction of the colour of the flower is less clear, while this symptom is much more serious with Apotheose. The variety Marion (lilac-blue) always shows the presence of the *Freesia-virus* by clear mosaic symptoms on the leaves with light-grey stripes on the flower-stems. The colour of the flower is refracted and the flower remains small (Fig. 10). Sometimes the flower is closed. Probably the *Phaseolus-virus 2* is responsible for this. The varieties Bronzen Giant (bronze coloured) and King of the Yellow (yellow) generally show clear spots and stripes on the leaves (Fig. 12).

The variety Snow Queen (white) suffers much from virus.

Besides the mosaic symptoms necrotic spots on the leaves may occur (Fig. 13a and b) just as on the flowerstem. Serologically it was not possible, however, to connect the presence of closed flowers and the presence of *Phaseolus-virus 2*. Often pistil and stamens protrude above the little closed flowers (Fig. 14). With this variety necrosis in the corms is sometimes found (Fig. 13d and e). Necrosis of the corms is often attended with a very serious affection on the leaves.

VII. HOSTS OF THE VIRUSES AFFECTING THE FREESIA

It is not known what plants and weeds are affected by the *Freesia-virus*. It was known that the *Phaseolus-virus 2* may occur in different pea and bean varieties (Fig. 16 and 17) as well as in gladioli. In practice there are indications that Freesias may be infected with *Phaseolus-virus 2* from beans. The sweet pea proved to be a host. With this plant a refraction of the colour of the flower occurs (Fig. 15) while more or less clear mosaic symptoms may be seen on the leaves.

VIII. POSSIBILITIES OF CONTROL

To control the virus diseases of Freesias first of all a rigid selection of the reproductive material is necessary, as the virus is transmitted for nearly 100% with the corm. Measures must be taken to prevent infection from the outside. Infected varieties and varieties such as Prinses Irene and Giant White, which usually do not show clear symptoms when infected, should not be cultivated close to sound varieties. This also applies to plants which are known to be hosts for one of the viruses mentioned, such as different kinds of peas and beans together with sweet peas and gladiolis. When the flowers are cut, infected and sound parcels must be treated quite separately. Further it will be necessary to keep the plants absolutely free from aphids, which may transmit the disease from diseased plants to sound ones. A number of means of control have been compared for the quickness of their killing and durative effect on *Macrosiphum euphorbiae*. Systox gave the best results. By spraying the plants with a solution of 0.1% or by watering the soil with a solution of 0.05% the plants can be kept free from aphids for about 3 weeks.

X. LITERATUUR

- ANON. – 1947. Carnation and gladiolus virus diseases pose serious problems. Florists rev. 6-2-1947.
ANON. – 1948. Ann. rep. Can. plant disease surv. 27: 108.
BAWDEN, F. C., R. P. CHAUDHURI en B. KASSANIS – 1951. Some properties of broad-bean mottle virus. Ann. of Applied Biol. 38: 774.
BERKELEY G. H. – 1953. Some viruses affecting gladiolus. Phyt. 43: 111.
BOOIJ, H. L., MARIA P. DE BRUIJN OUBOTER, MARGARETHA C. CREMER en E. VAN SLOGTEREN – 1944. Verslag van het serologisch onderzoek betreffende de vergelingsziekte der suikerbieten. Meded. v. h. Inst. v. rationele suikerproductie te Bergen op Zoom, 14.
BRIDGMON G. H. en J. C. WALKER – 1952. Gladiolus as a virus reservoir. Phyt. 42: 65.
HILLE RIS LAMBERS, D. – 1947 en 1949. Contributions to a monography of the Aphididae of Europe. Temminckia 7 en 8.
SMITH, KENNETH M. – 1937. A textbook of plant virus diseases: 424.
MCWHORTER, F. P., LYTTON BOYLE en B. F. DANA – 1947. Production of yellow bean mosaic in beans by virus from mottled gladiolus. Science 105, no 2720.

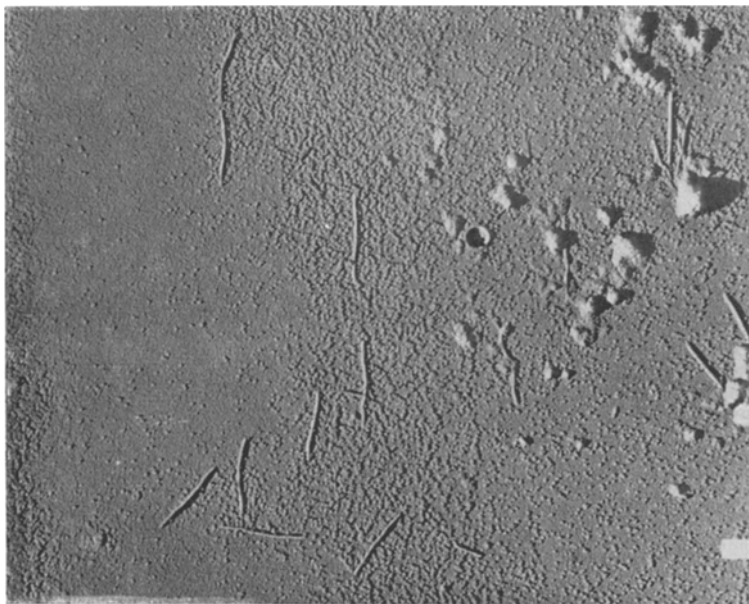


Fig. 1. Perssap van bladeren van besmette Freesia. Var. Apotheose. 15000 $\times$; geschaduwd met palladium.
Sap of leaves of infected Freesia. Var. Apotheose. 15000 $\times$; shadowed with palladium.



Fig. 2. Hetzelfde perssap ontdooit na bevroering gedurende 5 maanden. 15000 $\times$; geschaduwd met palladium.
The same sap thawed after freezing during 5 months. 15000 $\times$; shadowed with palladium.

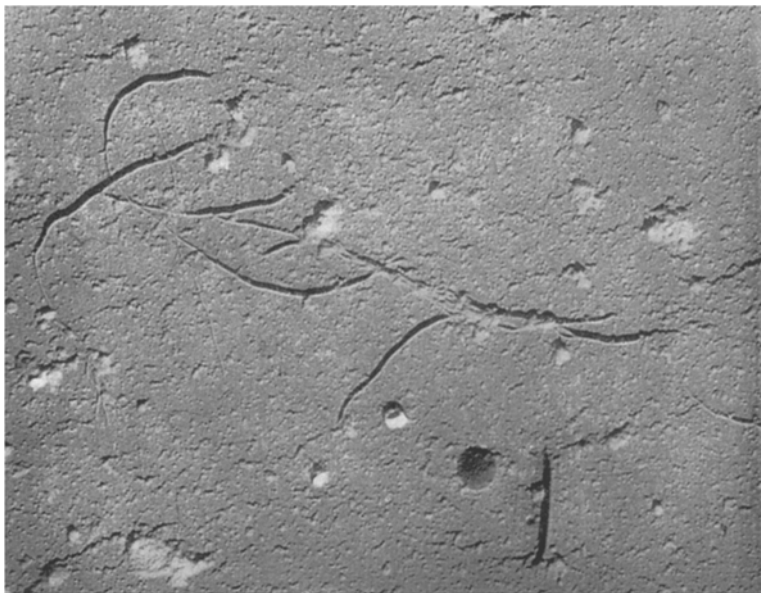


Fig. 3. Perssap van tuinbonen besmet met *Phaseolus-virus* 2; 15000 $\times$; geschaduwd met palladium.

Sap of broadbeans infected with Phaseolus-virus 2; 15000 $\times$; shadowed with palladium.

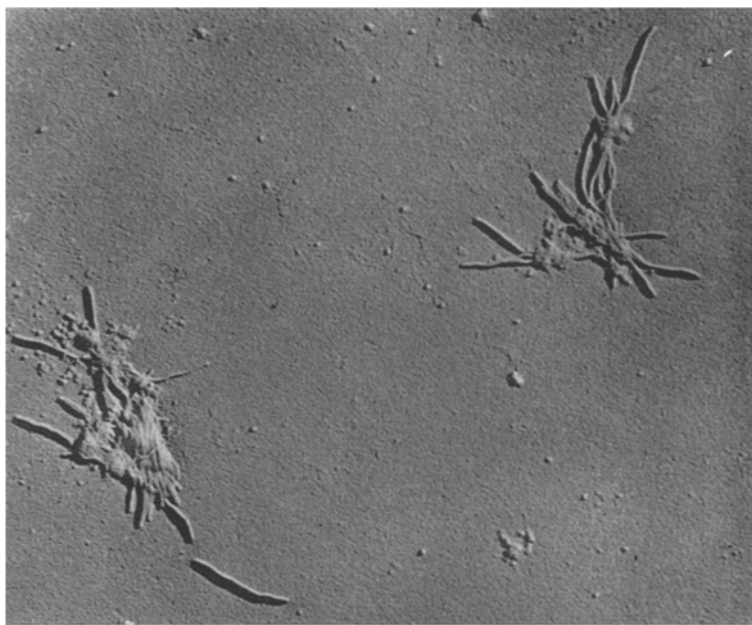


Fig. 4. Perssap van het bloemdek van besmette *Freesia* Apotheose; 15000 $\times$; geschaduwd met palladium.

Sap of the perianth of infected Freesia var. Apotheose; 15000 $\times$; shadowed with palladium.



Fig. 5. Freesia-ras Prinses Irene. Lichte strepen op de bracteeën.
Freesia variety Prinses Irene. Light-coloured stripes on the bracts.

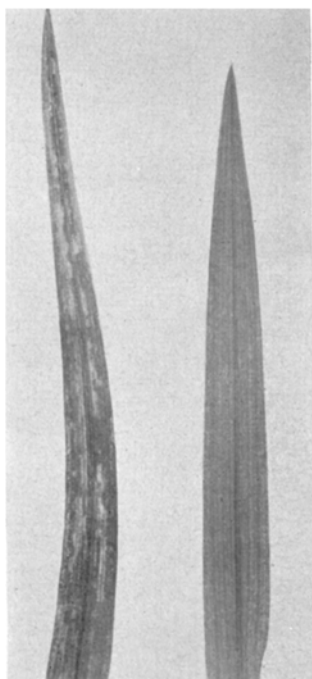


Fig. 6
Freesia-ras Buttercup.
Links: mozaïekvlektekening op het blad;
Rechts: gezond.
Freesia variety Buttercup.
Left: mosaic symptoms on the leaf.
Right: healthy leaf.

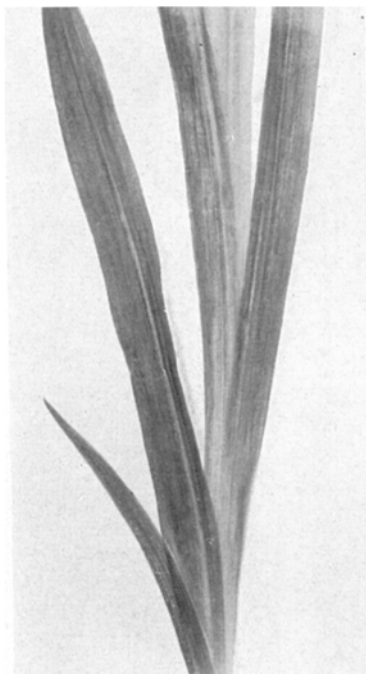


Fig. 7
Freesia-ras Buttercup.
Aan de voet van de bladeren een licht-groene tot gele streping.
Freesia variety Buttercup.
At the foot of the leaves light green to yellow stripes.

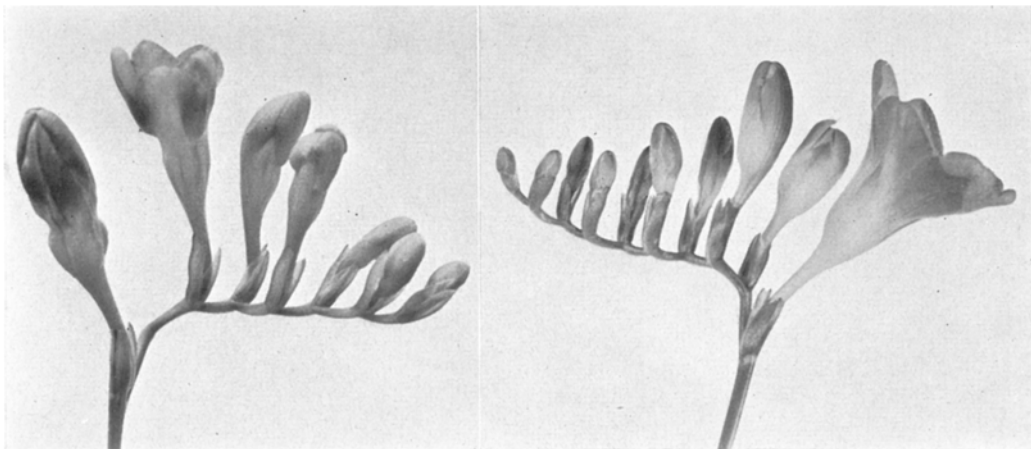


Fig. 8. *Freesia*-ras Prinses Marijke. Links: „geknepen” bloemen; rechts: gezond.
Freesia variety Prinses Marijke. Left: „closed” flowers; right: healthy flowers.

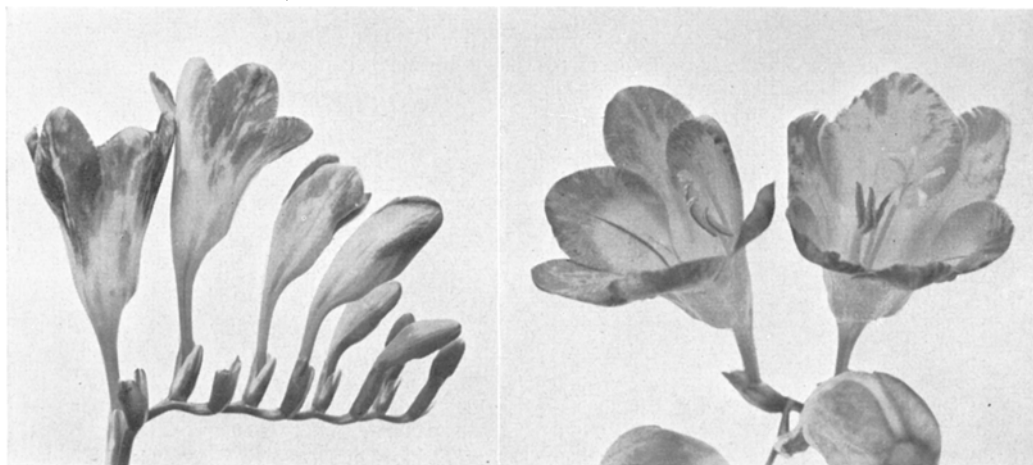


Fig. 9. *Freesia*-ras Prinses Marijke. Gevlekte bloemen. Links: van opzij; rechts: van binnen.
Freesia variety Prinses Marijke. „Broken” colour. Left: from aside; right: from the inside.



Fig. 10. *Freesia*-ras Marion. Gevlekte bloemen.
Freesia variety Marion. „Broken” colour.

Fig. 11. *Freesia*-ras Marion. Sterk geknepen, gerafelde bloemen. Bovendien gevlekt.
Freesia variety Marion. Strongly „closed”, fringed flowers. Moreover „broken” colour.

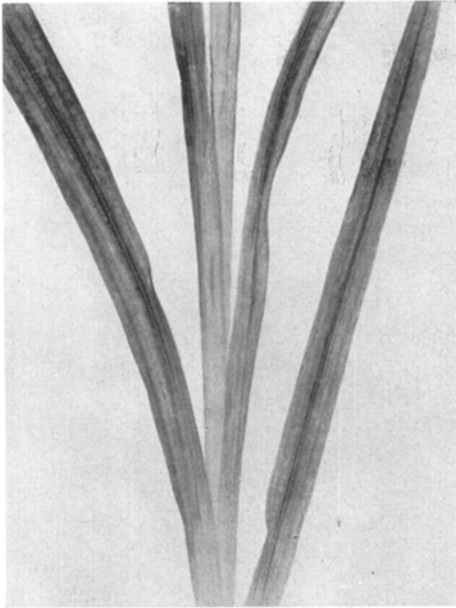


Fig. 12. Freesia-ras Bronzen Giant. Mozaiekvlektekening op het blad waarschijnlijk niet door virus veroorzaakt.
Freesia variety Bronzen Giant. Mosaic-like symptoms on the leaf probably not caused by virus.

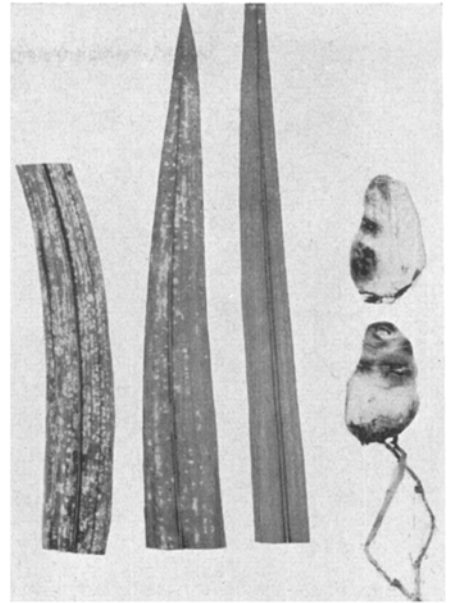


Fig. 13. Freesia-ras Snow Queen. Op het blad: a. sterke mozaiekvlektekening en necrose; b. zwakke mozaiekvlektekening; c. gezond. Verder necrose in de knollen: d. op doorsnede in de knol; e. uitwendig op de knol.
Freesia variety Snow Queen. On the leaf: a. strong mosaic symptoms and necrosis; b. weak mosaic symptoms; c. healthy. Furthermore necrosis in the corms; d. in section in the corm; e. exterior on the corm.



Fig. 14. Freesia-ras Snow Queen. Links: korte geknepen bloemkroon; stamper en meeldraden naar buiten uitstekend. Rechts: gezond.
Freesia variety Snow Queen. Left: short closed corolla pistil and stamen protruding. Right: healthy flowers.

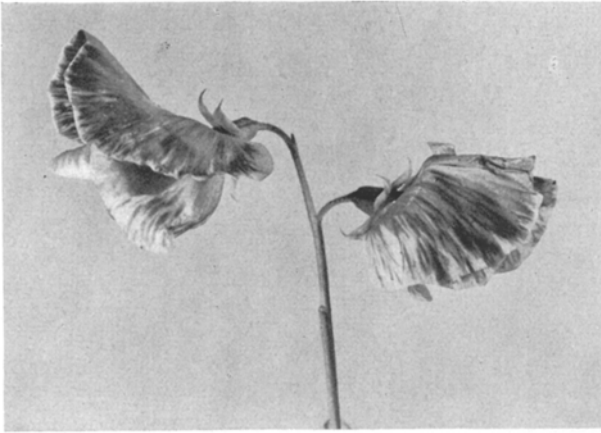


Fig. 15. *Phaseolus-virus 2* op lathyrus. Gestreepte bloemen.
Phaseolus-virus 2 on sweet peas. „Broken” colour.

Fig. 16. *Phaseolus-virus 2* op stamprinsessebonen. Scherp mozaiek op het blad.
Phaseolus-virus 2 on French beans. Sharp mosaic on the leaf.

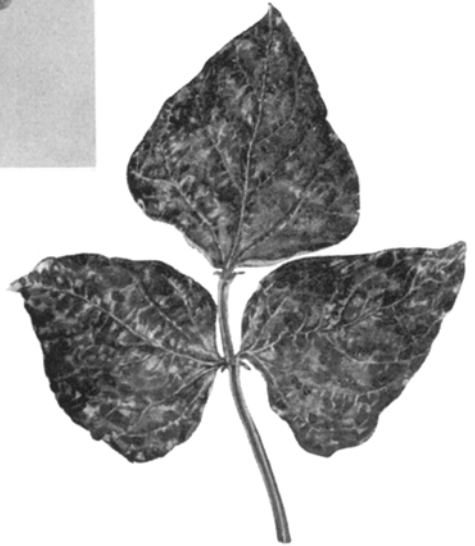


Fig. 17. *Phaseolus-virus 2* op tuinboon. Mozaiekvlektekening op het blad.
Phaseolus-virus 2 on broad beans. Mosaic symptoms on the leaf.