

ELECTRONENMICROSCOPIE VAN
PAPIERCHROMATOGRAFISCH VERKREGEN FRACTIES
VAN PLANTENSAPPEN UIT VIRUSZIEK
EN GEZOND MATERIAAL

With a summary: Electron-microscopy of fractions obtained by paperchromatography from juices of virus diseased and healthy plants

DOOR

H. W. J. RAGETLI¹⁾,

Laboratorium voor Phytopathologie der Landbouwhogeschool, Wageningen

CHRISTINA VAN DER SCHEER

Laboratorium voor Natuur- en Weerkunde der Landbouwhogeschool, Wageningen
en

J. P. H. VAN DER WANT

Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek, Wageningen

1. INLEIDING

Uit een voorgaand onderzoek met tabaksmozaïekvirus (RAGETLI & VAN DER WANT, 1954) was gebleken, dat toepassing van papierchromatografie op semi-preparatieve schaal ter verkrijging van viruspreparaten, geschikt voor electronenmicroscopisch onderzoek, perspectieven biedt. VAN DER WANT (1954) maakte dan ook reeds gebruik van deze techniek bij een studie over bonenviren.

Om de waarde der methode nader te toetsen werd zij, in het kader van het hier te bespreken onderzoek, toegepast op het sap van planten, die met een zestal uiteenlopende viren besmet waren. Gekozen werden viren, die op grond van door andere onderzoekers verricht electronenmicroscopisch onderzoek, tot onderscheiden morphologische groepen gerekend kunnen worden, nl. viren met een staafvormige-, draadvormige- of bolvormige habitus. De werkwijze alsmede de resultaten van het onderzoek worden beschreven, terwijl een deel van de verkregen electronenfoto's gereproduceerd wordt.²⁾

2. METHODE EN MATERIAAL

2.1. Zoals reeds eerder beschreven is (RAGETLI & VAN DER WANT, 1954), wordt de te chromatograferen vloeistof (0,09 ml) aangebracht op een strook filterpapier (WHATMAN no 1) van 57 cm lang en 6 cm breed, binnen een vooraf met potlood getekende rechthoek van 3×4 cm, die oorsprong genoemd wordt (Fig. 1). De bovenzijde van de oorsprong bevindt zich op 6 cm van de bovenrand van de strook; de verticale zijden zijn op 1 cm van de zijanten van de strook gelegen. Het bovineinde van de strook wordt vervolgens langs de lijn CD omgevouwen en tussen twee glasplaatjes geklemd; deze worden daarna in een

¹⁾ Geniet gastvrijheid op het Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek.

²⁾ De schrijvers willen gaarne hun dank betuigen aan Mejuffrouw S. PEL voor haar hulp bij de papierchromatografie en aan de Heer S. HENSTRA voor zijn hulp zowel bij de electronenmicroscopie als bij de vervaardiging der electronenfoto's.

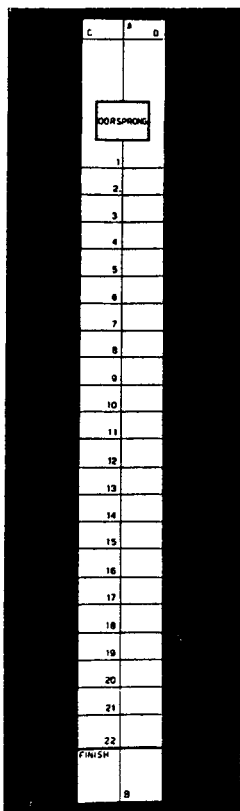


Fig. 1

porceleinen schaalte geplaatst, waarin de ontwikkelvloeistof gebracht wordt, voordat de op de oorsprong aangebrachte vloeistof is opgedroogd. Als ontwikkelvloeistof werd in het hier te bespreken onderzoek steeds dubbel gedestilleerd water gebruikt. De vloeistof wordt tussen de glasplaatjes opgezogen, bereikt het filtreerpapier en beweegt zich hierin verder. Het porceleinen schaalte met de tussen de glasplaatjes geklemde papierstrook bevindt zich in een ruimte, die met waterdamp verzadigd is. Nadat het vloeistoffront een lijn (finish) op 44 cm afstand van de benedenzijde van de oorsprong bereikt heeft, wordt het chromatogram gedurende 10 tot 15 minuten gedroogd in een stoof bij ongeveer 55° C. Vervolgens wordt het langs de lijn AB in tweeën geknipt en wordt één der helften in ultraviolet licht van omstreeks 265 m μ gefotografeerd. Aldus kunnen bepaalde, dit ultraviolette licht absorberende stoffen in het chromatogram gelocaliseerd worden. Daar deze stoffen, of stoffen die in het chromatogram hiermee samenvallen, bij het electronenmicroscopisch onderzoek het zichtbaar maken van de virusdeeltjes blijken te bemoeilijken, is het van belang hun plaats nauwkeurig te kennen.

Omdat tijdens het drogen van het chromatogram de besmettelijkheid van het virus, afhankelijk van de aard van dit virus, of sterk vermindert, of geheel verloren gaat, worden de preparaten ten behoeve van het electronenmicroscopisch onderzoek gemaakt van fracties, afkomstig van een tweede chromatogram, dat van hetzelfde sap en op volkomen gelijke wijze als het eerste vervaardigd wordt, doch dat niet gedroogd wordt. Als

de ontwikkelvloeistof de finish heeft bereikt, wordt het chromatogram in een aantal zones geknipt, waarbij rekening wordt gehouden met de plaats waar de stoffen, die ultraviolet licht absorberen, zich bevinden. De stroken filtreerpapier zijn van tevoren met potlood verdeeld in 22 gelijke zones, elk van 2 cm breedte, hetgeen het verdelen van het chromatogram vergemakkelijkt (Fig. 1). Iedere zone wordt met dubbel gedestilleerd water geëxtraheerd naar een hoeveelheid van 0,5 ml per zone van 2 cm. Het filtreerpapier wordt hierbij met een glasstaaf intensief met het water in aanraking gebracht, waarna het vocht uit de aldus verkregen papierpulp in een klein trechtertje over hard filtreerpapier wordt afgezogen. Dit dient om fijne cellulosevezels uit de vloeistof te verwijderen. Van de waterheldere vloeistoffen worden electronenmicroscoppreparaten vervaardigd, waarna de overgebleven gedeelten op toetsplanten worden geïnoculeerd ten einde de virusactiviteit in de verschillende zones vast te stellen.

Werd in de eerste publicatie het gebruik van gecentrifugeerd sap beschreven, bij het onderhavige onderzoek werd ruw perssap van zieke en gezonde planten op de oorsprong aangebracht. Onder ruw perssap wordt hier verstaan sap, verkregen door plantendelen in een mortier fijn te maken en vervolgens door kaasdoek uit te persen.

Het is gebleken, dat toevoeging van KCN aan het ruwe perssap, direct na het uitpersen, tot een eindconcentratie van 0,1 % een gunstige invloed heeft op het bewaren van de besmettelijkheid van verschillende plantenviren gedurende het chromatografische proces. Daarom is aan alle onderzochte ruwe perssappen KCN toegevoegd.

2.2. Het onderzoek had betrekking op sap van tabaksplanten (*Nicotiana tabacum* var. White Burley) respectievelijk besmet met tabaksmozaïekvirus (*Nicotiana-virus 1*)¹⁾, ratelvirus (*Nicotiana-virus 5*)¹⁾, aardappel X-virus (*Solanum-virus 1*)¹⁾, een tabaksnecrosevirus (uit de groep *Nicotiana-virus 11*)¹⁾, geïsoleerd uit de wortels van *Bouvardia humboldtii*, komkommermozaïekvirus (*Cucumis-virus 1*)¹⁾, t.w. de „gele” stam nr 6 van PRICE (1934); op sap van tomaat (*Lycopersicum esculentum* var. Ailsa Graig), besmet met bushy stunt virus (*Lycopersicum-virus 4*)¹⁾ en op sap van gezonde tabaksplanten var. White Burley en gezonde tomatenplanten var. Ailsa Graig.

Als proefplanten ter bepaling van de besmettelijkheid der extracten werden gebruikt: voor tabaksmozaïekvirus afgesneden bladeren van *Nicotiana glutinosa*; voor ratelvirus, aardappel X-virus en komkommermozaïekvirus planten van *Nicotiana tabacum* var. White Burley; voor tabaksnecrosevirus zowel White Burley planten als planten van *Phaseolus vulgaris* var. Beka; voor bushy stunt virus ten slotte planten van *Vigna sinensis*.

3. RESULTATEN VAN HET ONDERZOEK

3.1. Tabaksmozaïekvirus

Fig. 2A geeft een electronenfoto van een preparaat vervaardigd van het waterige extract van zone 16–20 (zie Fig. 1) uit een papierchromatogram, gemaakt van het ruwe sap van met tabaksmozaïekvirus besmette White Burley planten. In het vergelijkingschromatogram bevond zich een ultraviolet licht absorberende vlek in de zone van 6–15,5. Naast een groot aantal staafvormige deeltjes van een opvallend uniforme lengte komen op de electronenfoto kleine, onregelmatig gevormde, partiekeltjes voor.

3.2. Ratelvirus

Fig. 2B geeft een electronenfoto van een preparaat, vervaardigd van het waterige extract van zone 7–11 uit een chromatogram, gemaakt van het ruwe sap van met ratelvirus besmette White Burley planten. In het vergelijkingschromatogram bevond zich een ultraviolet licht absorberende vlek in de zone van 11–18. Tegen een zeer gelijkmatige achtergrond tekent zich een aantal staafvormige deeltjes scherp af. In tegenstelling tot de uniformiteit van de deeltjes in het tabaksmozaïekviruspreparaat kunnen de hier weergegeven deeltjes in drie lengte-groepen worden ingedeeld. Voorts komen enige zeer kleine, onregelmatige deeltjes op de foto voor.

3.3. Aardappel X-virus

Fig. 3A geeft een electronenfoto van een preparaat, vervaardigd van het waterige extract van zone 4–8 uit een chromatogram, gemaakt van het ruwe sap van met X-virus besmette White Burley planten. In het vergelijkingschromato-

¹⁾ Volgens de nomenclatuur van SMITH (1937).

gram bevond zich een ultraviolet licht absorberende vlek in de zone van 13–19. Tussen een groot aantal, over het gehele gezichtsveld voorkomende, onregelmatige, kleine lichaampjes, die soms in hoopjes bijeen liggen, bevinden zich draadvormige deeltjes. Het is opvallend, dat deze draadvormige deeltjes alle van ongeveer gelijke lengte zijn.

3.4. *Tabaksnecrosevirus*

Fig. 3 B geeft een electronenfoto van een preparaat, vervaardigd van het waterige extract van zone 15–18,5 uit een chromatogram, gemaakt van het ruwe sap van met tabaksnecrosevirus besmette White Burley planten. Fig. 3C heeft betrekking op het extract van zone 6–9,5 van hetzelfde chromatogram. In het vergelijkingschromatogram bevond zich een ultraviolet licht absorberende vlek in de zone 10–18.

In Fig. 3B komen verspreid uniforme, bolvormige deeltjes voor naast, en ten dele als het ware ingebed, in een substantie van onduidelijke, deels korrelige, structuur. Waarschijnlijk is deze substantie in haar geheel of voor een deel aansprakelijk voor de sterke ultraviolet absorptie, die in het gedroogde chromatogram in deze zone geconstateerd werd. In Fig. 3C daarentegen tekenen deze bolvormige deeltjes zich veel duidelijker, zij het in geringer aantal, tegen een gladdere achtergrond af. Het verschil tussen Fig. 3B en 3C is, wat betreft het aantal bolvormige deeltjes, geheel in overeenstemming met het verschil in infectieusiteit van de beide extracten, waarvan de betreffende electronenpreparaten vervaardigd werden. Behalve genoemde bolvormige deeltjes kunnen in Fig. 3C ook veel kleinere, min of meer ronde lichaampjes worden waargenomen.

3.5. *Komkommermozaïekvirus*

Bij de vergelijking van de electronenfoto's, vervaardigd van de extracten van vier zones uit een chromatogram, gemaakt van ruw sap van met komkommervirus besmette White Burley planten, bleken vooral in zone 0,5–3 kleine, min of meer hoekige, partiekeltjes voor te komen. Fig. 4A geeft zo'n electronenfoto van een preparaat, vervaardigd van het extract uit zone 0,5–3. In het vergelijkingschromatogram bevond zich een ultraviolet licht absorberende vlek in zone 11–19. Hoewel de in Fig. 4A voorkomende, eerder genoemde partiekeltjes door hun weinig sprekende gedaante niet erg opvallen, werd aan deze om verschillende redenen toch de besmettelijkheid van het sap toegeschreven. Het extract van zone 0,5–3 bleek nl. bij inoculatieproeven sterk infectieus te zijn, terwijl in preparaten, gemaakt van het extract van een overeenkomstige zone uit een chromatogram van sap van gezonde White Burley planten, deeltjes ter grootte van die, voorkomend in ziek materiaal, niet werden aangetroffen; zie Fig. 4B.

Het geringere aantal specifieke deeltjes in de electronenfoto's van de preparaten der extracten van de andere zones uit het chromatogram, gemaakt van het sap uit met komkommermozaïekvirus besmette White Burley planten, is bovendien in overeenstemming met de geringere besmettelijkheid van die extracten.

3.6. *Bushy stunt virus*

Fig. 5A geeft een electronenfoto van een preparaat, vervaardigd van het waterige extract van zone 20–22 uit een chromatogram, gemaakt van ruw sap van met bushy stunt virus besmette tomatenplanten (var. Ailsa Craig). In het

vergelijkingschromatogram bevond zich een ultraviolet licht absorberende vlek in de zone 11–18,5. Tegen een vrij gladde achtergrond tekenen zich talrijke, meest afzonderlijk liggende, lichaampjes duidelijk af. Ook komt het voor dat twee, en een enkele keer zelfs meer deeltjes tegen elkaar aanliggen. Oppervlakkig bezien, zijn deze lichaampjes bolvormig. Bij nadere beschouwing blijkt de omtrek echter hoekig. Dit komt vooral in een detailvergroting, in Fig. 5B weergegeven, tot uiting. Verschillende van de in Fig. 5B voorkomende deeltjes geven bovendien nog een zekere grijs-wit tekening te zien, die op een polyëdrische vorm van de ingedroogde lichaampjes zou kunnen wijzen, dan wel een samengesteld karakter zou kunnen verraden.

3.7. *Gezonde tabak en tomaat*

Fig. 4B geeft een electronenfoto van een preparaat, vervaardigd van het waterige extract van zone 0,5–3 uit een chromatogram van ruw sap van gezonde White Burley planten. In het vergelijkingschromatogram bevond zich een ultraviolet licht absorberende vlek in zone 9–17. Tegen een egale en vrij gladde achtergrond tekenen zich enkele verspreide, zeer kleine, deeltjes af.

Fig. 5C geeft een electronenfoto van een preparaat, vervaardigd van het waterige extract van zone 20–22 uit een chromatogram van ruw sap van gezonde tomatenplanten. In het vergelijkingschromatogram bevond zich een ultraviolet licht absorberende vlek in de zone 10,5–18. De sporadisch op de foto voorkomende deeltjes hebben noch de grootte noch de vorm van de specifieke deeltjes, die in zo groten getale in het extract van de overeenkomstige zone uit het chromatogram van het sap van bushy stunt viruszieke tomatenplanten, werden aangetroffen.

4. NABESPREKING

Uit de hiervoren weergegeven resultaten kan worden besloten, dat de beschreven papierchromatografische fractionering van ruwe perssappen uit viruszieke en gezonde planten zeer geschikt is voor de vervaardiging, op eenvoudige wijze, van goede preparaten voor electronenmicroscopisch onderzoek. Op deze wijze konden immers in het ruwe perssap van tabaksplanten, respectievelijk besmet met tabaksmozaïekvirus, aardappel X-virus, tabaksnecrovirus en komkommermozaïekvirus en van tomatenplanten, besmet met bushy stunt virus, voor elk dezer ziekten kenmerkende deeltjes worden aangetoond. Het bijzonder zachtaardige karakter der papierchromatografische methode schijnt bovendien tot gevolg te hebben, dat deze voor de verschillende virusziekten kenmerkende deeltjes zich in de electronenopnamen doorgaans als enkelvoudige, althans weinig geaggregeerde, lichaampjes voordoen.

De in het sap van tabaksmozaïekzieke tabaksplanten voorkomende deeltjes beantwoorden aan het beeld, dat sedert het eerste electronenmicroscopische onderzoek van het tabaksmozaïekvirus door KAUSCHE, PFANKUCH & RUSKA (1939) bekend is. De in Fig. 2A gereproduceerde electronenfoto vertoont echter deeltjes, uniformer van lengte en meer in overeenstemming met de electronenfoto's, die door SIGURGEIRSSON & STANLEY (1947) van tabaksmozaïekvirus zijn gepubliceerd. De door laatstgenoemde auteurs verkregen electronenfoto's waren vervaardigd van sap, dat na voorafgaande bevrozing en ontdooiing van de planten werd verkregen en dat vervolgens met water 50 maal werd verdund.

Aldus werden preparaten verkregen, die betrekkelijk veel bijmengsels bevatten, terwijl de dichtheid van de staafvormige deeltjes, in vergelijking met Fig. 2A, aanzienlijk minder was. Aangaande de wijze van isoleren is zowel de methode van SIGURGEIRSSON & STANLEY als de hier beschreven methode zeer zachtaardig; de door de Amerikaanse onderzoekers toegepaste methode zal echter vooral bij viren, die in een lage concentratie in het sap voorkomen, tot minder fraaie resultaten leiden.

Het voorkomen van betrekkelijk kleine, staafvormige deeltjes in het sap van tabaksplanten, besmet met ratelvirus, is in overeenstemming met het resultaat van eerder verricht onderzoek door VAN DER WANT & ROZENDAAL (1948) aan, met behulp van ammoniumsulfaat gezuiverde, ratelviruspreparaten. Staafvormige deeltjes met een lengte gelijk aan of groter dan het grootste deeltje, dat in Fig. 2B zichtbaar is, werden in de met papierchromatografie verkregen preparaten sporadisch waargenomen. Hoewel nader onderzoek hierover wenselijk is, werd de indruk verkregen, dat in het met ammoniumsulfaat gezuiverde ratelvirus een groter aantal langere deeltjes voorkomen dan in de met papierchromatografie verkregen fracties. Mogelijk is dit toe te schrijven aan de aggregatie van kleinere deeltjes onder invloed van de hoge ammoniumsulfaatconcentraties.

De neiging tot aggregatie van aardappel X-virusdeeltjes is zeer sterk onder invloed van centrifugeren bij hoog toerental (TAKAHASHI & RAWLINGS, 1946) of van ammoniumsulfaat (KLECZKOWSKI & NIXON, 1950). Fig. 3A laat duidelijk zien, dat de papierchromatografische fractionering de vorming van dergelijke aggregaten kennelijk verhindert, gezien de afzonderlijke ligging en de vrij uniforme lengte der afgebeelde draadjes. De deeltjes uit Fig. 4A komen sterk overeen met de deeltjes, die BODE & KÖHLER (1952) in het bloedingsap van met X-virus besmette Samsun-tabaksplanten waarnamen.

Tabaksnecroseviren zijn electronenmicroscopisch door BAWDEN & NIXON (1951) onderzocht. Deze auteurs onderscheidten op grond van de diameter der deeltjes verschillende typen van viren. Merkwaardig is, dat in het sap van met één der tabaksnecroseviren, het zg. Rothamsted tabaksnecrosevirus, besmette tabaksplanten twee typen van deeltjes met verschillende diameter konden worden aangetoond, althans in gezuiverde viruspreparaten. De in Fig. 3B en 3C voorkomende bolvormige deeltjes uit het sap van White Burley planten, besmet met een tabaksnecrosevirus, geïsoleerd uit *Bouvardia*-wortels, zijn alle van gelijke diameter. Hun vorm sluit aan bij die der door de andere auteurs onderzochte isolaties van tabaksnecrosevirus.

De electronenfoto's, die betrekking hebben op de gele stam nr 6 van PRICE van komkommermozaïekvirus (*Cucumis-virus* 1) hebben aangetoond, dat de virusdeeltjes, wanneer zij langs papierchromatografische weg uit het sap van zieke White Burley planten worden geïsoleerd, zeer geringe afmetingen hebben. Immers omdat het extract afgebeeld in Fig. 4A, een sterke besmettelijkheid bezat, werden de in deze foto voorkomende, kleine, enigszins hoekige, lichaampjes wel als dragers van de besmettelijkheid beschouwd, temeer daar deze deeltjes in gezond materiaal ontbraken. Een rechtstreekse vergelijking van de hier gereproduceerde electronenfoto met die, welke door andere onderzoekers werden verkregen, is niet wel mogelijk. SILL, BURGER, STAHMANN & WALKER (1952) hebben studie gemaakt van de deeltjes, voorkomend in het perssap uit bloemkronen van komkommerplanten, besmet met een andere stam van

Cucumis-virus 1 dan de hier gebruikte. Dit sap werd na verdund te zijn bij een matig toerental ($9000 \times G$) gedurende 80 minuten gecentrifugeerd. Vervolgens werden van de bovenstaande vloeistof preparaten voor electronenmicroscopisch onderzoek gemaakt. De genoemde auteurs vonden naast aggregaten min of meer bolvormige deeltjes (diam. $\pm 35 m\mu$), vooral indien het sap vrij sterk verdund werd, nl. 1 op 50 of meer. NOORDAM (1952) werkte met een vorm van *Cucumis-virus* 1, verantwoordelijk voor een mozaïekziekte bij chrysant, die op tabak kon worden overgebracht. Ook hij vond kleine ronde deeltjes, die soms tot grotere aggregaten waren samengeballd. De door DE BRUYN OUBOTER, BEYER & VAN SLOGTEREN (1951) gepubliceerde foto, die betrekking heeft op hetzelfde virus als waarmee NOORDAM werkte, vertoont vrij grove, min of meer ronde deeltjes. Enkele dezer deeltjes suggereren, dat zij samengesteld zijn uit kleinere lichaampjes.

De in Fig. 5A voorkomende lichaampjes, die uit het ruwe sap van met bushy stunt virus besmette tomatenplanten geïsoleerd werden door papierchromatografische fractionering, komen overeen met die welke PRICE, WILLIAMS & WYCKOFF (1946) verkregen d.m.v. gedifferentieerd centrifugeren. Hoewel genoemde auteurs de vorm der deeltjes als bolletjes omschrijven, moet deze bij nauwkeurige beschouwing van Fig. 5A en vooral van 5B als duidelijk hoekig worden aangeduid. BRAKKE, VATTER & BLACK (1954) menen voor een plant-aardig wound tumor virus aan de hand van electronen-foto's tot een polyaëdrische vorm te mogen besluiten op grond van de hoekigheid dezer deeltjes zelf en het tot op zekere hoogte hoekige karakter van hun schaduw. Hoewel de vorm van de schaduwbeelden der bushy stunt virusdeeltjes in Fig. 5A en 5B door de geringe afmetingen moeilijker te beoordelen is dan bij het genoemde wound tumor virus – dit virus is nl. 3 maal zo groot als het bushy stunt virus – wordt ook hier soms een zekere hoekigheid gesuggereerd. Het lijkt echter geboden, alvorens de vorm van de ingedroogde bushy stunt virusdeeltjes definitief als een polyëder te betitelen, hierover nader onderzoek te verrichten.

De voor de verschillende virusziekten specifieke deeltjes konden slechts als dragers der infectieusiteit worden herkend vanwege het ontbreken van hierop gelijkende deeltjes in overeenkomstig behandeld, vergelijkbaar, gezond materiaal. Voor komkommermozaïekvirus en bushy stunt virus blijkt dit uit de electronen-foto's, weergegeven resp. in Fig. 4B en 5C. De preparaten, vervaardigd van de extracten van de verschillende zones uit chromatogrammen van gezond sap, maakten in het algemeen, met uitzondering van wat verspreid voorkomend korrelig materiaal, een vrij lege indruk. Alleen die welke vervaardigd waren van extracten van de zone, die de ultraviolet licht absorberende stoffen bevatte, vertoonden een grote hoeveelheid amorf materiaal, waardoor het vlies van het electronenpreparaat min of meer als met een sliblaag bedekt lijkt.

5. SAMENVATTING

Een eenvoudige papierchromatografische fractionering, op semipreparatieve schaal, van onbehandeld vers perssap van met verschillende viren besmette tabaks- en tomatenplanten, leidde tot de vervaardiging van electronenmicroscopische opnamen, waarop de voor de verschillende virusziekten kenmerkende deeltjes duidelijk te onderscheiden zijn. Het onderzoek had betrekking op de volgende viren: tabaksmozaïekvirus, ratelvirus, aardappel X-virus, tabaks-

necrosevirus en komkommermozaïekvirus op tabak en bushy stunt virus op tomaat.

6. SUMMARY

A simple technique for the isolation of tobacco mosaic virus by paper chromatography, on a semi preparative scale, was described recently (RAGETLI & VAN DER WANT, 1954). By this technique virus was isolated easily from plant sap which had been centrifuged previously at low speed. The method was also applied in studies of bean (*Phaseolus vulgaris*) viruses (VAN DER WANT, 1954) using centrifuged and uncentrifuged sap.

As described in these papers, chromatography was carried out at room temperature on paper strips of Whatman no 1 filter paper, 57 cm long and 6 cm wide. A sample of 0.09 ml of the sap to be chromatographed was added to the strip in a pencil-indicated area 4 cm wide and 3 cm long. This area, called the origin (= „oorsprong”), was situated 6 cm from the top and 1 cm from the sides (Fig. 1). The strip of paper was folded along the line CD 1.5 cm below the top and this edge was clasped between two glass plates, which were placed in a porcelain dish. The dish with the suspended strip was then placed in a cabinet with an atmosphere saturated with water, and twice distilled water was added to the dish immediately to prevent drying of the sample on the strip. The water ascended between the glass plates and was sucked off by the filter paper. When the water front had reached the line called finish in Fig. 1, the chromatogram was dried at about 55°C, cut into halves lengthwise, along the line AB, and one half was photographed by contact printing in ultraviolet light (U.V.) of about 265 m μ (bandwidth 6.6 m μ) in order to locate U.V. absorbing substances in the chromatogram. Since these compounds or other compounds, which were situated in the same area of the chromatogram might hinder the visualization of the virus particles in electron microscopy, it was important to localize them exactly.

A second chromatogram from the same sap was developed in a similar way and cut into several zones while still wet. To facilitate this the paper strip had been marked before use into 22 parts of 2 cm each (Fig. 1). A standard quantity of twice distilled water (0.5 ml per 2 cm of chromatogram) was added to each section to prepare an extract. The wet pieces of paper were crushed with a glass rod and the liquid separated from the pulp by filtering through a hard filter paper to remove cellulose fibers. Electron microscope preparations on formvar screens were made from the filtrates and after drying shadowed with palladium. Immediately after the preparation of the electron microscope specimens the remaining liquids were used in inoculation tests.

In the present work the merits of the technique with respect to electron microscopy were tested on the following viruses: tobacco mosaic virus (*Nicotiana virus* 1)¹⁾, tobacco rattle virus (*Nicotiana virus* 5)¹⁾, potato virus X (*Solanum virus* 1)¹⁾, a tobacco necrosis virus (from the group *Nicotiana virus* 11)¹⁾ originally isolated from the roots of *Bouvardia humboldtii*, cucumber mosaic virus (*Cucumis virus* 1)¹⁾, yellow strain no 6 of PRICE, 1934), all cultured in *Nicotiana tabacum* var. White Burley, and bushy stunt virus (*Lycopersicum virus* 4)¹⁾ cultured in *Lycopersicum esculentum* var. Ailsa Craig. These rod-like, thread-like or spherical viruses were chosen, because their morphology was known from earlier investigations by other workers.

¹⁾ According to the nomenclature of SMITH (1937).

Immediately after harvesting, leaves of the diseased plants and of healthy control plants were crushed with pestle and mortar and squeezed through cheese cloth. To the green sap KCN solution (1% w/v) was added to a final concentration of 0.1%, and thereafter the sap was added to the filter paper.

Infectivity of extracts from chromatograms of tobacco mosaic virus was tested on detached *Nicotiana glutinosa* leaves. Extracts from chromatograms of rattle virus, potato virus X, tobacco necrosis virus, and cucumber mosaic virus were tested on plants of White Burley tobacco; those of tobacco necrosis virus were also tested on *Phaseolus vulgaris* var. Beka and those of bushy stunt virus were tested on *Vigna sinensis*.

The electron micrograms reproduced in Fig. 4A, 5A and 5B show characteristic particles detected in extracts from specific zones of chromatograms to which crude sap from diseased plants had been applied. Extracts from corresponding parts of chromatograms on which samples of crude sap from healthy plants were placed, did not reveal similar particles (Fig. 4B and 5C). Further details about the extracts from which the photographs were prepared are listed in Table I.

The rod-like particles represented in Fig. 2A, as well as the thread-like particles in Fig. 3A show a striking uniformity in length. The rattle virus preparation on the other hand revealed rod-like particles belonging to three groups of different length (Fig. 2B).

Fig. 3B shows scattered spherical particles more or less embedded in a partly granular mass. This mass consisted at least partly of the U.V. absorbing material which was present in the zone from which the extract was made. Fig. 3C shows on the other hand few spherical particles against a smooth background. The difference in the number of spherical particles in the two zones agreed exactly with the results of the infectivity tests.

The microgram reproduced in Fig. 4A reveals only very small, rather irregular particles. As the extract from which the mount was prepared showed a high infectivity, and no similar particles had been found in the comparable preparation of a healthy plant (Fig. 4B) they were considered specific for cucumber mosaic.

Table I. Paper chromatograms of sap from diseased and healthy plants. Location of zones containing substances absorbing ultraviolet light ($\lambda = 265 \text{ m}\mu$) and of zones used for electron microscopy

source	zone with U.V. absorbing substances	zone from which extract was taken for electron microscopy	no. of reproduced microgram
tobacco mosaic virus in tobacco plant	6-15.5	16-20	2A
rattle virus in tobacco plant	11-18	7-11	2B
potato virus X in tobacco plant	13-19	4- 8	3A
tobacco necrosis virus in tobacco plant	10-18	15-18.5	3B
tobacco necrosis virus in tobacco plant		6-9.5	3C
cucumber mosaic virus, yellow strain no. 6 in tobacco plant	11-19	0.5- 3	4A
bushy stunt virus in tomato plant	11-18.5	20-22	5A, 5B ¹⁾
healthy tobacco plant	9-17	0.5- 3	4B
healthy tomato plant	10.5-18	20-22	5C

¹⁾ Fig. 5B is an enlargement of a part of the microgram reproduced in Fig. 5A.

Fig. 5A shows many particles of uniform size and of a polygonal outline. This can be seen better in Fig. 5B, which gives part of Fig. 5A in greater magnification.

The rod-like particles from Fig. 2A, isolated from the crude sap of a tobacco mosaic virus diseased tobacco plant, show the familiar appearance, well known since the early microscopic work of KAUSCHE, PFANKUCH & RUSKA (1939). However, the particles in the microgram published here are more uniform in length and agree better with those shown by SIGURGEIRSSON & STANLEY (1947). Nevertheless the number of particles in their photographs was smaller than in the present while the amount of contaminants seemed to have been higher. While their method was also easy and harmless the present technique seems more suitable, especially in cases of low virus concentration.

The particles from tobacco plants diseased with rattle virus, resemble those isolated by ammonium sulphate precipitation (VAN DER WANT & ROZENDAAL, 1948). Preparations obtained by the salting-out procedure seemed to contain more rod-like particles with a length resembling that of the longest particle in Fig. 2B. This may be due to an aggregating effect of the salt.

End-to-end aggregation of particles is also known from potato virus X (TAKAHASHI & RAWLINS, 1946; KLECZKOWSKI & NIXON, 1950). Fig. 3A clearly shows that paper chromatography prevented aggregation during this process of isolation. The particles greatly resemble in size those obtained by BODE & KÖHLER (1952).

The spherical particles in Fig. 3B and 3C are reminiscent of certain isolates of tobacco necrosis virus studied by BAWDEN & NIXON (1951). Unlike their so-called Rothamsted tobacco necrosis virus which showed two definite particle sizes, the present isolate was of uniform dimensions.

Fig. 4A demonstrates that cucumber mosaic virus particles isolated by paper chromatography are very small. It remains to be shown whether or not the small particles present in this microgram are correlated with infectivity. Direct comparison of this picture with photographs published by other authors is not justified because the strain used in the present investigation differed from previously studied strains. SILL, BURGER, STAHMANN & WALKER (1952) working with a common strain of cucumber mosaic virus, obtained electron micrograms showing aggregates but also spherical particles with a diameter of approximately 35 m μ . NOORDAM (1952) studying a type of cucumber mosaic virus isolated from *Chrysanthemum indicum*, found small, more or less spherical particles (20–50 m μ) together with aggregates. The microgram published by DE BRUYN OUBOTER, BEIJER & VAN SLOGTEREN (1951) from the same virus examined by NOORDAM, showed rather large spheres, some of which suggest a complex nature.

The specific particles represented in Fig. 5A superficially resemble those isolated by PRICE, WILLIAMS & WYCKOFF (1946) but, instead of being spherical, the particles from Fig. 5A and 5B clearly show a polygonal outline. BRAKKE, VATTER & BLACK (1954) detected a similar polygonal outline in wound tumor virus particles and angular shapes in their shadows, and interpreted them as polyheders of diameters from 70–85 m μ . Whether the bushy stunt virus particles in Fig. 5A and 5B are really polyhedral or not, requires further study.

The particles specific for the various virus diseases were not present in similar parts of chromatograms from comparable healthy plant sap. Fig. 4B and 5C demonstrate this for two zones. Extracts from parts of chromatograms from

healthy sap generally proved rather „empty” when examined in the electron microscope. Extracts from zones containing U.V. absorbing substances revealed a large quantity of amorphous material.

The results indicate that the paper chromatographic technique provides a valuable and easy method of preparing certain plant viruses for electron microscopy. Moreover its harmless character seems to result in less, if any, aggregation of the particles specific for the studied virus diseases.

LITERATUUR

- BAWDEN, F. C. & NIXON, H. L. – 1951. The application of electron microscopy to the study of plant viruses in unpurified plant extracts. *J. gen. Microbiol.* **5**: 104–109.
- BODE, O. & KÖHLER, E. – 1952. Elektronenmikroskopische Untersuchungen am Kartoffel-X- und Tabakmosaik-Virus. *Z. Naturforsch.* **7b**: 598–600.
- BRÄKKE, M. K., VÄTTER, A. E., BLACK, L. M. – 1954. Size and shape of wound tumor virus. Abnormal and pathological plant growth Brookhaven symposia in Biology No. **6**: 137–156.
- BRUYN OUBOTER, M. P. DE, BEYER, J. J. & SLOGTEREN, E. VAN – 1951. Diagnosis of plant diseases by electron-microscopy. *Antonie van Leeuwenhoek* **17**: 189–208.
- KAUSCHE, G. A., PFANKUCH, E. & RUSKA, H. – 1939. Die Stichtbarmachung von pflanzlichem Virus im Übermikroskop. *Naturwissenschaften* **27**: 292–299.
- KLECZKOWSKI, A. & NIXON, H. L. – 1950. An electron microscope study of potato virus X in different states of aggregation. *J. gen. Microbiol.* **4**: 220–224.
- NOORDAM, D. – 1952. Virusziekten bij chrysanten in Nederland. *T. Pl. ziekten* **58**: 121–189.
- PRICE, W. C. – 1934. Isolation and study of some yellow strains of cucumber mosaic. *Phytopath.* **24**: 743–761.
- PRICE, W. C., WILLIAMS, R. C., WYCKOFF, R. W. G. – 1946. Electron micrographs of crystalline plant viruses. *Arch. Biochem.* **9**: 175–185.
- RAGETLI, H. W. J. & WANT, J. P. H. VAN DER – 1954. Paper chromatography of plant viruses. *Proc. Kon. Ned. Ak. v. Wet. Ser. C.* **57**: 621–627.
- SIGURGEIRSSON, T. & STANLEY, W. J. – 1947. Electron microscope studies on tobacco-mosaic virus. *Phytopath.* **37**: 26–38.
- SILL, W. H. JR, BURGER, W. C., STAHMANN, M. A., WALKER, J. C. – 1952. Electron microscopy of cucumber virus 1. *Phytopath.* **42**: 420–422.
- SMITH, K. M. – 1937. A textbook of plant virus diseases, London, J. & A. Churchill Ltd.
- TAKAHASHI, W. N. & RAWLINS, T. E. – 1946. An electron microscope study of two strains of potato X-virus. *Am. J. Bot.* **33**: 740–742.
- WANT, J. P. H. VAN DER & ROZENDAAL, A. – 1948. Elektronen-microscopisch onderzoek van het virus, dat de ratelziekte van de tabak en het stengelbont van de aardappel veroorzaakt. *T. Pl. ziekten* **54**: 134–141.
- WANT, J. P. H. VAN DER – 1954. Onderzoekingen over virusziekten van de boon (*Phaseolus vulgaris* L.). *Med. I.P.O. (Wageningen)*, nr. 85.

VERKLARING DER FIGUREN

Explanation of Figures

De in de figuren afgebeelde viren werden alle langs papierchromatografische weg uit ruwe plantensappen geïsoleerd. De witte strepen in de foto's geven een afstand van 1 μ aan. Alle opnamen werden gemaakt met een PHILIPS elektronenmicroscoop, type voor 100 KV.

All viruses reproduced in the figures were isolated by paper chromatography from crude plant juices. The white lines in the photographs indicate a distance of 1 μ . All photographs were made with the PHILIPS electron microscope, 100 KV type.

FIG. 2A. Staafvormige tabaksmozaïekvirusdeeltjes uit het ruwe sap van met dit virus besmette white burley tabak. Vergroting 25.000 $\times$.

Rodlike T.M.V. particles from crude sap of diseased white burley tobacco. Magnification 25,000 $\times$

FIG. 2B. Staafvormige ratelvirusdeeltjes van uiteenlopende lengte uit het ruwe sap van met dit virus besmette white burley tabak. Vergroting 25.000 $\times$.

Rodlike rattle virus particles of different length from crude sap of diseased white burley tobacco. Magnification 25,000 $\times$.

FIG. 3A. Draadvormige aardappel X-virus deeltjes uit het ruwe sap van met dit virus besmette white burley tabak. Vergroting 25.000 $\times$.

Threadlike potato X-virus particles from crude sap of diseased white burley tobacco. Magnification 25,000 $\times$.

FIG. 3B en 3C. Bolvormige deeltjes van een tabaksnecrosevirus uit het ruwe sap van met dit virus besmette white burley tabak. Foto's genomen van extracten van twee verschillende zones van een zelfde chromatogram. Vergroting 25.000 $\times$.

Spherical particles of a tobacco necrosis virus from crude sap of diseased white burley tobacco. Photographs taken from extracts of 2 different zones of the same chromatogram. Magnification 25,000 $\times$.

FIG. 4A. Komkommersmozaïekvirus uit het ruwe sap van met dit virus besmette white burley tabak. De diameter van de enigszins hoekige deeltjes varieert van 20–50 m μ . Vergroting 25.000 $\times$.

Cucumber virus 1 from crude sap of diseased white burley tobacco. Diameter of the somewhat angular particles varies from 20–50 m μ . Magnification 25,000 $\times$.

FIG. 4B. Bestanddelen uit het ruwe sap van gezonde white burley planten. Vergroting 25.000 $\times$. De zones, die de extracten voor deze foto en voor die van Fig. 4A opleverden, waren genomen uit overeenkomstige delen der chromatogrammen.

Substances from crude sap of healthy white burley tobacco. Magnification 25,000 $\times$. Zones which delivered extracts for photographs reproduced in this Fig. and in Fig. 4A were taken from corresponding sections of chromatograms.

Fig. 5A, B. Bushy stunt virusdeeltjes uit het ruwe sap van met dit virus besmette tomatenplanten. Fig. 5B is een detailvergroting van Fig. 5A. Let op de duidelijk veelhoekige omtrek van vele deeltjes, vooral in Fig. 5B. Vergroting Fig. 5A: 40.000 $\times$. Vergroting Fig. 5B: 80.000 $\times$.

Bushy stunt virus particles from crude sap of diseased tomato plants. Fig. 5B is part of Fig. 5A in greater magnification. Notice the polygonal outline of many particles especially in Fig. 5B. Magnification 5A: 40,000 $\times$, Fig. 5B: 80,000.

FIG. 5C. Bestanddelen uit het ruwe sap van gezonde tomatenplanten. Vergroting 40.000 $\times$. De zones, die de extracten voor deze foto en voor die van Fig. 5A opleverden, waren genomen uit overeenkomstige delen der chromatogrammen.

Substances from crude sap of healthy tomato plants. Magnification 40,000 $\times$. Zones which delivered extracts for photographs reproduced in this Fig. and Fig. 5A were taken from corresponding sections of chromatograms.