

BINDING VAN VIRUSREMSTOFFEN AAN KLEIMINERALEN ¹

With a summary: Binding of virus-inhibiting substances on clay minerals

DOOR

T. H. THUNG en J. DIJKSTRA

Laboratorium voor Virologie, Wageningen

INLEIDING

In zijn onderzoek over de werking van een uit anjer verkregen stof, welke de virusinfectie remt, kwam RAGETLI (1957) tot de opvatting, dat het mechanisme van deze remming berust op het blokkeren van bepaalde plaatsen nabij het bladoppervlak, welke noodzakelijk zijn voor de totstandkoming van de virusinfectie. Aan deze plaatsen, receptoren genoemd, zouden de virusdeeltjes zich moeten hechten, alvorens vermeerdering van het virus optreedt. Naar aanleiding van de mededeling van VAN DER WANT (1952) over de reversibele binding van virusdeeltjes aan kleimineralen werd in het hieronder beschreven onderzoek nagegaan in hoeverre deze kleibestanddelen van invloed zijn op de werking van de door RAGETLI beschreven remstof uit anjer.

MATERIAAL EN METHODEN ²

Als uitgangsmateriaal werd tabaksnecrosevirus (TNV) uit bonen (*Phaseolus vulgaris* L. var. Beka) gebruikt, dat afkomstig was van wortels van *Bouvardia humboldtii* hort. Voor de proefnemingen werden White Burley tabak en de Beka-variëteit van boon geïnfecteerd met een TNV-preparaat. Dit preparaat werd bereid door bladeren van zieke boneplanten uit te persen, nadat deze een nacht bij -20°C waren bewaard, het perssap daarna gedurende 4 minuten tot 50°C te verhitten en het neerslag af te centrifugeren. De bovenstaande vloeistof bevatte het virus. De remstof werd op overeenkomstige wijze uit gezonde anjerplanten, welke uit zaad gekweekt waren, verkregen.

Van de kleimineralen werden illiet met zure en montmorilloniet met basische eigenschappen toegepast. Om andere ionen uit het illiet te verwijderen, werd dit zo lang met 0,2 n HCl behandeld volgens de methode van FAVEJEE (1951), dat het oppervlak van de deeltjes verzadigd was met H⁺-ionen, en tenslotte uitgewassen met water.

Bij 10 ml virussuspensie werd 0,5 g kleimineraal gevoegd, gedurende 1 à 2 uur geschud en daarna afgecentrifugeerd. Grotere hoeveelheden klei in 10 ml suspensie zwollen te sterk en vormen een compacte massa. Niet gepubliceerde proeven hebben aangetoond, dat kleimineralen geen abrasieve werking hebben.

Voor de inoculatieproeven werd de bladhelften-methode toegepast, waarbij van zes bladeren van White Burley tabak de ene helft met virus, gemengd met

¹ Aangenomen voor publikatie 19 september 1958.

² De schrijvers betuigen hun dank aan de Heer M. BIJL voor zijn waardevolle, technische hulp.

anjersap of met virus, gemengd met anjersap en klei en de andere helft met virus alleen geïnoculeerd werd. Van boneplanten werden de tegenover elkaar staande bladeren als proef- en controlebladeren gebruikt. Alle inoculaties werden met carborundum verricht, dat na de behandeling onder de kraan werd afgespoeld.

In tegenstelling tot de gelijktijdige behandeling van het viruspreparaat met kleimineralen werd in andere proeven de klei later toegevoegd door de reeds geïnoculeerde bladeren, hetzij voor de tweede keer met klei te inoculeren, hetzij in de kleisuspensie te dompelen en vervolgens onder de kraan af te spoelen.

Na twee dagen werden de ontstane vlekken geteld en deze aantallen gesommeerd. In bijgaande tabellen zijn alleen de sommen opgegeven, waarbij de controle-aantallen steeds het eerst zijn vermeld.

PROEVEN MET MENGSELS VAN VIRUS, REMSTOF EN KLEIMINERALEN

Om na te gaan in welke concentratie het anjersap het virus juist onwerkzaam maakt, werden enige proeven met uiteenlopende verdunningen van anjersap uitgevoerd. Het bleek, dat de verlangde concentratie bereikt wordt bij een verdunning van 1:50. Bij de proeven werd in het vervolg 9,8 ml virussuspensie aan 0,2 ml anjersap toegevoegd.

De virussuspensie was na toevoeging van montmorilloniet basisch en na toevoeging van H-illiet zuur. Zowel de basiditeit als de aciditeit is des te sterker als de desbetreffende klei niet eerst wordt afgecentrifugeerd. Het gaat bij deze proeven om een traject van pH 4,5 tot pH 8,0.

Opvallend is het, dat in een belangrijk aantal gevallen toediening van klei, zowel van montmorilloniet als van H-illiet, een sterke stimulering geeft. Deze stimulering komt niet alleen tot uiting bij toediening van klei bij het inoculum, maar ook bij toevoeging aan het mengsel van inoculum en anjersap. Blijkbaar wordt de remstof onwerkzaam gemaakt (tabel 1).

Opmerkelijk is deze werkzaamheid van de klei bij een toediening na inoculatie, zowel met het inoculum alleen, als met inoculum plus anjersap.

HET SELECTIEF BINDEN DOOR KLEIMINERALEN

Om na te gaan in hoeverre de kleimineralen uit een mengsel van virus en remstof één van de twee bestanddelen selectief binden, werd aan het mengsel klei (montmorilloniet of H-illiet) toegevoegd. Een lage virusconcentratie, een verdunning van 1:100, werd gebruikt, omdat eerder uitgemaakt was, dat het virus volledig geïnactiveerd werd bij toediening van anjersap in dezelfde concentratie als bij de voorgaande proeven. Het bleek, dat door de kleitoevoeging een belangrijk geringere remming optrad, zodat aangenomen mocht worden, dat een aanzienlijk deel van de remstof weggenomen was.

Aan een andere hoeveelheid van de bovenstaande vloeistof werd weer virus in de verdunning 1:100 toegevoegd om te kunnen nagaan in hoeverre nog aanwezige vrije remstof inactiverend werkt. Ten slotte werd anjersap alleen met klei geschud en afgecentrifugeerd; de bovenstaande vloeistof werd met virus in de bovengenoemde verdunning gemengd en geïnoculeerd. De resultaten van deze proeven zijn in tabel 2 samengevat. Deze proeven demonstreren, dat de inactiverende werking van anjersap door de toegevoegde klei belangrijk wordt verminderd; in verschillende gevallen treedt zelfs stimulering op. Dit wijst niet

TABEL 1. Aantal vlekken bij inoculatie met tabaksnecrosevirus gemengd met anjersap en/of met montmorilloniet of H-illiet.
Number of local lesions from inoculations with tobacco necrosis virus mixed with carnation sap and/or with montmorillonite or H-illite

	Proef 1/Experiment 1			Proef 2/Experiment 2			Proef 3/Experiment 3		
	c:t *	stimu- lering stimulation	remming inhibition	c:t *	stimu- lering stimulation	remming inhibition	c:t *	stimu- lering stimulation	remming inhibition
NICOTIANA TABACUM VAR. WHITE BURLEY									
<i>Gelijktijdige toediening van klei</i>									
<i>Clay applied simultaneously</i>									
TNV + anjersap/carnation sap	404: 6		99%	1680: 43			119: 15		87%
TNV + montmorilloniet	781: 1217	55%		542: 2802	417%		61: 217	256%	
TNV + anjersap/carnation sap + montmoril- loniet	332: 310		7%	417: 932	123%		107: 371	247%	
TNV + anjersap/carnation sap	1279: 69		95%	36: 14		61%			
TNV + H-illiet	1420: 2463	73%		50: 567	1034%				
TNV + anjersap/carnation sap + H-illiet . .	1173: 348		70%	11: 34	209%				
<i>Latere toediening van klei</i>									
<i>Clay applied afterwards</i>									
TNV + anjersap/carnation sap	515: 5		99%						
TNV, later/afterwards montmorilloniet .	784: 1154	47%							
TNV + anjersap/carnation sap; later/after- wards montmorilloniet	819: 293		64%						
PHASEOLUS VULGARIS VAR. BEKA									
TNV + anjersap/carnation sap	159: 0		100%						
TNV, later/afterwards H-illiet	215: 94		56%						
TNV + anjersap/carnation sap; later/after- wards H-illiet	175: 24		86%						

* c:t = verhouding tussen aantallen vlekken op de controle-bladhelften, resp. controlebladeren, en die op de toets-bladhelften, resp. toets-
 bladeren, der geïnoculeerde planten van *N. tabacum* en *P. vulgaris*.

* c:t = ratio of numbers of lesions on the control leafhalves and control leaves resp., and those on the test leafhalves and test leaves resp., of the
 inoculated plants of *N. tabacum* and *P. vulgaris*.

TABEL 2. Aantal vlekken bij inoculatie op bladeren van *N. tabacum* var. White Burley met virus gemengd met anjersap en behandeld met klei.
Number of local lesions from inoculations on White Burley tobacco leaves with virus mixed with carnation sap and treated with clay.

	Proef 1/Experiment 1			Proef 2/Experiment 2		
	c : t *	stimu- lering stimulation	remming inhibition	c : t *	stimu- lering stimulation	remming inhibition
TNV 1 : 100 + anjersap + montmorilloniet; schudden en afcentrifugeren; bovenstaande vloeistof geïnoculeerd	233 : 59		75 %	100 : 47		53 %
TNV 1 : 100 + carnation sap + montmorillonite; shaken and spun; super- natant inoculated	90 : 49		46 %	73 : 189	159 %	
Bovenstaande vloeistof + TNV 1 : 100, gemengd en geïnoculeerd Supernatant + TNV 1 : 100, mixed and inoculated	90 : 28		69 %	65 : 47		28 %
Anjersap + montmorilloniet; schudden en afcentrifugeren; bovenstaande vloeistof + TNV 1 : 100, gemengd en geïnoculeerd						
Carnation sap + montmorillonite; shaken and spun; supernatant + TNV 1 : 100, mixed and inoculated						
TNV 1 : 100 + anjersap + H-illiet; schudden en afcentrifugeren; boven- staande vloeistof geïnoculeerd	352 : 488	39 %		237 : 323	36 %	
TNV 1 : 100 + carnation sap + H-illite; shaken and spun; supernatant inoculated	233 : 607	161 %		238 : 285	20 %	
Bovenstaande vloeistof + TNV 1 : 100, gemengd en geïnoculeerd Supernatant + TNV 1 : 100, mixed and inoculated	175 : 330	89 %		202 : 157	22 %	
Anjersap + H-illiet; schudden en afcentrifugeren; bovenstaande vloeistof + TNV 1 : 100, gemengd en geïnoculeerd						
Carnation sap + H-illite; shaken and spun; supernatant + TNV 1 : 100, mixed and inoculated						

* c : t = verhouding tussen de aantallen vlekken op de controle-helften en die op de toets-helften der geïnoculeerde bladeren.

* c : t = ratio of numbers of lesions on the control halves and those on the test halves of the inoculated leaves.

alleen op een binding van de remstof uit anjersap maar eveneens op een binding van een mogelijk in het inoculum aanwezige remstof.

BINDING VAN DE REMSTOF UIT BONEBLADEREN

Deze remstof uit bonebladeren zou door klei verwijderd moeten worden, opdat het infectievermogen van het inoculum groter wordt.

Inoculum, bereid op de wijze zoals eerder werd aangegeven, werd gemengd òf met montmorilloniet òf met H-illiet òf met beide tegelijk, waarna het mengsel op de bladeren van White Burley tabak werd geïnoculeerd. Uit de resultaten van deze proeven (tabel 3) blijkt duidelijk, dat kleibehandeling, zowel in basische als in zure mengsels, het virus in belangrijke mate bevrijd heeft van remmingen. Bij onverdund TNV is de klei niet in staat alle boneremstof te adsorberen, zodat de stimulering gering is. Dit is vooral met H-illiet het geval.

TABEL 3. Aantal vlekken bij inoculatie van een mengsel van TNV + klei op bladeren van White Burley.

Number of local lesions from inoculations with a mixture of TNV + clay on White Burley leaves.

	pH	c : t	stimulerende stimulation	remming inhibition
TNV onv./und. + H-illiet . . .	6,4	76 : 91	20%	
TNV 1 : 2 + H-illiet	6,4	31 : 186	500%	
TNV 1 : 100 + H-illiet	4,5	45 : 53	18%	
TNV onv./und. + montm. . . .	6,9	90 : 375	316%	
TNV 1 : 2 + montm.	7,2	49 : 889	1714%	
TNV 1 : 100 + montm.	7,4	59 : 17		71%
TNV 1 : 2 + H-illiet + montm.	6,7	11 : 322	2827%	

Het grootste effect heeft de klei, wanneer een verdunning van het virus van 1:2 gebruikt wordt.

Is het virus zeer verdund (verdunning 1:100), dan heeft de klei blijkbaar niet alleen de remstof gebonden, maar eveneens een gedeelte van het virus, zodat de stimulering gering is.

DISCUSSIE

Het meest opvallend effect van de behandeling met klei (zowel met montmorilloniet als met H-illiet) op het uit bonebladeren verkregen TNV-preparaat, is de activering van het virus.

Toediening van het kleimineraal na inoculatie van het virus, al of niet gecombineerd met anjersap, heeft hetzelfde effect ten gevolge. In het bovenstaande werd aangenomen, dat hier sprake is van een selectieve binding van een remstof. Dit zou dan gelden zowel voor de remstof, afkomstig van de bonebladeren, als voor die, welke met het anjersap wordt toegevoegd. Niet gepubliceerde proeven hebben aangetoond, dat het TNV, in tabaksbladeren vermeerderd en gezuiverd met ammoniumsulfaat, aan kleimineralen wordt gebonden, omdat met mengsels

van dit gezuiverde virus en klei geen of nagenoeg geen virusinfectie op White Burley tabak te verkrijgen is.

De boven beschreven proeven maken het waarschijnlijk, dat de uit boon afkomstige remstof door de klei eerder wordt gebonden dan het TNV. De pH is bij deze binding van geen essentiële betekenis.

Baserend op de opvatting van RAGETLI, dat het gaat om het blokkeren van de receptoren door remstofdeeltjes, wanneer virusinfectie door toevoeging van anjersap wordt voorkomen, moet men een aanvullende veronderstelling maken om het opnieuw tot stand komen van de infectie door latere toediening van klei te verklaren. Na het verwijderen van de blokkerende remstof van de receptoren zouden de virusdeeltjes door deze vrijgekomen receptoren zodanig aangetrokken worden, dat een hechting plaats vindt en vermeerdering optreedt. Het is mogelijk deze receptoren-theorie te vervangen door de thans weer in de belangstelling gekomen matrijzen-hypothese. Volgens deze opvatting zou bij de enzymatische processen, waardoor het virus tot vermeerdering komt, het infecterende agens een rol vervullen als sjabloon. Dit sjabloon wordt onwerkzaam door toevoeging van remstoffen, welke door kleimineralen verwijderd kunnen worden. Bij de receptoren-hypothese gaat het om de inleiding tot de infectie, namelijk de aanhechting; bij de tweede hypothese om het daarna beginnend proces der vermeerdering. Het hier medegedeelde onderzoek geeft geen aanleiding tot meerdere steun aan de eerste hypothese. Wel zijn er mogelijkheden geopend voor nieuwe methoden voor viruszuivering en is het bestaan van een andere remstof, afkomstig van de boon, waarschijnlijk gemaakt.

SAMENVATTING

Gewerkt werd met tabaksnecrosevirus (TNV), geïsoleerd uit wortels van *Bouvardia humboldtii* hort. en vermeerderd op boon (*Phaseolus vulgaris* L. var. Beka). Het inoculum werd verkregen door de zieke bonebladeren eerst te bevriezen, daarna uit te persen en de ruwe bestanddelen te verwijderen door gedurende 5 min. bij 50°C te verhitten en de samengeklonterde massa af te centrifugeran. Op overeenkomstige wijze werd een remstof geïsoleerd uit gezonde anjerplanten. Bij de juiste verhoudingen toegediend blijkt dit anjersap remmend te werken op het infectievermogen van het TNV, zowel bij White Burley tabak als bij boon.

Toevoeging van 0,5 g montmorilloniet of van 0,5 g H-illiet bij 10 ml inoculum geeft bij inoculatie op tabak een groter aantal vlekken dan zonder deze kleimineralen. Dit kan betekenen, dat in het inoculum een remstof aanwezig is, afkomstig uit bonebladeren, waarin het TNV werd vermeerderd. Deze remstof wordt door de gebezigde klei eerder gebonden dan door het TNV.

Kleimineralen stimuleren de werking van TNV eveneens, wanneer de anjerremstof toegevoegd was; ook in dit geval moet een selectief binden van de remstof verondersteld worden. De pH blijkt niet van essentiële betekenis te zijn. Montmorilloniet maakt de virussuspensie enigszins basisch, H-illiet zuur. Zowel de basiditeit als de aciditeit is des te sterker als de desbetreffende klei niet eerst wordt verwijderd. In de proeven ging het om het traject tussen pH 4,5 en pH 8,0.

Hetzelfde effect werd gevonden, wanneer de kleimineralen toegediend werden nadat de inoculatie op het tabaksblad reeds was verricht, zowel bij inoculaties

met het TNV alléén, als bij die met het TNV gemengd met anjersap. Men moet wel aannemen, dat zelfs de reeds in het blad aanwezige remstof wordt weggenomen. Hoe daarna de virusdeeltjes weer tot werkzaamheid komen, is onbekend. In dit verband zijn in de discussie twee mogelijkheden naar voren gebracht. Het onderzoek heeft geleid tot de mogelijkheid met kleimineralen nieuwe zuiveringsmethoden uit te werken en heeft tevens het voorkomen van een remstof, in bonebladeren, waarschijnlijk gemaakt.

SUMMARY

Experiments were made on the effect of carnation sap on the infectivity of tobacco necrosis virus (TNV). This virus was isolated from roots of a *Bouvardia humboldtii* plant and propagated in *Phaseolus vulgaris* plants (var. Beka). The inoculum was obtained by pressing sap from previously frozen leaves of the infected bean plants. The crude sap was heated for 5 min. at 50 °C and centrifuged in order to remove plant constituents. The same procedure was followed to obtain a preparation of inhibitor from sap of healthy carnation plants.

Virus inhibition occurred if inoculations were made with TNV mixed with carnation sap. In order not to have the inhibitor in excess, it was necessary to use a dilution of the carnation sap of 1:50. Adding 0.2 ml carnation sap to 0.8 ml TNV resulted in circa 100 % inhibition. It was found that clay minerals, viz. montmorillonite and H-illite, were able to remove inhibiting substances from a mixture of virus and inhibitor. H-illite was prepared by treating illite with HCl in such a way that the surface of the mineral particles became covered with an uniform layer of H⁺-ions. Montmorillonite rendered the virussuspension alkaline and H-illite acid; the alkalinity and the acidity were more pronounced when the respective clay minerals were not previously separated from the virus suspension by centrifugation. In the quantities used (0.5 g H-illite or 0.5 g montmorillonite) the pH ranged from 4.5 to 8.0.

Since adding one of the clay minerals to the inoculum gave an increase in the number of local lesions on leaves of White Burley tobacco (proved not due to abrasive action) the presence in the inoculum of an inhibitor was deduced. This inhibitor must have been derived from the bean leaves in which the virus had been propagated. As the purification of the virus was not absolute, this inhibiting substance exerted its influence in each inoculation.

The substance was thought to be selectively bound by the clay minerals.

Experiments showed also that in a mixture of virus with an inhibitor from carnation, the latter has priority in being bound by clay. Very remarkable is the action of clay when it is applied to leaves which previously (a few minutes beforehand) have been inoculated either with virus or with virus mixed with carnation sap. In the first case a greater number of local lesions was found and in the second case the inhibiting action of the carnation sap was suspended or reduced and the infectivity of the virus was restored.

So it appeared that the clay was able to counteract the effect of the inhibiting substances present in the TNV inoculum; even when they had been introduced into the leaves a few minutes beforehand, it was able to counteract also.

Two hypotheses are to be considered with respect to these phenomena viz. the receptor theory and the template theory. RAGETLI (1957) supports the first theory, when he supposes that inhibiting substances are blocking the receptors,

so that virus particles cannot attach, or that they drive out the already attached particles from these supposed receptors. In this respect a further supposition must be added to the receptor theory, namely that restoration of infectivity after removal of inhibitors implies reinstatement of virus particles to these receptors.

With the template theory the infecting virus is supposed to act as a mould in the enzymatic processes by which new virus particles are formed. Inhibitors could be supposed to spoil these moulds. Clay minerals could clear these moulds again.

So the receptor theory relates to the first stage of infection viz. attachment, whereas the template theory is concerned with the process of multiplication. Our experiments give no reason to prefer one or the other theory. They have, however, brought forward the possibility of building up a new method of virus purification with clay minerals and also the possibility of there being a new inhibitor in bean leaves.

LITERATUUR

- FAVEJEE, J. CH., - 1951. The origin of the „Wadden” mud. Meded. Landbouwhoges., Wageningen no. 51: 113-141.
- RAGETLI, H. W. J., - 1957. Onderzoekingen over een virusremstof voorkomend in *Dianthus caryophyllus* L. T. Pl.ziekten 63: 245-344.
- WANT, J. P. H. VAN DER, - 1952. Some remarks on soil-borne virus diseases. Proc. Conf. Pot. Virus Diseases, Wageningen-Lisse, 1951: 71-75.